TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MTCH2 PROTEİNİNİN İNFLUENZA A VİRÜSÜ REPLİKASYONUNA ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

PINAR ULUPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. KADİR TURAN

İSTANBUL-2022

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 olmadığını beyan ederim.

Pınar ULUPINAR

.

I. TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her bir adımında bana her türlü desteği veren, öğrencisine donanım kazandırmayı, bilgi ve tecrübesini aktarmayı kendine görev edinmiş, çalışma düzenine ve bilimsel bakış açısına hayranlık duyduğum, çalışmaktan dolayı bana kendimi son derece şanslı hissettiren ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Kadir TURAN'a,

Katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Derya Özsavcı olmak üzere tüm Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Laboratuvar çalışmalarımı sürdürürken bana tecrübelerini, bilgi birikimlerini aktaran, güler yüzlerini hiç eksik etmeyen, aynı ortamda çalıştığım için mutluluk duyduğum arkadaşlarım Ayşegül PİRİNÇAL, Elif ÇAĞLAYAN, Tuğba KOÇMAR, Arzu GÜL ve Tuğba TEKER'e,

Yüksek lisansımın her anında yanımda olan, çalışmalarıma ve sürecime eşlik eden, kariyerimdeki desteğini ve bana olan inancını her zaman hissettiren değerli dostum ve meslektaşım Diana SARI'ya,

Beni bugünlere getiren, kariyerimi inşa etmemdeki en büyük destekçilerim, her zaman arkamda olduklarını bildiğim, benimle her zaman gurur duyan babam Ahmet ULUPINAR, annem Hanife ULUPINAR, ağabeyim Yusuf ULUPINAR'a,

Ayrıca bu zamana kadar varlıklarıyla bana güç veren, moral ve motivasyon kaynağı olan, tüm sürecime eşlik eden ve desteklerini her daim hissettiren dostlarım Büşra KÖSTEK'e, Ceren AKTOPRAK'a, Senem BÜTÜN'e ve Yaren KARADAŞ'a minnet ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu tez çalışması kısmen TÜBİTAK tarafından" İnfluenza Virüs Patogenezinde Viral RNA Polimeraz Enzimi ve Konak Hücre Proteinlerinin Rolünün Araştırılması" konulu ve 112S518" nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

I. TEŞEKKÜR……..i
II. İÇİNDEKİLER……....ii
III. KISALTMALAR……x
IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ……..….xi

i. Şekil Listesi…….……xi
ii. Tablo Listesi…….…....xv

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR…….. ii
II. İÇİNDEKİLER……... ..... ….ii
III. KISALTMALAR……. x
IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ……. xi
i. Şekil Listesi……..... xi
ii. Tablo Listesi…….…..... xv
1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER..... 6
4.1 İnfluenza A Virüsü Alt Tipleri 7
4.2. İnfluenza A Virüslerinin Morfolojisi ve Moleküler Yapısı..... 9
4.3. İnfluenza A Virüslerinin Yaşam Döngüsü 11
4.4. İnfluenza A Virüslerinin Epidemiyolojisi 18
4.5. Apoptoz ve Nekroz..... 20
4.6. Viral Enfeksiyon ve Apoptoz 21
4.6.1. Dışsal apoptotik yol ve viral proteinler tarafından inhibisyonu..... 21
4.6.2. İçsel apoptotik yol ve viral proteinler tarafından inhibisyonu 23

4.6.3. Viral enfeksiyondan sonra içsel, mitokondriyal apoptoz yolunun aktive edildiği mekanizmalar 28
4.6.4. Viral olarak enfekte olmuş hücrelerin CTL'ler ve NK hücreleri tarafından öldürülmesi 28
4.6.5. Endozomal ve sitozolik bölmelerdeki virüsleri tanıma/algılama ve antiviral doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi oluşturma 30
4.6.6. Viral aşırı yüklenmenin neden olduğu ER stresinin neden olduğu konak hücre apoptozu 32
4.6.7. Konak hücre apoptotik mekanizmasını doğrudan etkileyen viral bileşenler 32
4.7. Mitokondrial Taşıyıcı Proteinler 34
4.8. CRISPR/Cas Teknolojisi ve Gen Düzenleme 38
5. GEREÇ ve YÖNTEM 43
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 43
5.2. Enzimler 44
5.3. Ticari Kitler 45
5.4. Antikorlar 45
5.5. Cihaz ve Gereçler 46
5.6. Besiyerleri 47
5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri 47
5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri 47
5.6.3. Memeli hücrelerinde kullanılan besiyerleri 48
5.6.4. Muhafaza Besiyeri (x2) 48
5.6.5. Serum içermeyen DMEM besiyeri 48
5.7. Çözeltiler 48
5.7.1. Akrilamid/bis-Akrilamid çözeltisi (%29 Akrilamid / %1 bis-Akrilamid – a/h) 48

5.7.2. Amido Black Boya Çözeltisi (% 0,5 – a/h) 49
5.7.3. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10 – a/h) 49
5.7.4. Bloklama çözeltisi (%5'lik yağsız süt tozu) 49
5.7.5. Etidyum bromür (10 mg/ml) 49
5.7.6. %70 Etil alkol 49
5.7.7. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0,5 M, pH: 8,0) 49
5.7.8. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1) 49
5.7.9. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS) 50
5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) 50
5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M) 50
5.7.12. Kapatma çözeltisi 50
5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0,55M) 50
5.7.14. Metanol : glasiyel asetik asit çözeltisi (1:1) 50
5.7.15. %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi 50
5.7.16. Paraformaldehit çözeltisi 51
5.7.17. 1,4-piperazindietanesulfonik asit (PIPES) çözeltisi (1 M) 51
5.7.18. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (%40 – a/h) 51
5.7.19. Polietilen glikol (PEG) / sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (%20 / 1,25 M) 51
5.7.20. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml) 51
5.7.21. Potasyum asetat (KCH_3COO) çözeltisi (3 M) 51
5.7.22. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi (50 mM) 51
5.7.23. di-Potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) çözeltisi (50 mM) 52
5.7.24. Potasyum klorür (KCI) çözeltisi (2,5 M) 52
5.7.25. Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) çözeltisi (%7,5) 52
5.7.26. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10) 52

5.7.27. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (%10) 52
5.7.28. Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (2 N) 52
5.7.29. Sodyum klorür (NaCI) çözeltisi (2,5 M) 52
5.7.30. Sodyum di-hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (200 mM) 52
5.7.31. di-Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (200 mM) 53
5.7.32. %0,25 Tripsin çözeltisi 53
5.7.33. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h) 53
5.7.34. Tween-20 çözeltisi (%10) 53
5.8. Tamponlar 53
5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu 53
5.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glukoz, 10 mM EDTA, pH 8,0) 53
5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0,2 N NaOH, %1 SDS) 53
5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum, 5 M Asetat) 54
5.8.5. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu 54
5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu 54
5.8.7. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, %0,4 SDS– a/h, pH 8,8) 54
5.8.8. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 – a/h SDS, pH 6,8) 54
5.8.9. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0,125 M Tris, 1,25 M Glisin, pH 8,3) 54
5.8.10. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 – a/h SDS, pH 8,3) 54
5.8.11. Protein transfer tamponu 55

5.8.12. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M tris; %8 SDS - a/h; %0,2 bromofenol mavisi - a/h ; %4 2-merkaptoetanol - h/h; %40 gliserin - h/h, pH 6,8) 55

5.8.13. Tris-HCl tamponu (1 M, pH 8,0) 55

5.8.14. Tris-EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0)..... 55

5.8.15. 20x Konsantre TBS tamponu 55

5.8.16. TBS ve TBS-T tamponu 55

5.8.17. Potasyum fosfat (K_2HPO_4) tamponu (50 mM, pH 7,5) 55

5.8.18. Sodyum fosfat tamponu (200 mM, pH 7,0) 56

5.9. Plazmit Vektörler..... 56

5.10. Virüsler 56

5.11. Bakteriler 57

5.12. Memeli Hücre Hatları 57

5.13. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 57

5.14. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 58

5.15. RNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 58

5.16. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi ... 59

5.17. Memeli Hücre Hatlarının Çözündürülmesi, Devamlılığının Sağlanması ve Stoklanması 59

5.18. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu 60

5.19. Total RNA Üzerinden cDNA'ların Hazırlanması ve Elde Edilmesi 60

5.19.1. Hücrelerden Total RNA'nın İzole Edilmesi 60

5.19.2. RNA'ların Kontrol Edilmesi 61

5.19.3. cDNA'ların Elde Edilmesi (Revers Transkripsiyon) 61

5.19.4. cDNA'ların ACTB ve NS1 Geni Üzerinden Kontrol Edilmesi 62

5.19.5. Genlerin cDNA'lar Üzerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması 63
5.20. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması 64
5.20.1. MTCH2 Genini Hedef Alan Rehber RNA'lar Kodlayacak Oligonükleotidlerin Tasarlanması 66
5.20.2. Cas9 ve Rehber RNA Kodlayan Plazmit Vektörün Hazırlanması 66
5.20.3. Ligasyon ve Transformasyon 67
5.21. Vektörlerin PZR ile Kontrolü 67
5.22. CRISPR/Cas9 tekniği ile *MTCH2* geninin susturulması 68
5.22.1. HEK293 Hücrelerinin *MTCH2* Genine Özgü Rehber RNA Kodlayan Vektörlerle Transfeksiyonu 68
5.22.2. *MTCH2* Geni Bakımından *Knockout* Olma Olasılığı olan Hücre Klonlarının Seçilmesi 68
5.22.3. CRISPR/Cas9 Tekniği ile *MTCH2* Geni Bakımından *Knockout* Edilen Hücrelerin Analiz Edilmesi 69
5.23. Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu 73
5.23.1. Plazmit DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi 73
5.23.2. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri .. 74
5.24. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu 74
5.25. Proteinlerin Western Melezleme Tekniği ile Analizi 75
5.25.1. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması 75
5.25.2. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi 75
5.25.3. Membrana Transfer Edilen Proteinlerin Görüntülenmesi 76
5.26. Hücrelerin İnfluenza A Virüsleri ile Enfeksiyonu 76
5.27.2. Plazmitler ile Transfekte Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin İmmünfloresans Yöntem ile Görüntülenmesi 77

5.28. MTCH2 Proteininin İnfluenza A Virüs RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması 78

5.29. Besiyerine Salınan Belirteç (Reporter) SEAP Enzimi Aktivitesi Ölçümü 80

5.30. İnsan MTCH2 Proteininin İnfluenza Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması 80

5.30.1. *MTCH2* genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun araştırılması 80

5.30.2. siRNA ile transfekte edilen hücrelerde *MTCH2* transkript düzeylerinin saptanması 81

5.30.3. MTCH2 proteinlerindeki artışın influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması 82

5.30.4. MTCH2 proteinin knockout edildiği hücrelerde influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması 83

5.31. Plak testi 84

6. BULGULAR 85

6.1. İnsan MTCH2 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler 86

6.1.1. İnsan MTCH2 proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler 86

6.1.2. Memeli Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Mekanizması ile *MTCH2* Genini Knockout Etmek İçin Özgün Rehber RNA (sgRNA) Dizileri Taşıyan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler 89

6.2. Plazmit ile Transfekte Hücrelerde HA Uzantılı MTCH2 Proteininin Ekspresyonu ile İlgili Veriler 92

6.3. Hücrelerinden Total RNA Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler 93

6.4. cDNA'ların Kontrolü ile İlgili Veriler 95

6.5. CRISPR/Cas9 Mekanizması ile *Knockout* Edilen Hücrelerin Analizi ile İlgili Veriler 96

6.4.1. Dizileme Plazmitlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler 97

6.4.2. pM Plazmitlerine Klonlanan *MTCH2* cDNA'larının Dizilenmesi ile İlgili Veriler 100

6.6. İnfluenza A Virüslerinin Titrasyonu ile İlgili Veriler 103

6.7. Hücrelerde MTCH2 Düzeyinde Meydana Gelen Değişikliklerin İnfluenza A Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile ilgili Veriler..... 104

6.7.1. *Knockdown* Edilen HeLa hücrelerinde Viral Replikasyonun Seyri ile İlgili Veriler 105

6.7.2. HEK293 hücrelerinde Geçici Transfeksiyon ile MTCH2 Protein Düzeyindeki Artışın Viral Replikasyona Etkileri ile İlgili Veriler..... 107

6.7.3. CRISPR/Cas9 Tekniği ile Knockout edilen HEK293 Hücrelerinde Viral Replikasyonun Seyri ile İlgili Veriler..... 108

6.7.4. İnfluenza A Virüsü Mini-Replikon Modeli ile Elde Edilen Veriler..... 109

6.8. Birlikte Sentez Edilen Viral PA ve MTCH2 Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler 110

7. TARTIŞMA VE SONUÇ 112

8. KAYNAKLAR 124

III. KISALTMALAR

°C	:	Santigrat derece
a/h	:	Ağırlık/hacim
APS	:	Amonyum persülfat
CRISPR/Cas	:	Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri/Crispr İlişkili Nükleaz
CrmA	:	Sığır çiçeği virüsü
bç	:	Baz çifti
D'MEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit trifosfat
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
EBV	:	Epstein-Barr virüsü
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	:	Etidyum bromür
FCS	:	Fetal buzağı serumu
FTS	:	Fizyolojik tuzlu su
Gr	:	Gram
g/L	:	Gram/Litre
h/h	:	Hacim/hacim
HA	:	Hemaglutinin
HEK-293	:	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HeLa	:	İnsan servikal kanser hücreleri
IFN	:	Interferon
HCV	:	Hepatit C Virüsü
HIV	:	İnsan immün yetmezlik virüsü
HPV	:	İnsan papillomavirüsü
HRP	:	Yaban Turpu Peroksidazı
kDa	:	Kilo dalton
LB	:	Luria bertani
LBA	:	Luria bertani agar

LiAc/PEG	:	Lityum asetat/polietilen glikol
M	:	Molar
MDCK	:	Madin-Darby köpek böbrek hücreleri
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MTCH2	:	Mitokondriyal Taşıyıcı Homolog 2
NA	:	Nöraminidaz
OD	:	Optik dansite
PA	:	Polimeraz asidik protein
PAGE	:	Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	:	Polietilen glikol
PEI	:	Polietilenimin
PVDF	:	Polivinilidenflorit
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNP	:	Ribonükleoprotein kompleksi
SARS-CoV	:	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
TAE	:	Tris-asetat-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
TEMED	:	Tetrametiletilendiamin
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
w/w	:	Ağırlık/ağırlık
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. İnfluenza A virüslerinde genetik değişikliklere neden olan antijenik sürüklenme (Drift) ve Antijenik kayma (Shift) oluş mekanizmaları. 9
Şekil 2. İnfluenza A virüsünün morfolojik özellikleri. 10
Şekil 3. İnfluenza A virüsü genom segmentlerinin (vRNP) yapısı. 11
Şekil 4. İnfluenza A virüsü yaşam döngüsü. 13
Şekil 5. Negatif polarite gösteren RNA moleküllerinin cRNA (+RNA) şablonu üzerinden sentez edilmesi. 14
Şekil 6. Dışsal ölüm reseptörü sinyal yolu ve viral proteinler tarafından inhibisyonu. 22
Şekil 7. İçsel mitokondriyal sinyal yolu ve viral proteinler tarafından inhibisyonu.. 25
Şekil 8. Granzimler ile tetiklenen apoptoz yolağı. 29
Şekil 9. RNA virüsleri tarafından indüklenen doğuştan gelen bağışıklık ve apoptoz sinyali. 32
Şekil 10. MTCH2 protein modellemesi. 36
Şekil 11. İnsan *MTCH2* genin kromozom üzerindekil lokasyonu.. 37
Şekil 12. tBID yapısı ve etki mekanizması. 37
Şekil 13. MOM-entegre MTCH2 ve MTCH2/tBid komplekslerinin yapısal modelleri. 38
Şekil 14. CRISPR/Cas-III mekanizması. 40
Şekil 15. pCHA-MTCH2 plazmit vektörünün oluşturulması 88
Şekil 16. pCHA-MTCH2 plazmit DNA'sının kontrolü. 89
Şekil 17. Cas9 enzimini kodlayan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü haritası ve BbsI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen bu plazmitin agaroz jel elektroforezi profili.. 90
Şekil 18. MTCH2 gRNA'larını kodlayan dizilerin pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmitinde BbsI enzimi hedef bölgesine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. 91

Şekil 19. pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmitlerin doğruluklarının PZR ile kontrol edilmesi. PZR ile, klonlanan DNA fragmentlerine özgün primerler kullanılarak çoğaltılan DNA'ların agaroz jel elektroforez profilleri. 91
Şekil 20. pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmitlerine klonlanan MTCH2/gRNA kodlayıcı bölgelerin DNA dizi analizi kromatogramları. 92
Şekil 21. pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde insan MTCH2 proteinlerinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyonunun immünfloresan teknik ile belirlenmesi. 93
Şekil 22. Farklı amaçlarla hücrelerden ekstre edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kalitatif analizi 94
Şekil 23. Farklı amaçlarla hazırlanan cDNA'ların PZR ile kontrol edilmesi. 96
Şekil 24. *Knockout* hücre klonlarından hazırlanan cDNA üzerinden PZR ile çoğaltılan ve MTCH2-Rev primeri kullanılarak dizilenen örneklere ait kromatogramlar. 97
Şekil 25. Klon14 ve Klon20 hücrelerine ait cDNA'lar üzeninden fosforillenmiş primerler ile çoğaltılan *MTCH2* geni agaroz jel görüntüsü. 97
Şekil 26. DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere, *knockout* olduğu düşünülen hücre hatlarından elde edilen *MTCH2* cDNA'larının pM plazmitine klonlanması ile elde edilen rekombinant plazmit(lerin) haritası. 98
Şekil 27. Klon 14 ve klon 20 hücrelerinden elde edilen *MTCH2* cDNA'ları klonlanarak elde edilen rekombinant plazmitlerin koloni PZR ile analizi. 99
Şekil 28. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi sonuçları. 99
Şekil 29. Klon 14'e ait *MTCH2* cDNA örneklerinin kromotogram sonuçlarının analizi. 101
Şekil 30. Klon 20'ye ait *MTCH2* cDNA örneklerinin kromotogram sonuçlarının analizi. 103
Şekil 31. İnfluenza A/DkPen ve A/WSN virüslerinin plak testi ile titrasyonu. 104
Şekil 32. *MTCH2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde endojen *MTCH2* transkript düzeyi. 105

Şekil 33. *MTCH2* genine özgü siRNA (*MTCH2* siRNA) ile *knockdown* edilen ve sonrasında İnfluenza A/DkPen veya İnfluenza A/WSN virüsler ile enfekte edilen HeLa hücrelerinde viral RNA moleküllerinin qPZR ile kantitasyonu. 107
Şekil 34. *MTCH2* geni için *knockdown* edilen ve İnfluenza A/DkPen tipi virüs ile enfekte edilen HeLa hücrelerinde viral PA proteinin Western melezleme ile analiz edilmesi. 107
Şekil 35. MTCH2 proteini kodlayan plazmit vektörü ile geçici olarak transfekte edilen ve sonrasında influenza A/DkPen virüsü ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinde viral M1 proteini miktarlarının Western melezleme ile incelenmesi.. 108
Şekil 36. *Knockout* edilen hücre hatlarının influenza A/DkPen ve influenza A/WSN virüsü ile enfeksiyon sonrası virüs M1 protein miktarının Western melezleme tekniği ile analizi. 109
Şekil 37. HEK293 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile miktarı arttırılan MTCH2 proteini proteinlerinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri. 110
Şekil 38. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan MTCH2 proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve MTCH2 proteinlerinin lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. 111

ii. Tablo Listesi

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında yararlanılan birincil ve ikincil antikorlar..... 46
Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan primerler ve nükleotid dizileri. 65
Tablo 3. İnfluenza virüsü minireplikon testlerinde kullanılan, influenza A/WSN ve A/DkPen minireplikonu plazmitleri, diğer plazmitler ve 24-kuyulu plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda her bir kuyucuk için kullanılan plazmit miktarları. 79

1. ÖZET

İnsan MTCH2 Proteininin İnfluenza A Virüsü Replikasyonuna Etkilerinin Moleküler Düzeyde Araştırılması

Öğrenci Adı: Pınar ULUPINAR

Danışman Adı: Prof. Dr. Kadir TURAN

Amaç: İnfluenza A virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan, membranlı virüslerdir. İnsanlarda daha çok mevsimsel grip etkeni olan bu virüslerin pandemilere neden olma potansiyeli yüksektir. İnfluenza A virüslerinin replikasyonu ve transkripsiyonu virus genomunun ilk üç segmenti üzerinden kodlanan PB1, PB2 ve PA proteinlerinin oluşturduğu viral RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Çeşitli hücresel proteinler ile de ilişkili olan bu proteinler, viral patogenez açısından da büyük önem taşırlar. Bu tez çalışmasında da maya ikili hibrit metodu kullanılarak PA proteini ile ilişkisi belirlenen insan MTCH2 proteininin influenza virüsü replikasyonuna etkilerinin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada hücre hattı olarak insan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinden yararlanıldı. Viral replikasyonun izlenmesinde influenza A/WSN/1933/H1N1 ve A/Duck/Pennsylvania/1984/H5N2 virüs tipleri kullanıldı. HEK293 ve/veya HeLa hücrelerinde MTCH2 protein düzeyi, bu proteini kodlayan plazmit DNA ile transfeksiyon, özgün siRNA'lar ile transfeksiyon veya CRISPR/Cas9 tekniği ile *knockout* etme yöntemleri ile değiştirildi. Viral replikasyonun seyri, virüs proteinlerinin Western melezleme ile belirlenmesi ve minireplikon testleri ile izlendi.

Bulgular: Geçici transfeksiyon ile MTCH2 protein düzeyi arttırılan hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun yavaşladığı, MTCH2 geni *knockdown* edilen hücrelerde ise pozitif yönde etkilendiği saptandı. Buna karşın CRISPR/Cas9 tekniği ile MTCH2 geni *knockout* edilen hücrelerde virüs replikasyonunun beklenenin aksine negatif yönde etkilendiği belirlendi.

Sonuç: Maya hücrelerinde İnfluenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösteren insan MTCH2 proteinin, insan orijinli HeLa ve HEK293 hücrelerinde de etkileşim gösterdiği ve virüsü replikasyonu etkileyen önemli bir hücresel faktör olduğu ortaya kondu. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen PA ve MTCH2 proteinlerinin benzer lokalizasyon profilleri göstermesi bu iki proteinin fiziksel etkileşimini destekler nitelikte bulundu.

Anahtar Kelimeler:

İnfluenza A, MTCH2, CRISPR/Cas, viral RNA polimeraz, PA proteini

2. SUMMARY

Investigation of the Effects of Human MTCH2 Protein on Influenza A Virus Replication at Molecular Level

Student Name: Pınar ULUPINAR

Name of Supervisor: PhD. Kadir TURAN

Objective: Influenza A viruses are membrane-bound viruses classified in the *Orthomyxoviridae* family. These viruses, which are mostly seasonal flu agents in humans, have a high potential to cause pandemics. Replication and transcription of influenza A viruses are carried out by the viral RNA polymerase enzyme formed by PB1, PB2 and PA proteins encoded on the first three segments of the virus genome. These proteins, which are also associated with various cellular proteins, are also of great importance in terms of viral pathogenesis. In this thesis, it was aimed to determine the effects of human MTCH2 protein on influenza virus replication at the molecular level, whose relationship with the PA protein was determined by using the yeast two hybrid method.

Materials and Methods: In this study, HEK293 and HeLa cells of human origin were used as cell lines. Influenza A/WSN/1933/H1N1 and A/Duck/Pennsylvania/1984/H5N2 virus types were used to monitor viral replication. The MTCH2 protein level in HEK293 and/or HeLa cells was altered by transfection with plasmid DNA which is encoding the protein, transfection with specific siRNAs, or knockout with the CRISPR/Cas9 technique. The course of viral replication was monitored by Western hybridization of virus proteins and minireplicon tests.

Results: It was determined that influenza virus replication reduced in cells whose MTCH2 protein level was increased by transient transfection, while it was positively affected in cells with MTCH2 gene knockdown. On the other hand, it was determined that virus replication was negatively affected in cells in which the MTCH2 gene was knocked out by the CRISPR/Cas9 technique, contrary to expectations.

Conclusion: It was revealed that human MTCH2 protein, which interacts with the influenza A virus PA protein in yeast cells, also interacts in HeLa and HEK293 cells of human origin and is an important cellular factor affecting virus replication. Similar localization profiles of PA and MTCH2 proteins co-expressed in HeLa cells were found to support the physical interaction of these two proteins.

Key Words:

İnfluenza A, MTCH2, CRISPR/Cas, viral RNA polimerase, PA protein

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfluenza A virüsleri, kuşlarda ve bazı memelilerde gribe neden olan ve *Orthomyxoviridae* virüs ailesinin *Alphainfluenzavirus* cinsi içerisinde sınıflandırılan virüslerdir (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ Erişim Tarihi: 10.03.2022). Bu virüsler negatif polarite gösteren tek iplikli RNA (- ssRNA) moleküllerinden oluşan segmentli bir genoma sahiptir (Duwe, 2017). Virüs genomunun çok parçalı olması (8 adet RNA molekülü) farklı özellikte virüs genomlarının karışmasına (reassortment) imkan vermekte ve büyük antijenik yapı değişiklerinin ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Ma ve ark., 2008). Diğer taraftan viral RNA'ların replikasyon ve transkripsiyonu gerçekleştiren RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (*İng. RNA-dependent RNA polymerase; RdRp*) enzimi hata yapma frekansı yüksek olduğu ve replikasyon sırasında oluşan hataları onarabilme özelliğine sahip olmadığı için genomda sıklıkla nükleotid değişmeleri (nokta mutasyonları) olmaktadır (Couch, 1996). Dolayısıyla influenza A virüsü genomları nukleotid dizileri bakımından karşılaştırıldığında virüsün tipine göre değişen oranlarda farklılıklar görülür. Bu durum İnfluenza A virüslerinin farklı kuş ve memeli türlerinde enfeksiyon yapabilme olanağı sağlar. Viral genomda meydana gelen bu farklılaşmalar özellikle insanlarda gribal enfeksiyonların sürekli tekrarlamasına neden olmaktadır. Gerek insanlarda gerekse çiftlik hayvanlarında neden oldukları hastalıklar nedeniyle büyük can kayıplarına ve büyük ekonomik zararlara neden olan bu virüslere karşı korunmak için uygulanan tedavi yolları yetersiz kalmaktadır. Bu bağlamda moleküler düzeyde virüslerin yapısı ve hücre içi replikasyon mekanizmalarının aydınlatılması viral hastalıklara karşı uygun korunma stratejilerinin geliştirilmesi açısında hayati öneme sahiptir.

İnfluenza A virüslerinin moleküler yapısı diğer birçok RNA virüsü ile karşılaştırıldığında çok daha iyi bilinmektedir. Bu virüslerin konak hücre içerisinde etkileşim halinde olduğu çok sayıda hücresel protein faktör tanımlanmıştır. Bunların önemli bir kısmı interferonlar ve interferonlar ile ilişkili proteinlerdir (Turan ve ark., 2004; Çağlayan ve Turan, 2021). Bu proteinlere ek olarak interferonlar ile ilişkili olmayan çeşitli hücresel faktörlerin de influenza A virüsü replikasyonu pozitif ya da negatif yönde etkilediği bilinmektedir (Şenbaş Akyazi ve ark., 2020; Çağlayan ve Turan, 2021; Pirinçal ve Turan, 2021; Koçmar ve ark., 2022).

Metabolik sistemlerden yoksun olan virüsler, zorunlu olarak yaşamsal faaliyetler bakımından aktif olan konak hücrelere gereksinim duyarlar. Bu nedenle virüs replikasyonu birçok konak proteini ile ilişkilidir. Virüs replikasyonu üzerinde etkili olan konak proteinleri, virüslere karşı etkili stratejilerin geliştirilmesine ışık tutan temel faktörlerdir. Bu bakımdan virüs-konak ilişkisinde etkili proteinlerin ve etki mekanizmalarının saptanması büyük önem taşır. Viral replikasyon konak hücre içerisinde gerçekleştiğinden dolayı, konağın hücre dışı savunma mekanizmaları bir kenara bırakılırsa, virüs-hücre etkileşimi virüsün hücre yüzeyinde bulunan protein/glikoprotein reseptörlere bağlanması ile başlar. İnfluenza A virüslerinde bu olayda iş gören en önemli aktör hemagglutinin (HA) yüzey antijen proteinidir (Cann, 2016a). HA protein sadece virüsün hücre membranında uygun reseptörlere bağlanmasını sağlamaz, aynı zamanda fagosite edilen ve endozom içerisinde hapsolmuş virusün sekiz parçadan oluşan genomunun bu yapıdan kurtulması ve sitoplazmada serbest kalmasını sağlar (Lazarovits ve ark., 1996). İnfluenza A virüsü RNA molekülleri NP proteinleri ile kompleks halindedir. Bu yapıda viral RdRp enzimini oluşturan PB2, PB1 ve PA proteinleri de taşınmaktadır. Viral ribonükleoprotein partikülü (vRNP) olarak adlandırılan bu yapıların hücre sitoplazmasından nükleusa taşınmasında da birçok hücresel faktör devreye girmektedir (Murti ve ark., 1988).

Enfekte hücrelerde, viral RdRp enzimini oluşturan proteinler de replikasyon ve transkripsiyon işlevlerini gerçekleştirmek için bazı hücresel proteinler ile işbirliği yapmak zorundadırlar. Örneğin viral mRNA'ların sentezi için gerekli olan 7-metil guanozin şapka yapısı taşıyan 10-15 nükleotitten oluşan primer yapısını kazanmak için viral RdRp enzimi konak hücre RNA polimeraz enzimi ile etkileşim içerisine girer (Pflug ve ark., 2018). Viral RdRp enzimi alt üniteleri sadece temel işlevleri olan replikasyon ve transkripsyon olayları ile ilgili olarak hücresel proteinler ile etkileşim göstermezler. Bu proteinler aynı zamanda vRNA'lerin hücre içi transportu (Nakajima, 1997), hücre içi savunma mekanizması (Kochs ve ark., 2007) ve hücre apoptozu (Chakrabarti ve Pasricha, 2013) ile ilgili proteinler ile de etkileşim içerisine girebilmektedir. Dolayısıyla virüs replikasyonu açısından önemli olan konak proteinleri, virüslere karşı etkili stratejilerin geliştirilmesine ışık tutan temel

faktörlerdir. Bu bakımdan virüs-konak ilişkisinde etkili proteinlerin ve etki mekanizmalarının saptanması büyük önem taşır.

Bu tez çalışmasında da insan hücrelerinde sentez edilen MTCH2 (İng. Mitochondrial carrier homolog 2 / Mitokondriyal taşıyıcı homolog 2) proteinin İnflueza A virüsü replikasyonuna etkileri moleküler düzeyde araştırılmıştır. Mitokondriyal taşıyıcı protein ailesinin üyeleriyle ilişkili olan 33 kDa ağırlığında MTCH2 çok iyi karakterize edilmiş bir protein değildir (Monné ve Palmieri, 2014). Tez çalışmasında bu proteinin seçilmiş olmasının nedeni, maya ikili-hibrit taramalarında bait (yem) olarak kullanılan İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitesi olan PA proteini ile ilişkisinin saptanmış olmasıdır (Yayınlanmamış veri / TÜBİTAK- 112S518 nolu proje: Prof. Dr. Kadir Turan). MTCH2 proteininin daha önce herhangi bir virüs ile direkt bir ilişkisi bildirilmemiştir. MTCH2'nin mitokondride kesin işlevi belirsizliğini korurken önceki raporlar MTCH2'yi temelde iki biyolojik role bağlamıştır: hücresel metabolizma ve apoptoz (Djajawi ve ark., 2020). Son yıllarda MTCH2 proteinin apoptozla ilişkisi araştırılmaya başlanmış ve özellikle virüse bağlı apoptozda önemli katkısı olduğu bulunmuştur, fakat virüs replikasyonuyla olan ilişkisi araştırılmamıştır. Dolayısla bu tez çalışmasında maya hücrelerinde influenza A virüsü ile ilişkisi saptanan MTCH2 proteinin memeli hücrelerinde İnfluenza A virüsü replikasyonuna etkilerini saptamak, bu proteinin influenza A virüsü patogenezinde ve virüs-konak ilişkisi açısında önemini ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu bağlamda mayalarda viral PA proteini ile ilişkisi saptanan insan MTCH2 proteinin insan orijinli HeLa ve HEK293 hücrelerinde de İnfluenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösterdiği ve viral replikasyon üzerinde etkili bir hücresel faktör olduğu ortaya konmuştur.

4. GENEL BİLGİLER

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesine ait virüslerdir. Bu virüs ailesi yedi cins ve dokuz virüs türünden oluşmaktadır (https://talk.ictvonline.org/taxonomy/ , Erişim tarihi 10.03.2022).

Orthomyxoviridae ailesini oluşturan virüsler:

- ✓ ***Alphainfluenzavirus***: İnfluenza A virüsleri
- ✓ ***Betainfluenzavirus***: İnfluenza B virüsleri
- ✓ ***Deltainfluenzavirus***: İnfluenza D virüsleri
- ✓ ***Gammainfluenzavirus***: İnfluenza C virüsleri
- ✓ ***Isavirus***: Salmon isavirus
- ✓ ***Quaranjavirus***: Johnston Atoll quaranjavirus ve Quaranfil quaranjavirus
- ✓ ***Thogotovirus***: Dhori thogotovirus ve Thogoto thogotovirus

İnfluenza virüs türleri arasında İnfluenza A, İnfluenza B, İnfluenza C ve İnfluenza D virüsleri yer almaktadır. Bu virüslerin tiplendirilmesi matriks proteini (M1) ve nukleoproteinin (NP) antijenik özelliklerine göre yapılır. Bu proteinler türe özgü proteinlerdir ve aynı türe ait M1 ve NP proteinleri antijenik özellik bakımından benzerlik gösterir ve çapraz reaksiyon verirler.

Orthomyxoviridae ailesi içerisinde yer alan virüslerden İnfluenza A virüsleri insan sağlığı açısından en önemli virüslerdir. Bu virüsler ilk kez 1933 yılında Smith ve ark. tarafından izole edilmiştir (Smith ve ark., 1933). İnfluenza A virüsleri sadece insanlarda değil kanatlılar başta olmak üzere, domuz, at, sığır, kuş ve deniz memelilerinde de enfeksiyon yapabilmektedir (Juozapaitis ve Antoniukas, 2007; Pirinçal ve Turan, 2021). Francis ve ark. (Francis, 1940) 1939 yılında antijenik olarak farlılık gösteren, konak yelpazesi sınırlı, insan ve foklarda enfeksiyon yapan İnfluenza B virüsünü tanımladılar. İnfluenza A ve B virüslerinde viral genom sekiz parçalı RNA molekülünden oluşmaktadır. 1956 yılında Taylor ve ark. tarafından izole edilen influenza C virüsü ve çok yakın bir tarihte sığırlardan izole edilen İnfluenza D virüsü yedi parçadan oluşan bir RNA genomu taşırlar (Jlobodzinska, 1972; Flynn ve ark., 2018; Asha ve Kumar, 2019).

İnfluenza virüs türleri arasında, influenza A virüsleri sıklıkla tekrarlayan ve zaman zaman tüm Dünya'yı etkileyen pandemilere neden olabilmektedir. İnfluenza B virüsleri insanlarda mevsimsel grip epidemilerine neden olurken, influenza C virüsleri insan sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmayan asemptomatik veya özellikle çocuklarda görülen orta şiddette hastalığa neden olmaktadır. İnfluenza D virüslerinin ise insanlarda enfeksiyon yapamadıkları bilinmektedir (Matsuzaki ve ark., 2006; Noda, 2012; Huang ve ark., 2014).

4.1 İnfluenza A Virüsü Alt Tipleri

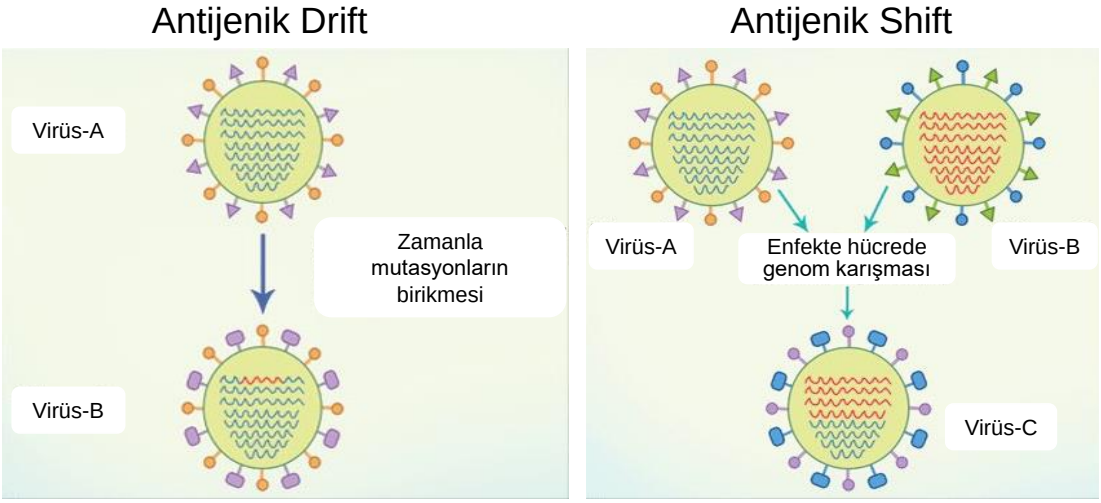
İnfluenza A virüslerinin doğal rezervuarı vahşi su kuşlarıdır. Bununla birlikte insanlar ve diğer birçok memeli türünü de enfekte edebilmektedir (Webster ve ark., 1992). Çok sayıda farklı türe uyum sağlama yeteneği, bu virüs türünün sadece insanlarda enfeksiyon yapan İnfluenza B virüslerinden farklı olarak çok sayıda alt tipinin olmasının temel nedenden biridir.

İnfluenza A virüslerinin membranında yer alan hemaglütinin (HA) ve nöraminidaz (NA) yüzey antijenik proteinleri büyük bir varyasyon gösterir. Bu nedenle İnfluenza A virüsü alt tiplerinin belirlenmesinde HA ve NA proteinlerinin antijenik özellikleri göz önüne alınır (Gamblin ve Skehel, 2010; Katz ve ark., 2014). Bugüne kadar, su kuşlarından izole edilen virüslerde 16 farklı HA (H1-16) alt tipi, 9 farklı NA alt tipi (N1-N9) tanımlanmıştır (Yoon ve ark., 2014). Bunlara ek olarak yakın tarihte yarasalarda iki yeni HA alt tipi HA (H17 ve H18) (Tong ve ark., 2012; Tong ve ark., 2013) ve 2 NA alt tipi (N10 ve N11) (Maruyama ve ark., 2016) daha belirlenmiş, İnfluenza a virüsleri için belirlenen HA alt tipi sayısı 18'e; NA alt tipi sayısı ise 11'e çıkmıştır. Doğada influenza A virüslerinin çok sayıda olası alt tipi bulunmakla birlikte, insanlarda enfeksiyon yapan virüs tipleri sınırlıdır. İnsanlarda dolaşımda olan influenza A virüsü tipleri H1N1, H2N2 ve H3N2 alt tipleridir. Bununla birlikte bu durum farklı influenza A virüsü tiplerinin insanlarda enfeksiyon yapmayacağı anlamına gelmemektedir. Tarihsel süreç içerisinde de bu üç virüs tipi önemli pandemilere neden olmuştur. Bu pandemiler; 1918 ve 2009 A/H1N1, 1957 A/H2N2 ve 1968 A/H3N2 virüsü pandemileridir (Morens ve ark., 2009). Günümüzde daha çok İnfluenza A/H1N1 ve A/H3N2 alt tipleri ve antijenik olarak farklı iki İnfluenza B tipi (B/Victoria ve B/Yamagata) insan popülasyonunda

dolaşımdadır (Rota ve ark., 1990). Bu nedenler influenza aşıları bu virüs tiplerini içerecek şekilde hazırlanmaktadır (Houser ve Subbarao, 2015; Dou ve ark., 2018).

İnfluenza A virüsü alt tiplerinin isimlendirilmesi bazı kurallara uygun olarak yapılmaktadır. Bu isimlendirmede en başta yer alan "A" harfi, virüsün İnfluenza A türü olduğunu, H hemagglutinini, N ise nöraminidaz enziminini göstermektedir. Daha sonra gelen yerleşim alanı adı, virüsün izole edildiği coğrafi bölgeyi ifade etmektedir. Bunu izleyen sayılardan ilki virüsün laboratuvarda verilen izolasyon numarasını, sonraki sayı ise virüsün izole edildiği yılı göstermektedir. En sonda yer alan kısım ise virüsün HA (H1-H18) alt tipini ve NA (N1-N11) alt tipini göstermektedir. Bir örnek üzerinden açıklamak gerekirse, "İnfluenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)" ifadesi A tipi influenza virüsünün Hong Kong orijinli olduğunu, laboratuvar numarasının 8, ilk izole edildiği tarihin 1968, ve yüzey antijen proteinleri alt tiplerinin H3 ve N2 olduğunu göstermektedir (http://www.izmirtabip.org.tr/userfiles/grip_brosur.pdf , Erişim tarihi: 22.03.2022).

İnfluenza A virüsü tarafından kodlanan proteinlerdeki küçük değişiklikler (antijenik sürüklenme, antijenik drift), viral genomda neydana gelen nükleotid değişimlerinden (mutasyonlar) kaynaklanır (Şekil 1). Virüs RdRp enziminin replikasyon sırasında hata yapma frekansı yüksektir ve bu hataları hata düzeltme (*ing. proof reading*) aktivitesi yoktur (Cheung ve ark., 2015). Buna bağlı olarak özellikle HA ve NA yüzey antijenlerinde amino asit farklılaşmaları meydana gelir. Bu durum influenza virüslerinin konak bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını ve nötralizasyonunu (enfektivitenin ortadan kaldırılmasını) güçleştirir ve virüse karşı daha önceden edinilmiş olan bağışıklığın yetersiz kalmasına neden olur. Antijenik sürüklenme, antijen ve aşılama ile üretilen antikorlar arasındaki orijinal bağı veya enfeksiyonun neden olduğu bağışıklık sistemini zayıflatarak influenza salgınlarının tekrarlamasına sebebiyet verir (Dou ve ark., 2018). İnfluenza A virüslerinde küçük antijenik değişmelere ek olarak, özellikle viral genomun çok parçalı olması nedeniyle antijenik kayma (antijenik shift) olarak isimlendirilen büyük genom farklılaşmaları da gerçekleşmektedir. Antijenik kayma, en az iki farklı İnfluenza A virüsü alt tipine ait genom segmenterinin karışması sonucunda yeni bir İnfluenza A virüsü alt tipinin ortaya çıkmasını ifade eder (Şekil 1).

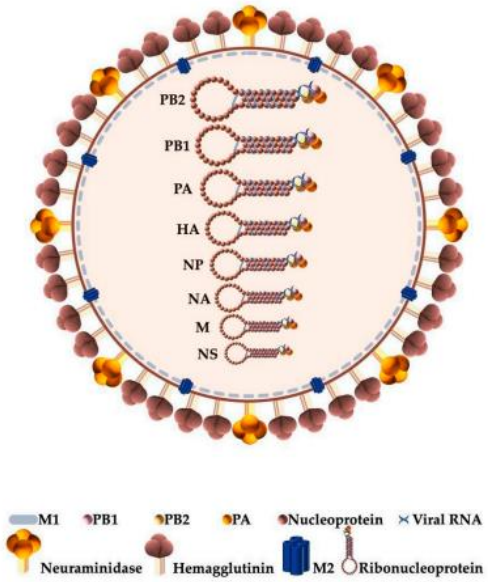


Şekil 1. İnfluenza A virüslerinde genetik değişikliklere neden olan antijenik sürüklenme (Drift) ve Antijenik kayma (Shift) oluş mekanizmaları (https://healthhearty.com/antigenic-drift-vs-antigenic-shift 'ten değiştirilerek kullanılmıştır, Erişim tarihi 24.03.2022).

Bu durum, bilinmeyen patojene karşı bağışıklık eksikliğinden dolayı nüfusun çoğunluğunu enfekte edebilen yeni bir virüs oluşturarak yüksek enfeksiyon oranlarına ve pandemik yayılmalara yol açabilir. Spesifik yapı, birden fazla virüs aynı hücreyi birlikte enfekte ettiğinde viral RNA ların karışmasına (reassortment) imkân verir (Dou ve ark., 2018).

4.2.İnfluenza A Virüslerinin Morfolojisi ve Moleküler Yapısı

İnfluenza A virüsleri, ortalama 100-120 nm çapında çoğunlukla küresel yapıda membranlı virüslerdir. Bununla birlikte ortam koşullarına göre 1 µm uzunluğa varabilen filamentoz yapıda olabilirler (Calder Lesley ve ark., 2010). Yapılan bazı çalışmalarda virüs morfolojisindeki bu değişmelerin membran için destek görevi gören M1 proteinin bir fonksiyonu olduğu belirtilmiştir (Roberts ve ark., 1998; Bourmakina ve García-Sastre, 2003). Konak hücrelerden türemiş olan membran üzerinde viral genler tarafından kodlanan HA, NA ve iyon kanalı proteinleri (M2) bulunmaktadır (Lamb ve Krug, 2001) (Şekil 1). Viryonda en çok bulunan M1 proteini, membranın altında bir tabaka oluşturacak şekilde yer alır ve viryon morfolojisini belirleyen temel bileşendir (Noda ve ark., 2006).

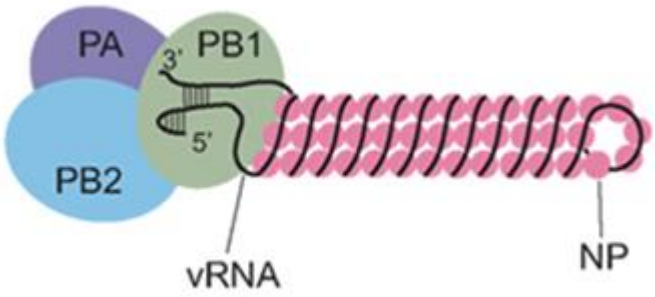


Şekil 2. İnfluenza A virüsünün morfolojik özellikleri (Rosário-Ferreira ve ark., 2020).

Son çalışmalar, viral membranın sadece viral proteinleri değil aynı zamanda konak organizmaya ait membran proteinlerini de içerdiğini göstermiştir (Shaw ve ark., 2008; Hutchinson ve ark., 2014). Bu proteinler muhtemelen hücre tipleri arasında farklılık gösterebilen hücre membranının tomurcuklanma bölgesindeki lipit bileşimine dayalı olarak toplanırlar (Gerl ve ark., 2012; Ivanova ve ark., 2015).

İnfluenza virüsleri genom yapısı olarak negatif polarite gösteren, yani direkt olarak translasyona katılamayan tek iplikli RNA virüsleridir. Virüs RNA genomu tek parçalı değildir. İnfluenza A tipi virüslerde viral genom 8 parçadan oluşur. Virüs RNA'ları yukarıda da belirtildiği gibi nükleoproteinler (NP) ile ribonükleoprotein partikülleri (vRNP) halinde bulunur. İnfluenza virüsleri membranlı virüslerdir, vRNP'ler bir membran ile çevrelenmiş haldedir. İnfluenza A virüslerinde sekiz parçalı genom üzerinden en az 11 protein kodlanmaktadır. Bunlar: polimeraz bazik protein 2 (PB2), polimeraz bazik protein 1 (PB1) ve polimeraz bazik protein 1 – F2 (PB1-F2), polimeraz asidik protein (PA), nükleoprotein (NP) hemagglutinin (HA), nöraminidaz (NA), matriks 1 (M1), matriks 2 (M2), yapısal olmayan protein 1 (NSP1) ve yapısal olmayan protein 2'dir (NS2, nükleer eksport proteini/NEP olarak da bilinir) (Fields, 2007). HA, NA ve M2 proteinleri virüs membranında yer alan

transmembran proteinleridir. Çift tabakalı lipid yapısına sahip olan virüs membranı konağın plazma zarından türetilmiştir ve hem kolesterol açısından zenginleştirilmiş lipit salları hem de sal olmayan lipitleri içerdiği bilinmektedir (Scheiffele ve ark., 1999; Zhang ve ark., 2000). HA proteini yaklaşık yüzde %80 ile en bol bulunan membran proteinidir. NA enziminin membran proteinleri içerisindeki oranı yaklaşık %17 cıvarındadır. Her bir viryonda membran üzerinde ortalama 16- 20 M2 kanal proteini bulunaktadır. HA ve NA sadece viral lipid membrandaki lipid yığınları ile ilişkiliyken, M2 ilişkili değildir (Schroeder ve ark., 2005). M1 proteinleri viral membranın hemen tek tabaka halinde lokalize olmuş proteinlerdir ve vRNP'leri bir arada tutar. Bu vRNP'ler çok sayıda NP ve çok az miktarda NEP ile kompleks oluşturan negatif polaritede tek iplikli RNA'lardan oluşur. Viral RNA polimeraz kompleksini oluşturan PB1, PB2 ve PA proteinleri korunmuş yarı tamamlayıcı 5'- ve 3'- uçlar (Plotch ve ark., 1979) arasındaki baz eşleşmesinden kaynaklanan sarmal bir saç tokasında vRNA'lar bağlı olarak taşınır (Nayak ve ark., 2004; Fields, 2007; Samji, 2009) (Şekil 3).



Şekil 3. İnfluenza A virüsü genom segmentlerinin (vRNP) yapısı (Dou ve ark., 2018)'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.3.İnfluenza A Virüslerinin Yaşam Döngüsü

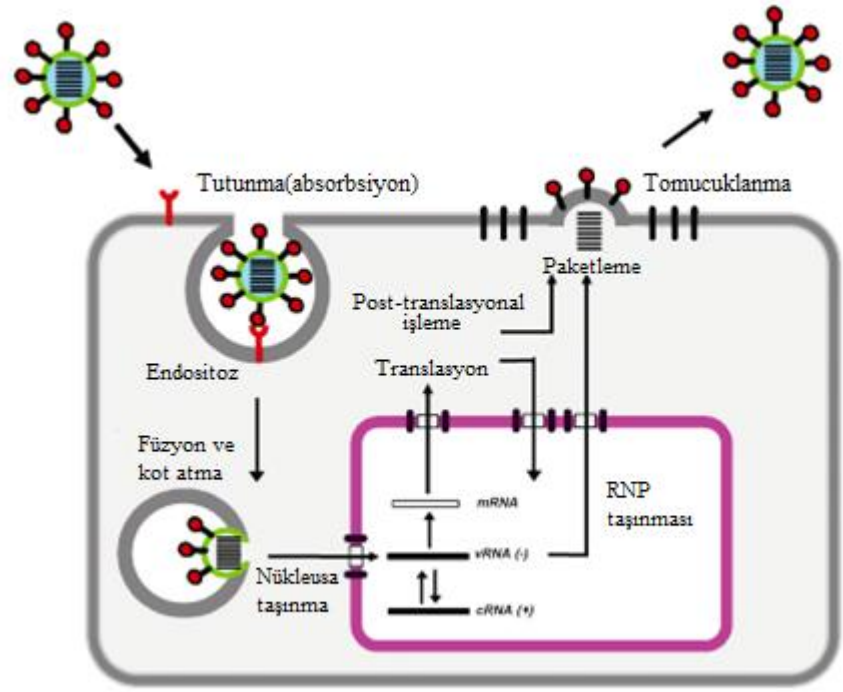
Virüslerin yaşam döngüleri, virüsün membranlı olup olmaması gibi yapısal özelliklerine, genom yapılarına ve sahip oldukları enzimlere göre bazı farklılık göstermekle birlikte; konak hücrelere tutunma (adsorbsiyon), hücreye giriş

(penetrasyon), kot atma, replikasyon/transkripsiyon, kurulma ve serbestleşme olaylarını kapsar.

İnfluenza A virüsleri membranlı virüslerdir ve tek iplikli RNA moleküllerinde oluşan parçalı genom yapısına sahiptirler. Konak hücrelere tutunmaları virüs membranında yer alan HA proteinleri vasıtasıyla gerçekleşir. Bu protein lipid membran üzerinde homotrimerik formda bulunur. Virüslerin hücrelere tutunması yapı ve özgünlük bakımından farklılık gösteren reseptörler aracılığıyla olur. İnfluenza a virüsü HA konakçı hücre membranınıda bulunan glikoproteinlerin sialik asit bakiyelerine bağlanır (Skehel ve Wiley, 2000). HA protein enfekte hücrelerde tek bir polipeptid (HA0) olarak sentez edilmekle birlikte hücresel proteaz enzimleri ile belirli bir noktadan kesilerek iki alt birim halinde (HA1 ve HA2) bir arada bulunur. Bunlardan HA1 alt birimi reseptör bağlama bölgesine sahipken ve HA2 alt birimi penetrasyon olayında füzyon peptidi olarak işlev görür. Bu alt birimler, disülfid bağları ile birbirine bağlı haldedir (Huang ve ark., 2003). Glikoproteinlerde bulunan sialik asit bakiyeleri protein molekülüne faklı kimyasal bağlar ile bağlanabilirler. Bu kimyasal bağlanma şekilleri daha çok α 2,3-glikozid bağı ve α 2,6-glikozid bağıdır. Konak hücre membranlarında yer alan glikoproteinlerdeki sialik asit bakiyelerinin bağlanma şekilleri HA moleküllerinin özgünlüğü, dolayısıyla virüsün konak tercihi bakımından son derece önemlidir. İnsanlarda enfeksiyon yapan dolaşımda olan İnfluenza A virüsleri α 2-6 glikozid bağları ile bağlı sialik asit bakiyelerini tercih ederler. Buna karşın kuşlarda ve atlarda enfeksiyon yapan virüs tiplerine ait HA proteinlerinin α 2-3 glikozid bağları ile bağlı sisalik asit bakiyelerine affiniteleri yüksektir (Skehel ve Wiley, 2000). İnfluenza A virüslerine oldukça duyarlı bir tür olan domuzlarda solunum yolu epitel hücreleri söz konusu her iki tip glikozidik bağlı sialik asit bakiyeleri taşırlar. Bu nedenle hem insan hem de kuş tipi İnfluenza A virüslerine karşı hassastırlar. Bu özellik, domuzları kuş ve insan tipi influenza A virüsü genomlarının karışması (reassortment) için ideal bir konak organizma haline getirmektedir. Bunu sonucunda da insanlar için tehlikeli patojenik İnfluenza A virüsleri ortaya çıkabilmektedir.

Virüs partikülünün konak hücrede sialik asit bakiyelerine bağlanması reseptör aracılı endositoz mekanizmasını tetikler ve virüsün endozom içerisinde hücreye alınmasını sağlar. Endozom, viral ve endozomal membranların kaynaşmasını

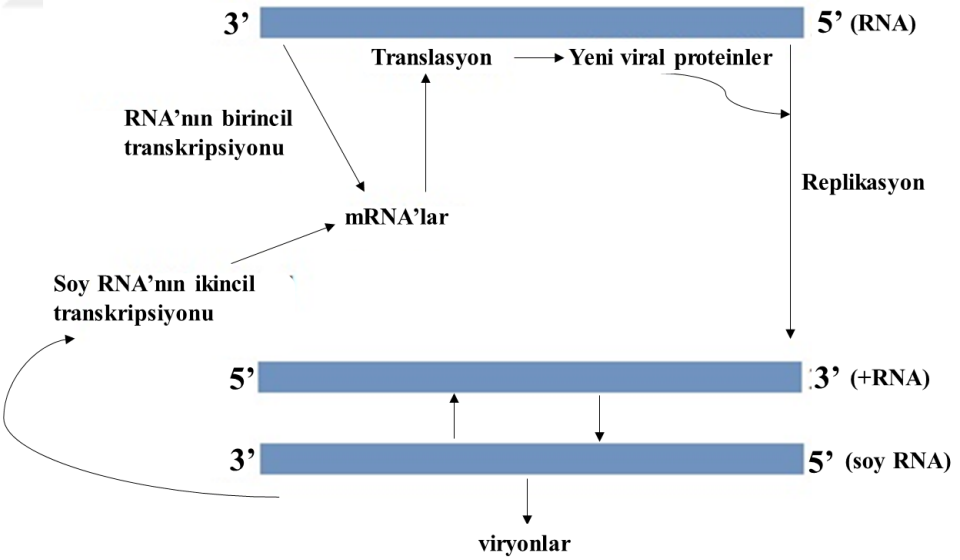
sağlayan düşük düzeyde pH'a (pH. 5-6) sahiptir. Düşük pH değeri, HA proteinlerinde konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve HA2 füzyon peptidini işlevsel hale getirir. Bu füzyon peptidi, viral ve endozomal membranların kaynaşmasını sağlar. Endozomun asidik ortamı sadece HA proteinindeki konformasyonel değişimini tetikleyerek membranların kaynaşmasına neden olmaz, aynı zamanda M2 iyon kanalını da açar. M2, proton seçici iyon kanalı gibi davranarak bir kanal oluşturan transmembran proteindir (Holsinger ve Lamb, 1991; Pinto ve ark., 1992). M2 iyon kanallarının açılması virüs partikülü iç ortamını da asitleştirir. Viryondaki bu asidik ortam, vRNP ve M1 proteinleri arasındaki etkileşimi zayıflatır ve vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasına yol açar (Pinto ve Lamb, 2006) (Şekil 4).



Şekil 4. İnfluenza A virüsü yaşam döngüsü (Pleschka ve ark., 2009)'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

İnfluenza virüslerinin transkripsiyonu ve replikasyonu hücre nükleusunda meydana gelir. Bu nedenle diğer birçok RNA virüsünün aksine sitoplazmada serbest kalan vRNP'ler nükleusa taşınırlar. vRNP'yi oluşturan NP, PB2, PB1 ve PA proteinleri tümü nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) taşırlar. Bu sinyaller sayesinde, nükleus ve sitoplazma arasında madde geçişini sağlayan nukleer por kompleksleri (NPC) ve

çeşitli karyoferinler aracılığıyla vRNA'lerın taşınma işlemi gerçekleşir. Nükleusa taşınması gereken moleküller, importinler (karyoferinler olarak da adlandırılır) tarafından taşınır (Imamoto ve ark., 1995). İki tür importin tanımlanmıştır ve her ikisi de importin süper ailesinin bir parçasıdır. İmportin proteinleri, taşınacak kargo proteinler üzerindeki NLS'leri tanır (Weis ve ark., 1995). Kargo importin tarafından bağlandığında, kompleks, daha sonra NPC'nin fibrillerine bağlanan ve gerçek translokasyondan sorumlu olan importin tarafından tanınır ve bağlanır (Bayliss ve ark., 2000). Bu mekanizma İnfluenza A virüsü vRNP'leri için de geçerlidir. İnfluenza A virüsu genomu, tek iplikli ve negatif polarite gösterdiği için, viral RNA'ların (vRNA) sentez edilebilmesi için şablon görevi görecek pozitif polarite gösteren bir RNA'ya (cRNA) gereksinim vardır (Şekil 5). Viral genomun replikasyonunda bir primere gereksinin duyulmaz; viral RNA'ya bağlı RNA polimeraz (RdRp) enzimi, viral RNA üzerinde içsel olarak RNA sentezini başlatır. Viral genom replikasyonunun mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, çok sayıda di-nükleotid baz çiftinin oluştuğu bilinmektedir (Azzeh ve ark., 2001; Crow ve ark., 2004; Deng ve ark., 2006).



Şekil 5. Negatif polarite gösteren RNA moleküllerinin cRNA (+RNA) şablonu üzerinden sentez edilmesi (Cann, 2016b) değiştirilerek kullanılmıştır).

İnfluenza A virüsünün sadece 11 protein kodladığı düşünüldüğünde, konak hücrenin mekanizmasını kendi replikasyonu için kanalize edecek karmaşık fonksiyonlar geliştirmiş olması gerekmektedir. İnfluenza A virüsleri viral mRNA'ların sentezi (transkripsiyon) için konak transkripsiyon mekanizmasından yararlanan benzersiz bir fonksiyon geliştirmiştir. Yeni sentez edilmekte olan hücresel mRNA'ların 5' metillenmiş şapka yapısı viral mRNA'ların sentezinde primer olarak kullanılmaktadır. vRNP'lerin 5' şapka yapıları olmadığı bilinmektedir (Krug ve ark., 1976; Plotch ve ark., 1978). Bu problem üzerine çok sayıda çalışma yapıldı ve kısa süre sonra viral mRNA'ların 5' ucu metillenmiş şapka yapısının aslında hücresel mRNA'lara ait olduğu belirlendi. Bu olay, "şapka kapma" (*İng. cap*-snatching) olarak tanımlanmaktadır (Bouloy ve ark., 1979). Viral RdRp, üç viral proteinden oluşur: PB1, PB2 ve PA. PB2 ve PA alt üniteleri *cap-snatching* olayında da işlev görürüler. PA proteini endonükleaz aktivitesine sahiptir (Shirayama ve ark., 2016). PB2 proteini hücresel mRNA'ların 5'-metillenmiş şapka yapısına bağlanır ve mRNA'ların 10 ila 15 nükleotidini 5'-şapka yapısı ile birlikte kesilmesi olayına katılır. Hücresel 5'-şapka yapısı taşıyan RNA parçası, viral RdRp enzimi tarafından viral mRNA'ların sentez edilmesinde kullanılır (Li ve ark., 2001). Hücresel RNA Polimeraz II (Pol II) DNA'ya bağlanır ve transkripsiyona başlar. Transkripsiyonun başlatılması sırasında, Pol II'nin C-terminal tekrar bölgesinde (C-terminal domain / CTD) bulunan serin bakiyeleri fosforile edilir ve hücresel mRNA 5'-şapka yapısını sentez edecek protein kompleksinin aktivasyonu sağlanır. İnfluenza RdRp enziminin hücresel Pol II'nin bu formuna tercihli olarak bağlandığı gösterilmiştir. Bu veri *cap-snatching* olayının bu aşamada gerçekleşebileceğini gösterir (Engelhardt ve ark., 2005).

Viral RNA genomunun en küçük parçaları olan segment 7 ve segment 8 üzerinden ikişer protein kodlanır. Segment 7 üzerinden matriks proteinleri M1 ve M2 sentez edilir. Segment 8 üzerinden ise yapısal olmayan proteinler NS1 ve NS2 (NEP) proteinleri sentez edilmektedir. M2 ve NS1 proteinleri RNA segmentleri üzerinden kodlanan mRNA'ların alternatif işlenmesi (splicing) sonucunda oluşan mRNA'lar üzerinden sentez edilemekte ve miktar olarak aynı segment üzerinden sentez edilen M2 ve NS1'den çok daha düşük miktarda bulunur (Amorim ve Digard, 2006). Virüse ait bu mRNA'ların işlenmesinde hücresel RNA işleme mekanizmaları işlev görür

(Engelhardt ve Fodor, 2006). İnfluenza A virüsleri hücresel RNA işleme makinesine ihtiyaç duymalarına rağmen, konak hücre mRNA'larını işlenme mekanizmaları üzerinde negatif yönde etki yapar. Viral NS1 proteini, U6 küçük nükleer RNA'lara (snRNA'lar) (Lu ve ark., 1994) ve diğer RNA işleme bileşenlerine bağlanarak onların enfekte olmuş hücrelerin çekirdeğine kanalize olmasına neden olur (Fortes ve ark., 1995). Bu durum, hücresel mRNA'ların işlenmesi üzerinde negatif etki yaratır. Ayrıca, NS1 bağlayıcı protein (NS1-BP) adı verilen yeni bir proteine bağlanarak, enfekte hücrelerde çekirdeğe yeniden yerleşmesine neden olduğu gösterilmiştir. NS1-BP'nin işlevi bilinmemektedir, ancak RNA işleme kompleksinin (*spliceosome*) oluşumunu sağlayan SC35 faktörü ile hücre içerisinde birlikte lokalizasyonu göz önüne alındığında, bu proteinin RNA moleküllerinin işlenmesi olayına katıldığı tahmin edilmektedir (Wolff ve ark., 1998). Viral mRNA'ların 3'-poliadenilasyon mekanizması sıra dışıdır. Hücresel mRNA'larda bu olay, poliadenilasyon sinyalinin (AAUAAA) varlığına bağlı olarak, kesme ve poliadenilasyon özgünlük faktörü (*İng. cleavage and* polyadenylation *specificity factor / CPSF*) ile kesme işlemi ve ardından 3'-uca bir poli(A) kuyruğunun eklenmesi ile gerçekleşir. Viral mRNA'lar poliadenilasyon sinyali içermez; bunun yerine viral RdRp enzimi, kalıp viral RNA'nın 5' ucuna bağlı kalır ve viral RNA sentezinin sonunda sterik blokajla sonuçlanır (Hagen ve ark., 1994). Her viral RNA segmentinde, 5' ucundan itibaren yaklaşık 17 nükleotid içeride 5-6 U nukleotidi bulunur ve bu dizi viral mRNA'lar için poliadenilasyon sinyali görevi görür (Robertson ve ark., 1981). Poliadenilasyon viral RdRp enzimi tarafından gerçekleştirilir. Urasil bakiyelerinin bulunduğu bölgenin RdRp enzimini yavaşlaması ve ileri geri hareket etmesine neden olmasının poliadenilasyon kuyruğunun oluşumuna yol açtığı ileri sürülmektedir (Poon ve ark., 2000). Dolayısıyla viral mRNA'ların poliadenilasyonu hücresel mRNA'ların poliadenilasyonundan farklılık gösterir. Daha önce de belirtildiği gibi NS1 proteini hücresel mRNA'ların poliadenilasyon sinyal bölgesinde kesim işlemini önleyerek hücresel mRNA'ların nükleer taşınmasını inhibe eder (Shimizu ve ark., 1999). Bunu, poli(A) kuyruğunu kesilmiş mRNA'lara eklemek için poli(A) polimerazın uyarılmasında rol oynayan CPSF'ye (Nemeroff ve ark., 1998) ve poli(A) bağlayıcı protein II'ye (PABPII) bağlanarak yapar (Chen ve ark., 1999).

Enfeksiyonun geç evresinde, yeni sentezlenen vRNP'ler nükleustan sitoplazmaya taşınırlar. NS1 proteini, virüs bulaşmış hücrede düzenleyici bir faktör olarak işlev görür. NA, M2 ve HA proteinleri, Golgi kompleksi ve trans Golgi ağı yoluyla rER'den ekzositotik taşıma yolunu takip eder. Olgun HA ve NA glikoproteinleri ve glikosillenmiş M2 proteinleri, sırasıyla trimerler (HA) ve tetramerler (NA, M2) formda plazma membranına entegre edilir. M1 proteinleri ise hücre zarında yamalar halinde toplanır. Bu proteinin glikoproteinler (HA ve NA) ile ilişkili olduğu ve replikasyon döngüsünün geç fazında vRNP'lerin plazma membranına tutunmasında rol aldığı düşünülmektedir.

İnfluenza A virüsleri membranlı virüsler olduğu için kurulma konak hücre membranında gerçekleşir. Bu şekilde komşu hücrelere bulaşmaya devam eden viral partikülleri oluşur. Kurulma aşamasında hiç vRNA içermeyen ya da eksik vRNP içeren virüs partikülleri oluşması mümkündür. Bununla birlikte normalde viral membranda bulunan tüm viral proteinler, yani HA, NA ve M2 proteinlerinin ve M1 proteininin bir viral partikül oluşturmak için bulunması gereklidir. Virüs partikülleri polarize olmuş hücrelerin apikal tarafından tomurcuklanır (Cann, 2016a). Bu nedenle HA, NA ve M2 apikal plazma membranına taşınır. Membranın altında bulunan M1 proteini, viral partikülün kapanması ve tomurcuklanmasının son aşamasında önemlidir (Burleigh ve ark., 2005). Virüslerin plazma membranlarından tomurcuklanmasında birkaç hücresel faktör rol oynar. Viral genom segmentlerinin bir araya gelerek viryonlarda paketlenmesini açıklamak için ileri sürülen iki hipotetik model bulunmaktadır. Bulardan biri rastgele paketleme modeli (Enami ve ark., 1991; Bancroft ve Parslow, 2002) diğer ise spesifik paketleme modelidir (Smith ve Hay, 1982). İlki, viral genomik segmentlerin rastgele virionlar halinde paketlendiğini öngörür; oysa ikincisi, viral segmentlerde hangi segmentlerin virionlara paketleneceğini belirleyen sinyaller olduğunu ileri sürer. Paketleme sinyalleri, viral segmentlerin bazılarının (Fujii ve ark., 2005) kodlayan ve kodlamayan 5' ve 3' bölgelerinde tanımlanmıştır, bu nedenle spesifik paketleme modeline yönelmiştir.

Hücre membranında yeni oluşan virüs partikülünün plazma zarından ayrılması için gerçekleşmesi gereken en önemli olaylardan biri, glikoproteinlerde ve glikolipidlerde bulunan ve viryonun serbestleşmesini zorlaştıran sialik asit bakiyelerinin kesilmesidir. Virüs membranında bulunun NA enzimi sialik asit

bakiyelerini keser ve virüs partikülün plazma zarından ayrılmasını sağlar (Palese ve ark., 1974). Bu şekilde konak hücre membranından tomurcuklanma ile ayrılan virüs partikülü bir hücredeki yaşam döngüsünü tamamlamış olur (Samji, 2009).

4.4.İnfluenza A Virüslerinin Epidemiyolojisi

İnfluenza enfeksiyonunun tarihçesi oldukça eski olup, ilk kez MÖ 412'de Hipokrat tarafından tanımlandığı, birçok tarihçi tarafından ilk influenza pandemisinin 1510 yılında görüldüğü belirtilmektedir (Morens ve ark., 2010; Uyeki, 2017). O zamandan bu yana dünya genelinde 30 civarında olası influenza pandemisi bildirilmiştir. Bunlardan üçü geçen yüzyılda gerçekleşmistir. Bilinen en büyük pandemi 1918 ve 1919 yıllarında görülen İspanyol gribi diye anılan ve çok sayıda kişinin ölümüne yol açan İnfluenza pandemisidir. Bu pandemi sırasında ortaya çıkan influenza A virüsündeki hemaglutinin (H1) ve nöraminidaz (N1)'ın her ikisinde de antijenik shift gözlenmiştir. Bu pandemi sırasında değişik kaynaklarda farklı sayılar belirtilmekte olup, 30-50 milyon civarı kişinin yaşamını yitirdiği bildirilmektedir. Sonraki yıllarda 1957, 1968 ve 1977 yıllarında da İnfluenza pandemileri yaşanmıştır. Bunlardan 1957 yılında influenza virsnün H2 ve N2 genlerinde ortaya çıkan antijenik kaymalar büyük bir pandemiye neden olurken, 1968 yılında sadece hemaglutininde meydana gelen değişiklik daha hafif bir pandemiye neden olmuştur. Asya Gribi olarak adlandırılan 1957 pandemisi ve Hong Kong Gribi olarak adlandırılan 1968 yılı pandemilerinde yaklaşık 1.5 milyon insan hayatını kaybetmiş, yaklaşık 32 milyar dolar ekonomik kayba neden olmuştur. Daha sonra 1977 yılında yaşanan pandemide H1N1 antijenik değişimi olmuş ve özellikle daha önce H1N1 virüsü ile hiç karşılaşmamış olan genç kişiler bu salgından etkilenmiştir (Masurel ve Marine, 1973; Taubenberger ve ark., 1997). Bu tarihten sonra İnfluenza A/H1N1 ve A/H3N2 alt tipleri, İnfluenza B virüsleri ile birlikte aynı zamanda insan popülasyonlarında yayılmaya başlamışlardır. Daha sonra 2009 yılının mart ayında insan, domuz ve kuş influenza virüslerinin karışımından oluşan yeni bir influenza virüsü ile yeni bir pandemi (domuz gribi) ortaya çıkmış ve o tarihten sonra pandemik H1N1 virüsü de insanlarda enfeksiyonlara neden olmuştur. Daha sonraki yıllarda da 2011 yılından itibaren İnfluenza A/H3N2 varyantı (domuz kaynaklı H3N2 influenza A virüsü ile 2009 yılındaki pandemik H1N1 virüsünün birleşmesiyle oluşan yeni bir virüs)

salgınlara neden olmuştur. Bu virüsün özelliği, diğer domuz kaynaklı influenza virüsleri ile karşılaştırıldığında insanlar arasında yayılma olasılığının daha yüksek oluşu olmakla birlikte, pratikte bu virüsle insanlar arası geçiş gözlenmemiş olması sevindiricidir. Bu virüsle enfekte olan hemen hemen tüm olgularda domuzla doğrudan ya da dolaylı temas öyküsü olması nedeniyle ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (*İng. Centers for Disease Control and Prevention* / CDC) H3N2v influenza virüsünden korunmada domuzla temastan önce ve sonra akar su ve sabunla el yıkamayı, hayvanların bulunduğu alanlarda yiyip içmeden kaçınmayı ve bu hayvanlarla temastan kaçınmayı, bunlara ek olarak özellikle risk grubundaki kişilerin domuzlarla ve domuz barınakları ile temastan kaçınmasını önermektedir (https://www.cdc.gov/flu/swineflu/variant/h3n2v-cases.html , Erişim tarihi: 22.03.2022). Yakın bir geçmişte (2013 yılında) yeni bir kuş gribi etkeni olan İnfluenza A/H7N9 virüsüne bağlı ilk insan olguları tanımlanmıştır. Bunun ardından yine 2013 yılında Çin'de insanda ilk kez İnfluenza A /H10N8 olgusu bildirilmiş ve 73 yaşındaki bir kisi yaşamını yitirmiştir. İnfluenza A/H10N8, 1965 yılından beri kanatlılarda gözlenen bir virüs olup, bu hayvanlar için patojenitesi düşük olarak bildirilen bir İnfluenza A virüsü alt tipidir (http://www.wpro.who.int/china/mediacentre/factsheets/influenza/en/ , Erişim tarihi: 22.03.2022; http://www.izmirtabip.org.tr/userfiles/grip_brosur.pdf , Erişim tarihi: 22.03.2022).

Herhangi bir virüs enfeksiyonunun nihai sonucu, iki süreç arasındaki dengeye bağlıdır. Virüsün ortadan kaldırılmasına bağışıklık sistemi aracılık eder. Bununla birlikte virüs, antijenik bileşimini değiştirerek (mümkün olduğunda) bağışıklık sisteminin baskısından korunmayı hedefler. Bu olayların klasik örneği, virüsün antijenik yapısını değiştirmesine izin veren ve yukarıda bahsedilen iki genetik mekanizmadır (antijenik drift ve antijenik shift). Viral enfeksiyonun seyrini belirleyen etkenlerden biri de virüsün konak organizmada kalma yeteneğidir. Virüslerin uzun süreli kalıcılığı iki ana mekanizmadan kaynaklanır. Birincisi, litik potansiyelin düzenlenmesidir. Burada izlenen strateji, kritik sayıda virüsle enfekte olmuş hücrenin hayatta kalmasını sağlamaktır (yani, konakçı organizmayı öldürmeden enfeksiyonu sürdürmeye yetecek kadar). Virüs gen ekspresyonunu ve dolayısıyla hücre hasarını kısıtlayan mekanizmalar geliştirmek gereklidir. Kalıcılığın

ikinci yönü, bağışıklık sisteminden kaçınmaktır. En azından bir süre için konak hücrenin apoptoz mekanizmasını bozmak, viral replikasyon, temel viral proteinlerin sentezi, virüs kurulumu ve yeni konak hücrelerde yayılmasını sağlamak için çok önemli bir stratejidir. Bu nedenle birçok virüs, bir kez enfekte olmuş hücrelerde, virüs üreme fazı sırasında apoptoz indüksiyonunu bloke eden ve apoptoz inhibe eden proteinler kodlar. Öte yandan, (i) virüslerin serbestleşmesi ve dolayısıyla yayılmayı kolaylaştırmak, (ii) enfekte olmuş hücrelerin bağışıklık sistemine viral antijenleri sunmasını önlemek veya (iii) enfekte olmayan hücreleri ve bağışıklık sistemi hücrelerini öldürmek için apoptozu uyarma mekanizmaları, viral enfeksiyonun seyri açısından önemlidir. Dolayısıyla, enfekte olmuş bir konak hücrenin apoptoz yolağına girip girmemesi, virüs tipine ve patojenitesine, hücrelerin antiviral tepkilerine karşı koyma ve/veya bağışıklık hücrelerinden herhangi bir saldırıdan kaçınma kapasitesine bağlıdır. Bu nedenle viral genomlar, virüsün yaşam döngüsü boyunca apoptozu indükleme veya inhibe etme ihtiyacını karşılayacak şekilde evrimleşmiştir (Cann, 2016a).

4.5.Apoptoz ve Nekroz

Apoptoz veya "programlanmış hücre ölümü", gelişim sırasında dokuların yeniden şekillenmesinde ve bağışıklık sistemi tarafından hücre öldürülmesinde rol oynayan kritik bir mekanizmadır. Bir hücrenin ölmesinin iki yolu vardır. Bunlar nekroz ve apoptoz mekanizmalarıdır. Nekroz, hücrelerin toksinlerin veya çevresel stresin neden olduğu yaralanmaya normal tepkisidir. Nekroz, plazma zarının ve nükleer zarfın bozulması, mitokondri ve lizozomlar gibi zarla çevrili organellerin yırtılması, hücre şişmesi, DNA/RNA'nın rastgele parçalanması, hücre içine kalsiyum iyonlarının girişi ve hücre zarının kaybı gibi spesifik olmayan değişikliklerle kendini gösterir. Ölmekte olan hücreden, hücresel bileşenlerin salınması, bağışıklık sisteminin hücreleri tarafından lokalize bir inflamatuar yanıta neden olur. Bu genellikle komşu hücrelere/dokuya zarar verir. Apoptoz, nekrozun aksine, karmaşık moleküler mekanizmalara dayanan sıkı bir şekilde düzenlenmiş hücre ölümü sürecidir. Hücre büzülmesi, yoğunlaşması ve kromatin kümelenmesi, düzenli bir DNA parçalanması modeli ve hücresel içeriğin daha sonra makrofajlar tarafından

fagosite edilen ve iltihaplanmayı önleyen küçük zarla sınırlı veziküllerin oluşması ile karakterize edilir.

Virüs enfeksiyonu sırasında apoptozun uyarılması ve bastırılması süreci, son birkaç yılda çok dikkat çekmiştir. Artık bunun virüs enfeksiyona karşı önemli doğuştan gelen bir yanıt olduğu kabul edilmektedir (Cann, 2016a).

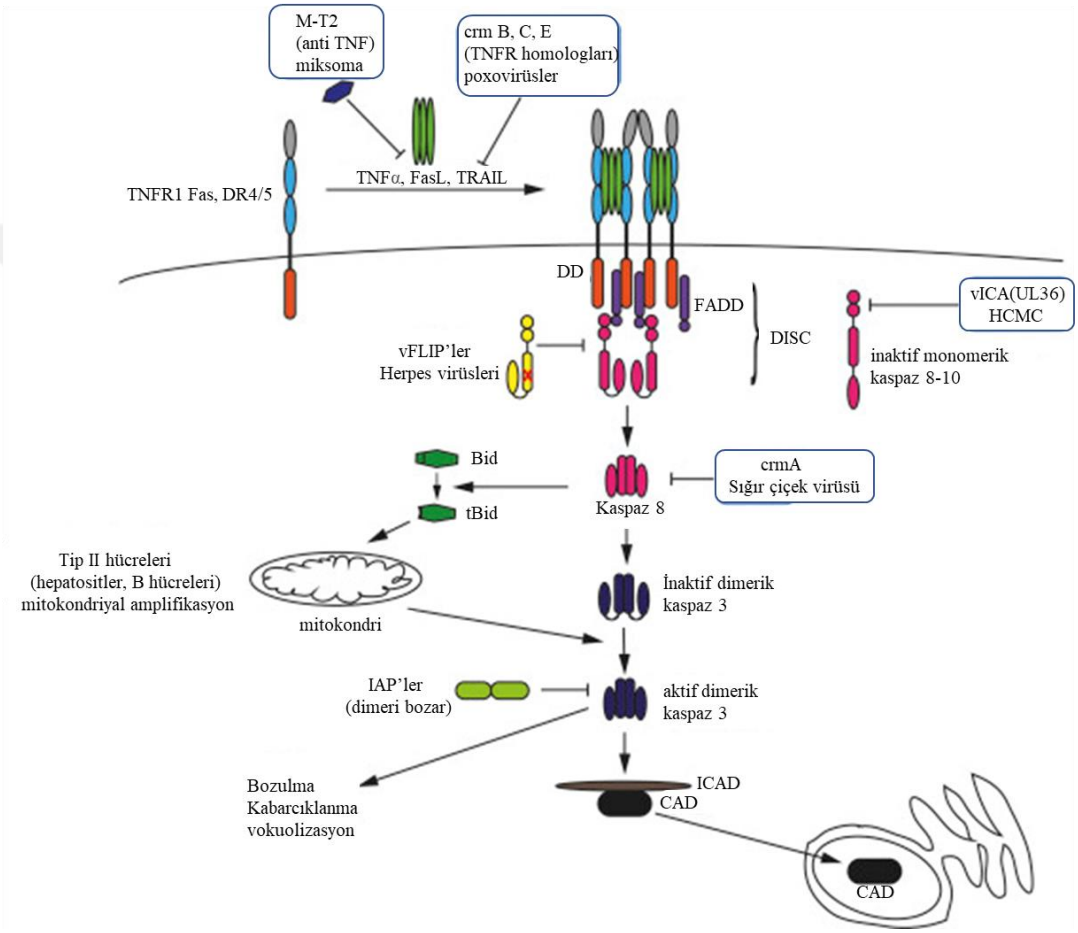
4.6.Viral Enfeksiyon ve Apoptoz

Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücrelerin viral replikasyonunu, viral yayılmasını veya kalıcı viral enfeksiyonunu önlemek için, koruyucu mekanizmalarının birçoğunun aslında programlanmış hücre ölümünün ya da diğer bir ifade ile apoptozun indüklenmesini kapsadığını açıkça ortaya koymuştur. Dolayısıyla viral enfeksiyon ile hücre apoptozu arasında sıkı bir ilişki vardır.

4.6.1. Dışsal apoptotik yol ve viral proteinler tarafından inhibisyonu

Hücre lizizine bağlı olarak sıklıkla patolojik ve kronik inflamatuar immün reaksiyonlara yol açan nekroz veya nekroptozun aksine, apoptotik hücreler parçalanmaz, makrofajlar ve diğer özelleşmemiş fagositler tarafından düzenlenmiş ve enflamatuar olmayan bir şekilde ortadan kaldırılır (Vanlangenakker ve ark., 2012). Apoptoz, iki farklı, ancak birbirine sıkı sıkıya bağlı sinyal yolu tarafından indüklenir. Bunlar dışsal ve içsel apoptotik yollardır. Dışsal apoptotik yol, ilgili yüzey reseptörlerine spesifik olarak bağlanan TNF (*İng. tumor necrosis factor*) süper ailesi üyeleri [FasL (*İng. Fas ligand*), TNFα (*İng. tumor necrosis factor-α*) ya da TRAIL (*İng. TNF-related apoptosis-inducing ligand*)] gibi hücre dışı ligandlar tarafından tetiklenir (Guicciardi ve Gores, 2009; Gonzalvez ve Ashkenazi, 2010; Cong ve ark., 2013). Bu reseptörlerin sitoplazmik taraftaki konformasyonel değişiklik adaptör protein olan FADD (*İng. Fas-associated protein with death domain*)'nin işlev kazanmasına sebep olur. FADD'nin görevi pro-kaspaz-8'i sitoplazmadan ölüm reseptörüne çekmektir. Böylece iki monomerik pro-kaspaz-8 molekülü otomatik işleme ve sonraki aktivasyon için yakınlaşmış olur. (Şekil 6). Ölüme neden olan sinyal kompleksi (*İng. Death-inducing signaling complex, DISC*) olarak adlandırılan bu kompleks, daha sonra, kaspaz-8 aracılı bölünme ve ardından otomatik işleme

yoluyla aktive olan, zaten dimerleşmiş efektör pro-kaspaz-3 ve/veya pro-kaspaz-7 ile etkileşime girer. Aktif efektör kaspazlar daha sonra hücre iskeletinin bozulmasına, DNA onarım mekanizmalarının inhibisyonuna, DNA moleküllerinin parçalanmasına ve apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagosite edilerek yok edilmesine aracılık eden sözde ‘’beni ye sinyalleri’’ (*İng. eat-me signals*)’nin açığa çıkmasına neden olan çok sayıda substratı parçalar (Neumann ve ark., 2015).



Şekil 6. Dışsal ölüm reseptörü sinyal yolu ve viral proteinler tarafından inhibisyonu (Neumann ve ark., 2015)’ten değiştirilerek kullanılmıştır).

Dışsal ölüm reseptörü yolu hem doğuştan gelen hem de adaptif bağışıklık tepkilerinin yürütülmesi ve sınırlandırılması için vazgeçilmezdir. Dendritik veya doğal öldürücü (NK) hücreler gibi doğuştan gelen bağışıklık sisteminin hücreleri, Toll benzeri reseptör 3 (TLR-3) tarafından çift zincirli RNA (dsRNA) gibi viral ürünleri doğrudan tespit ederek, FasL, TRAIL gibi ölüm reseptörlerini uyarır ve TNF ve/veya enfekte olmuş hücreleri granül ekzositozu (NK hücreleri) ile öldürerek

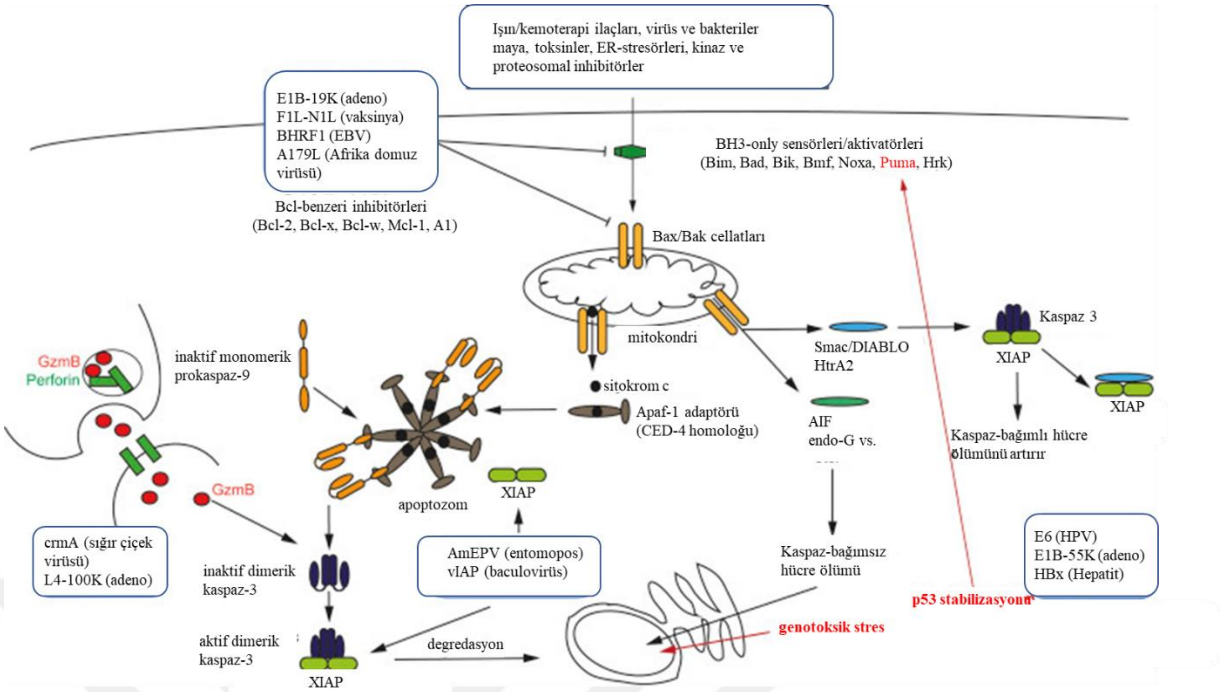
antiviral immun cevabı geliştirir (Medzhitov, 2001). Daha sonra adaptif bağışıklık sırasında, viral olarak enfekte olmuş hücreler, hem perforin/granzim hem de FasL/Fas yolakları ile antijene özgü sitotoksik T hücreleri (*İng. cytotoxic T cells, CTLs*) tarafından öldürülür (Chávez-Galán ve ark., 2009). Daha sonra, aktive edilmiş T hücreleri, akut bir enfeksiyondan sonra aynı veya aktive edilmiş bir komşu hücrenin FasL/Fas aracılı öldürülmesini içeren aktivasyon kaynaklı hücre ölümü ile elimine edilir (Arakaki ve ark., 2014). Bu, yüksek oranda çoğalan, gereksiz öldürücü hücrelerin uygun şekilde atılmasını sağlayarak otoimmün veya lösemik hücrelerin gelişmesini engeller. Bu nedenle virüslerin, ölüm reseptörü sinyal yolunu birkaç aşamada inhibe etmek için stratejiler geliştirmesi şaşırtıcı değildir, ancak bu hücreler granül ekzositozu tarafından da öldürülebilir (Benedict ve ark., 2001; Hay ve Kannourakis, 2002). Sonuç olarak, enfekte olmuş hücreler, aktivasyon üzerine FasL veya TRAIL eksprese eden CTL'ler, NK hücreleri veya komşu hücreler tarafından sitolizden en azından kısmen korunur (Ashkenazi ve Dixit, 1999) ve TNF, yeterli bir inflamatuar yanıtı indükleyemeyebilir.

Avian lökosiz virüsü genomundan kodlanan TRAIL reseptör ortoloğu (TRAILR2) tespit edildi (Brojatsch ve ark., 1996). Öte yandan adenovirüsler, Fas, TNFR (*İng. TNF receptor superfamily*), TRAILR1 ve TRAILR2'nin içselleştirilmesini ve lizozomal bozulmasını teşvik etmek için E3 gen bölgesinde kodlanmış birkaç protein kullanır (Stewart ve ark., 1995; Shisler ve ark., 1997; Tollefson ve ark., 1998; Benedict ve ark., 2001). Bazı virüsler ise DISC seviyesinde, yani ya kaspaz-8 aktivasyonunu ya da bunun proteolitik aktivitesini inhibe ederek, dışsal ölüm reseptörü sinyalleşmesini bloke edebilen proteinler üretir. Örneğin, viral FLIP proteinleri (vFLIP'ler), kaspaz aktivitesinden yoksun bir DISC oluşturmak üzere FADD tarafından toplanan inaktif kaspaz-8 homologlarıdır (Stewart ve ark., 1995; Shisler ve ark., 1997; Tollefson ve ark., 1998; Benedict ve ark., 2002).

4.6.2. İçsel apoptotik yol ve viral proteinler tarafından inhibisyonu

Hücrelerin mantar, bakteri veya virüs gibi patojenlere maruz kalması veya genotoksik/DNA'ya zarar veren uyaranlarla (ışınlama, kemoterapötik ilaçlar), endoplazmik retikulumu strese sokan ajanlar ile etkileşimi içsel apoptotik yolu aktive eder (Şekil 7) (Youle ve Strasser, 2008; Hotchkiss ve ark., 2009; Chipuk ve ark.,

2010). Bu yolun kritik adımı, mitokondriyal dış membranın geçirgenleşmesidir, bu da mitokondrinin zarlar arası boşluğundan birkaç apoptotik faktörün salınmasına neden olur. Bu tarz bir protein olan sitokrom c, daha sonra sitozolik pro-kaspaz-9'u apoptozom adı verilen bir heptamerik kompleks içine alan adaptör Apaf-1'e bağlanır. Kaspaz-8'in DISC'de toplanmasına benzer şekilde, monomerik kaspaz-9 apoptozomal platformda dimerleşir ve yakınlık kaynaklı otomatik işleme ve aktivasyona yol açar. Aktif kaspaz-9 daha sonra efektör kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi parçalar ve aktive eder. Mitokondriden salınan diğer proteinler ya henüz bilinmeyen kaspazdan bağımsız hücre ölümü süreçlerini uyarır ya da kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivasyonunu arttırır. Örneğin Smac/DIABLO ve Htr2A/Omi, Apoptoz Protein İnhibitörlerinin (IAP'ler) bir üyesi olan XIAP (*İng. X-linked inhibitor of apoptosis protein*)'ye bağlanır. XIAP, sağlıklı hücrelerde bu kaspazların yanlışlıkla otomatik olarak işlenmesini ve aktivasyonunu önleyen endojen bir kaspaz-9 ve kaspaz-3 inhibitörüdür (Deveraux ve Reed, 1999; Shi, 2002). Smac veya Omi tarafından sekestrasyon üzerine, XIAP artık kaspaz-9 veya kaspaz-3'e bağlanmaz, bu nedenle apoptotik uyaranlara yanıt olarak bu kaspazların tam aktivasyonuna izin vererek içsel mitokondriyal yolu aktive eder (Şekil 7). Mitokondriyal dış membranı hem kaspaz bağımlı hem de bağımsız hücre ölümü sinyali ile sonuçlandığında, hayati bir ölüm kalım kararı kontrol noktasıdır (“geri dönüşü olmayan bir nokta”) (Şekil 7).



Şekil 7. İçsel mitokondriyal sinyal yolu ve viral proteinler tarafından inhibisyonu. Apoptozu inhibe eden viral proteinler mavi renkte kutulanmıştır (Neumann ve ark., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

Bu kontrol noktası, Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir (Youle ve Strasser, 2008; Chipuk ve ark., 2010). Bcl-2 ailesi, Bcl-2 homoloji (BH) bölgesinin yapısal korunması temelinde alt bölümlere ayrılmıştır ve üç formda bulunur. Yalnızca proapoptotik BH3 proteinleri [Bim, Bid (*İng. BH3 interacting-domain death agonist*), Bad (*İng. Bcl-2-associated death promoter*), Bik (*İng. Bcl-2-interacting killer),* Bmf, Hrk *(İng. Activator of apoptosis harakiri),* Puma (*İng. p53 upregulated modulator of apoptosis),* Noxa)], Bcl-2 ailesinin geri kalanıyla 20-30 amino asit uzunluğunda alfa-sarmal BH3 alanını paylaşır. İçsel mitokondriyal yolu aktive eden apoptotik uyaranların sensörleri olarak hareket ederler (Happo ve ark., 2012). Apoptotik uyarana bağlı olarak, yalnızca BH3 proteinlerinin belirli setleri, transkripsiyonel olarak indüklenir veya translasyon sonrası modifikasyon geçirir. Sonrasında MOM'a göç eder ve MOM'a eklendikten sonra bu bölgede Bcl-2 ailesi proteinlerinin ikinci bir pro-apoptotik alt sınıfını ("efektörler" Bax ve Bak olarak da geçer) aktive eder (Happo ve ark., 2012). Bid, FasL, TRAIL veya TNF gibi ölüm reseptörü ligandlarına yanıt olarak kaspaz-8 tarafından proteolitik olarak kesilmiş

tBid'e bölünür ve mitokondriyal yolla karışan ikinci bir tip II ölüm reseptörü yolu tanımlar (Youle ve Strasser, 2008; Chipuk ve ark., 2010; Happo ve ark., 2012). Bax ve Bak, doğrudan mitokondri dış memran permeabilizasyonunu (*İng. mitochondrial outer membrane permeabilization / MOMP*) indükler. Bcl-2 ailesinin diğer üyeleriyle etkileşime giren uzun bir hidrofobik bağlama cebi oluşturan BH1, BH2 ve BH3 alanlarını içerirler (Borner ve Andrews, 2014). Sağlıklı hücrelerde, Bax sitoplazmada inaktif olarak bulunur (Borner ve Andrews, 2014) ve zara stabil bir şekilde yerleştirilmeden (retrotranslokasyon) sitoplazma ile MOM'un çevresi arasında sürekli olarak yer değiştirir (Edlich ve ark., 2011). Bak ise, mitokondrial dış membrana (*İng. mitochondrial outer membrane / MOM*) stabil bir şekilde eklenir ancak VDAC2 (*İng. Voltage-dependent anion-selective channel protein 2)* ve Bcl-2 hayatta kalma faktörleri gibi inhibitör proteinler tarafından kontrol altında tutulur (Wang ve ark., 2001; Willis ve ark., 2005). Yalnızca BH3 içeren üç protein Bim, tBid ve Puma, MOM üzerinde Bax/Bak'i doğrudan etkinleştirebilir (Czabotar ve ark., 2013). Aktivasyon sürecinin son yapısal analizleri, MOM'a yer değiştirmeleri ve MOM'a yerleştirilmesinden sonra, Bim ve tBid'in, BH3-alanları aracılığıyla Bax/Bak'teki hidrofobik cebe bağlandığını göstermektedir (Czabotar ve ark., 2013). Lipid nanodisklerinden ve floresan ölçümlerinden elde edilen son bulgular, Bax/Bak'in monomerik, di- veya multimerik olmalarına bağlı olarak farklı boyutlarda gözenekler oluşturabileceğini göstermektedir (Volkmann ve ark., 2014). Bir noktada gözenekler, sitokrom c'nin veya Smac ve Omi gibi daha büyük moleküllerin sitoplazmaya geçişine izin verecek kadar büyüktür. Bcl-2 ailesinin üçüncü alt grubu, antiapoptotik proteinler Bcl-2 (*İng. B-cell lymphoma 2*), Bcl-xL (*İng. B-cell lymphoma-extra large,*) Mcl-1 (*İng. Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*), Bcl-w (*İng. Bcl-2-like protein 2)* ve A1 (*İng. Bcl-2-related protein A1)* tarafından oluşturulur (Youle ve Strasser, 2008; Chipuk ve ark., 2010). Ayrıca BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri içerirler ve hatta bazılarının N-terminalinde ek bir BH4 bölgesi vardır. Bu hayatta kalma faktörlerinin 3 boyutlu yapısı Bax/Bak'ınkine çok benzer görünmektedir (Suzuki ve ark., 2000). Bununla birlikte, Bax/Bak'in aksine, düşük pH gibi fizyolojik olmayan koşullar dışında BH3-domainlerini açığa çıkarmak, multimerize etmek ve gözenek oluşturmak için konformasyonel değişikliklere giremezler (Minn ve ark., 1997). Bunun yerine hidrofobik bağlama

cepleri, yalnızca BH3 proteinleri ile yüksek afiniteli bir şekilde etkileşime girer. Bir yandan bu, yalnızca BH3 proteinlerinin proapoptotik etkisini engeller. Öte yandan, önceden bağlı Bim, tBid ve Puma, Bik, Bad, Bmf, Hrk ve Noxa gibi apoptotik uyaranlar tarafından aktive edilen diğer sadece BH3 proteinleri tarafından Bcl-2 hayatta kalma faktörlerinden salınabilir (Borner ve Andrews, 2014). Bim, tBid ve Puma daha sonra yukarıda açıklandığı gibi Bax/Bak'i doğrudan etkinleştirebilir. Bu, antikanser tedavisinde BH3-benzerlerinin (mimetiklerinin) etkinliğini açıklar. Bunlar, Bcl-2 hayatta kalma faktörlerinin hidrofobik cebine yüksek afinite ile bağlanan ve böylece MOMP aktivasyonu için önceden bağlı Bim, tBid ve Puma salan küçük moleküllü bileşiklerdir (Happo ve ark., 2012). Yalnızca BH3 proteinleri ile etkileşime girmenin yanı sıra, Bcl-2 hayatta kalma faktörleri ayrıca sağlıklı hücrelerde yanlışlıkla aktive olan Bax ve Bak'ı salgılar. Aktif Bax/Bak, BH3-domainlerini açığa çıkardığından, bu bölge Bcl-2 hayatta kalma faktörlerinin hidrofobik cebi ile etkileşime girebilir ve bu nedenle Bax/Bak inhibe edilir (Uren ve ark., 2007).

Bcl-2 hayatta kalma faktörleri, MOMP ve MOMP'nin hem "aktivatörlerini" (sadece BH3-proteinleri) hem de "efektörlerini" (Bax/Bak) kısıtlayacağından hem kaspaz bağımlı hem de bağımsız hücre ölümünü tetikler. Çok sayıda uyaran tarafından indüklenen apoptoz için içsel mitokondriyal yolun önemi göz önüne alındığında, virüsler, konak hücrelerinde MOMP'yi güçlü bir şekilde inhibe etmek için Bcl-2 hayatta kalma faktörlerinin etkisini taklit eden proteinleri kodlayan genler edinmiştir. Bcl-2'nin fonksiyonel homologları topluca vBcl-2'ler olarak adlandırılır. *Poxviridae* ailesinde (F1L, N1L, M11L, A179L, ORFV125), *Herpesviridae* ailesi üyelerinde BHRF1, BALF1, vMIA, KSBcl-2 ve MHVBcl; *Adenoviridae* ailesi üyelerinde E1B-19K ve *Birnaviridae* ailesi üyelerinde VP5 proteinleri bulunurlar. (Şekil 7) (Postigo ve Eitz Ferrer, 2009).

Ayrıca virüsler, transkripsiyon faktörü NFkB (*İng. Nuclear Factor kappa B*)'yi devreye sokarak hem içsel mitokondriyal hem de dışsal ölüm reseptörü sinyalleşmesini etkili bir şekilde bloke edebilir (Sun ve Cesarman, 2011). NFkB, kaspaz-8 inhibitörü FLIP veya apoptoz proteinlerinin (IAP'ler) inhibitörü olan ve genellikle doğrudan veya dolaylı olarak kaspaz inhibitörleri olarak işlev gören hayatta kalma faktörü Bcl-xL'nin transkripsiyonunu indükler (Didonato ve ark.,

2012). Örneğin, Epstein-Barr virüsündeki (EBV) ana B hücre dönüştürücü protein, LMP1, aktive edilmiş CD40'ı taklit eder ve TNFR tarafından NFkB'yi aktive etmek için kullanılan çok önemli adaptörler olan TRADD (*İng. Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein)* ve TRAF (*İng. TNF receptor-associated factor)* 'ları birbirine bağlar. Böylece LMP1, B hücrelerinin folikülde lokalize olmasını önler ve latent virüs barındıran hücreleri T hücreleri ile etkileşimlerden korur (Uchida ve ark., 1999). Virüslerin apoptoz sinyallemesine müdahale etmesi için başka bir olasılık da kaspazları bloke etmektir. İntrinsik mitokondriyal yolun ana başlatıcı ve efektör kaspazları, kaspaz-9 ve kaspaz-3/-7, hücresel IAP'ler, özellikle XIAP (Şekil 7) tarafından kontrol altında tutulur (Deveraux ve Reed, 1999; Shi, 2002). Ancak MOMP ayrıca kaspazdan bağımsız ölüm sinyaline de yol açar. Bu nedenle kaspaz-9 ve/veya -3'ün virüsler tarafından bloke edilmesi, enfekte olmuş konakçı hücreleri apoptozdan kurtarmak için yeterli olmayabilir.

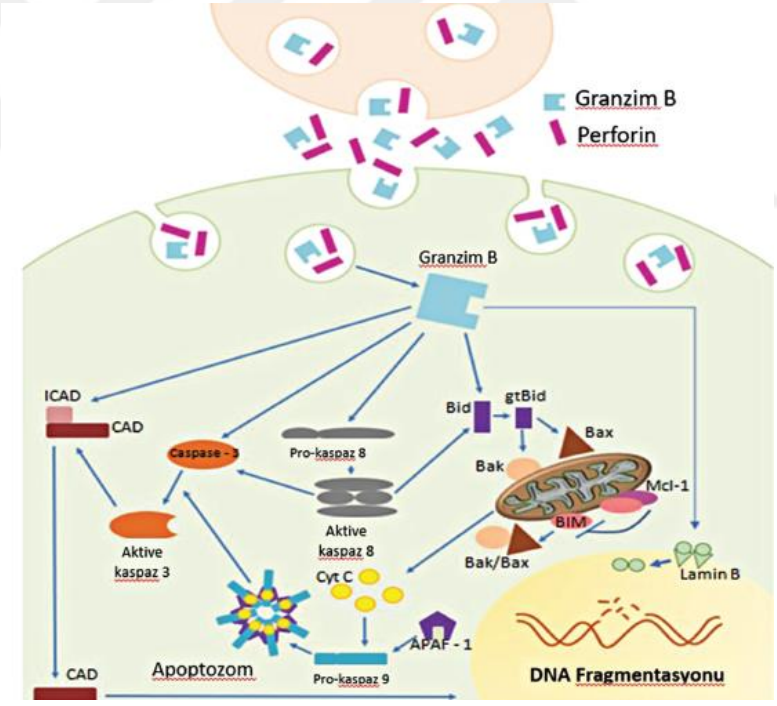
4.6.3. Viral enfeksiyondan sonra içsel, mitokondriyal apoptoz yolunun aktive edildiği mekanizmalar

Virüsler içsel mitokondriyal apoptoz yoluna karşı koymak için pek çok mekanizma geliştirdiğinden, bu yolun neden ve ne zaman enfekte hücrelerde aktive olduğu sorusu ortaya çıkmaktadır. Üç senaryo mümkündür: (i) enfekte olmuş hücre, dışsal bir apoptotik sinyal tarafından öldürülür, (ii) enfekte olmuş hücre, virüs girişini veya kurulmasını "algılar" ve sadece virüsü değil, aynı zamanda enfekte olmuş hücreyi de ortadan kaldıran bir antiviral stres tepkisi geliştirir veya (iii) virüs, enfekte hücrelerde eksprese edilen belirli viral bileşenleri (viral proteazlar, dsRNA, dsDNA, vb.) kullanarak konağının apoptozunu aktif olarak indükler (Neumann ve ark., 2015).

4.6.4. Viral olarak enfekte olmuş hücrelerin CTL'ler ve NK hücreleri tarafından öldürülmesi

Sitotoksik T lenfositler ve NK hücreleri, virüs ile enfekte olmuş veya malign dönüşüm sergileyen hücreleri granzim A ve B'yi kullanarak öldürür. Öldürme işlemini hedef hücre membranı ile kendisi arasındaki alana sitotoksik serin

proteazlarını içeren granülleri bırakarak yapar (Ben Safta ve ark., 2015). İnsan hücrelerinde 5 tip granzim (A, B, H, K ve M) tanımlanmıştır. Granzim B, proapoptotik proteinlerin en güçlüsüdür. Hücre membranında perforin tarafından gözenekler oluşturulduktan sonra granzim hücreye gözeneklerden girer. Daha sonra granzim BID'yi aktif tBID'ye dönüştürür. tBID sitokrom C'nin mitokondriden sitozole geçişini ve BAK/BAX oligomerizasyonunu kolaylaştırarak apoptozu başlatır (Barman ve ark., 2018). Granzim B, kaspaz-3 ve 7'yi doğrudan aktive ederek cellat (*İng. executioner*) yolağı harekete geçirerek apoptozu başlatır (Kim-Campbell ve ark., 2019). Granzim B mitokondriye girdikten sonra indirgenmiş adenin dinükleotidi (NADH) ayırarak mitokondriyal solunum zincirini [elektron taşıma zinciri (ETZ)] bozar. Granzim B'nin reaktif oksijen radikallerinin üretilmesini sağlayarak apoptotik hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 8) (Adrain ve ark., 2005; Celepli ve ark., 2020).



Şekil 8. Granzimler ile tetiklenen apoptoz yolağı (Celepli ve ark., 2020).

Virüsler, vBcl-2 hayatta kalma faktörlerini ekspresse ederek granzim B öldürme yoluna karşı koyar. Alternatif olarak, adenovirüsten L4-100K montaj proteini (Andrade ve ark., 2001), sığır çiçeği virüsünden CrmA (aynı zamanda kaspaz-8'i de inhibe eder) (Komiyama ve ark., 1996) veya leporipoxvirus miksoma virüsü

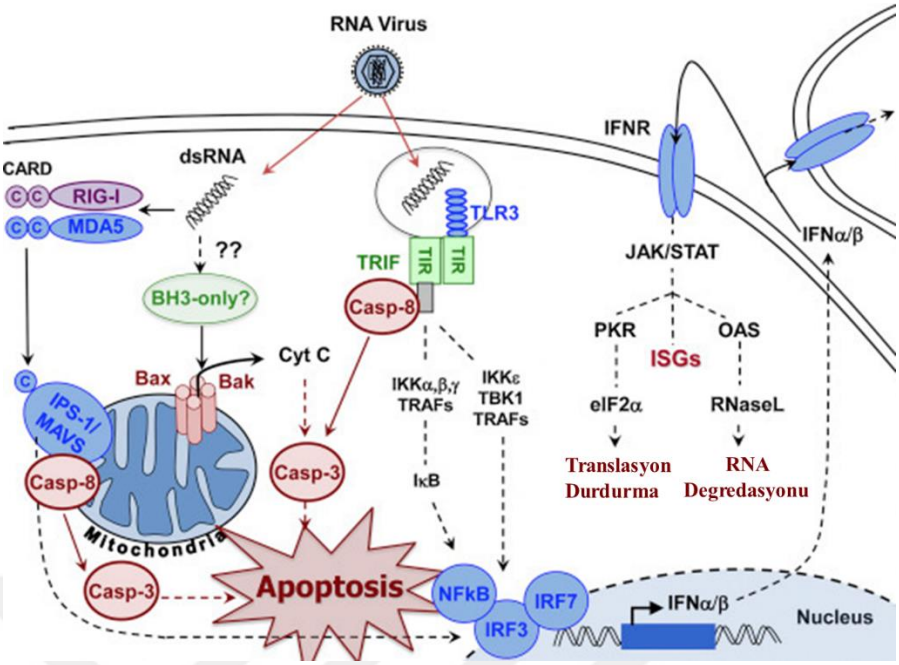
tarafından kodlanan Serp2 gibi granzim B inhibitörleri üretirler. (Turner ve ark., 1999). Tüm bu inhibitörler, hücresiz sistemlerde granzim B etkisini açıkça bloke eder (Neumann ve ark., 2015).

4.6.5. Endozomal ve sitozolik bölmelerdeki virüsleri tanıma/algılama ve antiviral doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi oluşturma

Virüs replikasyonunun ve yayılmasının bloke edilip edilmediğine ve virüslerin nihayet apoptotik olmayan veya apoptotik mekanizma tarafından elimine edilip edilmediğine bakılmaksızın, enfekte olmuş hücreler önce ilgili virüsleri tanımalıdır. Bu, moleküler algılama mekanizmalarını, hücre ölümünün başlatılması da dahil olmak üzere tüm anti-viral etkilerin temelini oluşturur. Konak hücre apoptozu, bir virüs döl oluşturmadan önce meydana gelirse veya enfekte olmuş bir hücre CTL'ler tarafından başarıyla elimine edilirse virüsün yayılması önlenir. Ancak virüs, enfeksiyondan sonra kendi hayatta kalma faktörlerini ekspresse ederek hücre ölümünü engelleyebiliyorsa veya çoğaldıktan sonra hücreleri öldürüyorsa, başarılı bir şekilde çoğalabilir ve bağışıklık sisteminden kurtulabilir. RNA virüsleri için konakların en iyi bilinen antiviral "algılama" mekanizması, Tip I interferon tepkisini tetikler (Takeuchi ve Akira, 2009; Ivashkiv ve Donlin, 2014). Tip I interferonlar, viral enfeksiyonlardan sonra transkripsiyonel olarak indüklenir ve virüslere karşı doğuştan gelen tepkilerin oluşturulmasında kritik bir rol oynar (Şekil 9). Antiviral durumun mümkün olduğu kadar çok hücreye yayılmasını sağlamak için hem enfekte hücreler hem de komşu hücreler tarafından salgılanır ve spesifik interferon reseptörlerine bağlanırlar. Aktive olan interferon reseptörleri daha sonra, farklı adımlarda viral yaşam döngüsüne müdahale edebilen IFN ile uyarılan genlerin (*İng. Interferon-stimulated gene, ISG*) uyarılması ile sonuçlanır. Bu uyarı Janus protein kinaz sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK-STAT) aracılığıyla bir sinyal kaskadını tetikler ve konak hücre apoptozunu veya her ikisini birden indükler (Şekil 9) (Ivashkiv ve Donlin, 2014). IFN ile indüklenen sinyal sisteminin iki ana bileşeni, RNA'ya bağımlı protein kinaz (PKR) (García ve ark., 2007), 2,5-oligoadenilat sentaz ve RNase-L sistemleridir (Hovanessian, 2007). RNaseL'nin aktivasyonu, viral RNA'nın yıkılmasına yol açar. Bu şekilde daha fazla RNA sentezi ve transkripsiyon bloke edilir. Öte yandan PKR aktivasyonu, translasyon uzama

başlatma faktörü 2A'nın (*İng. Eukaryotic Initiation Factor 2, eIF2*) fosforilasyonu yoluyla konağın hücre protein sentezini inhibe eder (Garcia ve ark., 2007). Ek olarak, aktif PKR'nin, sırasıyla FasL ve TRAIL'i upregüle eden NFkB ve IRF-1 (*İng. Interferon regulatory factor 1)* aktivasyonu yoluyla konak hücre apoptozunu indüklediği bilinmektedir (Tan ve Katze, 1999). NFkB genellikle apoptozu indükleyen transkripsiyon faktöründen ziyade hücre ölümü koruyucusu olarak hareket eder (DiDonato ve ark., 2012).

Konak hücreler endozom içerisindeki virüslerin tanınmasını sağlayan bileşenlere ek olarak, sitozolde de viral sensörler içerir (Kawai ve Akira, 2008; Takeuchi ve Akira, 2009). Bunlar, RIG benzeri helikazlar olan (*İng. RIG-like helicase, RLH*) RIG-I, MDA5 (*İng. melanoma differentiation-associated protein 5)* ve LGP-2 *(İng. Probable ATP-dependent RNA helicase)* proteinleridir (Kato ve ark., 2006). RIG-I ve MDA5 proteinlerinin her ikisi de iki kaspaz tanıma bölgesi (CARD), bir ATPaz ve bir sarmal alanı içerir (Şekil 9). Helikaz bölgesi, farklı nükleik asit türlerini tanımak için kullanılır. MDA5 esas olarak uzun viral dsRNA moleküllerini algılarken, RIG-I genellikle kısa dsRNA fragmanları ve 5 trifosfata sahip tek iplikli RNA'lar (*İng. single-stranded RNA / ssRNA)* tarafından aktive edilir (Pichlmair ve Reis e Sousa, 2007). Bu konsept, 5 ucu kapalı veya monofosfat içeren hücresel RNA'ların RLH'ler tarafından tanınmasını önler. Aktive edilmiş RIG-I ve MDA5 daha sonra mitokondride yer alan adaptör protein MAVS (*İng. Mitochondrial antiviral-signaling protein)* (IPS-1, VISA veya Cardif olarak da bilinir) ile etkileşime girmek için CARD bölgesini kullanır (Meylan ve ark., 2005) (Şekil 9). TLR3 sinyaline benzer şekilde, RIG-I/MDA5/MAVS yoluyla algılama, virüsler tarafından yoğun şekilde antagonize edilir. Influenza A virüsü NS1 proteini, RIG-I/MAVS kompleksine bağlanır ve böylece sinyalleşmeye müdahale eder.



Şekil 9. RNA virüsleri tarafından indüklenen doğuştan gelen bağışıklık ve apoptoz sinyali (Neumann ve ark., 2015'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

4.6.6. Viral aşırı yüklenmenin neden olduğu ER stresinin neden olduğu konak hücre apoptozu

Hücrelerin virüs enfeksiyonunu nasıl algılayabileceği ve tepki gösterebileceği bir başka olasılık, bir endoplazmik retikulum (ER)-stres tepkisi oluşturmaktır (Li ve ark., 2013). Bu durumda, ER'de lokalize olan yüksek miktarda viral proteinler, klasik bir katlanmamış protein tepkisini (*İng. Unfolded protein response, UPR*) indükler. UPR yanıtları genellikle büyük miktarda proteinin katlanmasına yardımcı olan şaperonların transkripsiyonel upregülasyonunu tetikleyerek, enfekte olmuş konak hücrelerin apoptozuna sebep olur (Lu ve ark., 2014). Bu durumda, yalnızca BH3 proteinleri Bim ve Puma'yı upregüle eden, içsel mitokondriyal yolak aracılığıyla Bax/Bak aktivasyonuna ve MOMP'ye yol açan CHOP1 (*İng. C/EBP homologous protein 1*) transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna sebep olur (Ghosh ve ark., 2012). Virüsler daha sonra Bcl-2 ortologlarının (vBcl-2s) ekspresyonu ile konak hücre ölümüne karşı koyacaktır.

4.6.7. Konak hücre apoptotik mekanizmasını doğrudan etkileyen viral bileşenler

Bazı virüsler, muhtemelen viral antijenlerin adaptif bağışıklık sistemine sunulmasını önlemek ve enfekte olmuş hücreleri aktif olarak öldürmek için stratejiler geliştirmiştir. Bu durumda, virüsler çoğalır ve yeni virionlar halinde toplanır. Böylece konak hücre apoptozu virüsü de ortadan kaldırmaz.

Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü (SARS-CoV) 7a proteini, Bcl-xL ve diğer hayatta kalma faktörlerini doğrudan inhibe edebilir (Tan ve ark., 2007a). Bugüne kadar virüslerin yalnızca BH3 ortologlarını eksprese ettiği bulunmuş olsa da MOM üzerindeki Bax/Bak gözenek makinesini bağlamak için yalnızca hücresel BH3 proteinlerini bir şekilde aktive ettiklerine dair kanıtlar vardır.

Virüslerin p53'ü ve p73 gibi homologlarını aktive edebildiği verilerine dayanarak (Kaelin Jr, 1999), Noxa'nın ve belki de Puma'nın belirli enfeksiyonlara yanıt olarak bu faktörler tarafından transkripsiyonel olarak indüklenmesi mümkündür (Cruz ve ark., 2006; Liu ve ark., 2014). Alternatif olarak, virüse özgü protein kinazlar, yalnızca BH3 proteinlerini fosforile edebilir (Munger ve Roizman, 2001).

İnsan immün yetmezlik virüsü (*İng. Human Immunodeficiency Virus / HIV)* tarafından kodlanan bir proteazın hem *in vitro* hem de T hücrelerinde kaspaz-8'i işleyip aktive ettiği ve bunun daha sonra Bid bölünmesine ve mitokondri aracılı apoptoza yol açtığı bilinmektedir (Nie ve ark., 2002). Bcl-2 aşırı ekspresyonu, hücreleri HIV-proteazın proapoptotik etkilerinden korur ve insan lenfositlerinin HIV-1 enfeksiyonunun neden olduğu apoptozu önler (Strack ve ark., 1996).

Hepatit C Virüsü (HCV), NS3/4A ile bir mitokondriyal kompleks oluşturan iki proapoptotik protein olan NS4A ve NS3'ü kodlar ve MAVS'yi parçalayarak konağını doğuştan gelen bağışıklık tepkilerini inhibe eder. NS4A mitokondriye yerleşir ve hücre içi dağılımlarını değiştirir. Bunu mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi m$) ve sitokrom c salınımının dağılması izler (Nomura-Takigawa ve ark., 2006). Viral bir proteaz olan NS3'ün, proteaz aktivitesinden bağımsız olarak kaspaz-8 aracılı apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Prikhod'ko ve ark., 2004).

İnfluenza A virüsleri, C-terminal transmembran bölgesi ile mitokondriyal iç membrana eklenen PB1-F2 proteinini kodlar (Gibbs James ve ark., 2003). PB1-F2 için varsayılan etkileşimli ortaklar, VDAC1 ve ANT3 (*İng. ATP translocase 3*)'ü

içerir. PB1-F2'nin proapoptotik aktivitesinin, diğer mitokondriyal membran proteinleri ile doğrudan etkileşimler yoluyla geliştirilmiş MMP (*İng. mitochondirial membrane potantial*)'den kaynaklandığı öne sürülmüştür (Chanturiya ve ark., 2004).

Şiddetli akut solunum sendromu korona virüsü (*İng.* severe acute *respiratory syndrome* coronavirus / *SARS-CoV*) proteini 7A, kültürlenmiş hücrelerde viral replikasyon için gerekli değildir, ancak Bcl-xL'yi inhibe ederek virüs kaynaklı apoptoza katkıda bulunur (Schaecher ve ark., 2007; Tan ve ark., 2007b). SARS-CoV tarafından kodlanan NSP15 proteini, aşırı eksprese edilen MAVS tarafından indüklenen apoptozu doza bağlı bir şekilde inhibe eder, ancak NSP15, staurosporine bağlı apoptozu inhibe etmez (Lei ve ark., 2009; Ohta ve Nishiyama, 2011).

4.7. Mitokondrial Taşıyıcı Proteinler

Mitokondriler, ATP üretimi, kalsiyum homeostazı, hücre proliferasyonu, programlanmış hücre ölümü ve amino asitlerin, nükleotidlerin ve lipidlerin sentezi dahil olmak üzere çeşitli hücresel metabolik süreçlerde rol alır. Her mitokondrinin kendi genomu olmasına rağmen, mitokondriyal proteinlerin çoğu nükleer genom tarafından kodlanır. Bu organellerin dağılımı, şekli ve işlevleri, bazı durumlarda virüsleri de içeren dışsal ve içsel uyaranlar tarafından düzenlenir. Viral enfeksiyonlar, hücre tipine, virüse ve enfeksiyon anındaki koşullara bağlı olarak ökaryotik hücrelerde çeşitli sonuçlara neden olur. Ökaryotik hücreler bir dizi antiviral savunma mekanizmasına sahip olamakla birlikte, virüsler hücrelerin bu mekanizmalarından korunmak için çeşitli karşıt önlemler geliştirmiştir. Birincil konak savunma mekanizmaları arasında programlanmış apoptoz ve interferon (IFN) sistemi, viral enfeksiyonlarla mücadelede özellikle önemlidir (West ve ark., 2011).

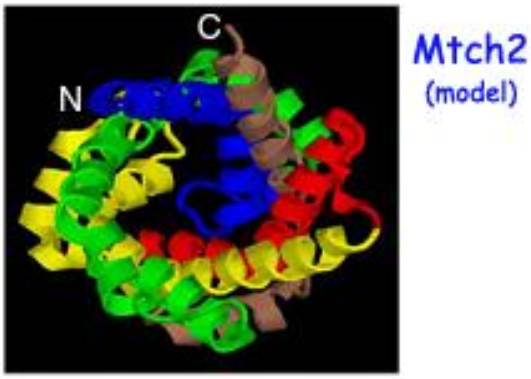
Bu tez çalışmasına konu olan MTCH2 proteini mitokondrial taşıyıcı (*İng. mitochondrial carrier / MC*) protein ailesi ile ilişkili bir proteindir (Palmieri, 2008). MC proteinler çoğunlukla mitokondrinin iç membranında lokalize olan büyük bir membran proteinleri ailesidir. Bu membranın geçirgenliğinin oldukça sınırlı olduğu ve sadece O_2 ve CO_2 gibi bazı yüksüz moleküllerin proteinlerin yardımı olamadan geçebildiği göz önüne alındığında, MC proteinleri sitozolde meydana gelen metabolik reaksiyonlar ve mitokondriyal matriks arasında, membran boyunca çok

sayıda çözünen maddenin translokasyonunu katalize ederek bir bağlantı sağlar. Mitokondri ve sitozol, enzim bölmelerine bağlı olarak çok sayıda metabolik hücresel süreçte iş birliği yaptığından, iç membran boyunca mitokondri içine ve dışına sürekli madde akışı gerçekleşir. MC proteinler oksidatif fosforilasyon, sitrik asit döngüsü, yağ asidi oksidasyonu, amino asit degradasyonu, glukoneogenez, lipogenez, indirgeyici eşdeğerlerin transferi, üre sentezi, mitokondriyal DNA/RNA'nın replikasyonu ve onarımı, protein sentezi ve keton cisimciği üretimi ve kullanımı gibi birçok önemli metabolik yolakta rol alırlar (Palmieri, 2013).

Metabolitleri taşıyan tüm mitokondriyal proteinler ortak yapısal özelliklere sahiptir ve mitokondriyal taşıyıcı aile (MCF) olarak bilinen bir protein ailesine aittir. Muhtemelen çözünen taşıyıcı ailelerin en büyüğü olan bu aile, substrat spesifikliklerine göre gruplara ayrılabilir: nükleotidler, karboksilatlar ve keto asitler, amino asitler ve diğer substratlar için taşıyıcılar gibi her grup birkaç alt aileye bölünebilir. Birkaç istisna dışında, bu alt familyalar ökaryotik organizmalarda yaygındır ve evrimsel olarak korunmuşlardır. MCF tarafından taşınan substratlar, yalnızca yapılarında değil, aynı zamanda boyutlarında da en küçük H'den, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) veya koenzim A gibi membranlar boyunca yer değiştiren en büyük ve en yüksek yüklü çözünenlere kadar büyük farklılıklar gösterir. Bazı MC'nin farklı genler tarafından kodlanan izoformları vardır ve insan fosfat taşıyıcısı gibi alternatif işleme (*İng. splicing*) ile oluşturulan izoformlara sahiptir. Tek hücreli organizmalarda MC ekspresyonunun seviyesi, metabolik çevresel koşullara bağlı olarak büyük ölçüde değişkendir. Hayvanlar ve bitkilerde, bazı MC'ler veya varsa izoformlarından biri, hemen hemen tüm dokularda yaygın olarak dağılırken, diğerleri dokuya özgüdür ve sınırlı dağılımları, özel işlevlerdeki önemlerini yansıtır. Son olarak, MCF mitokondri ile sınırlı değildir. Bazı MC'ler, peroksizomlar ve kloroplastlar gibi diğer hücre organellerinde lokalizedir (Palmieri, 2013).

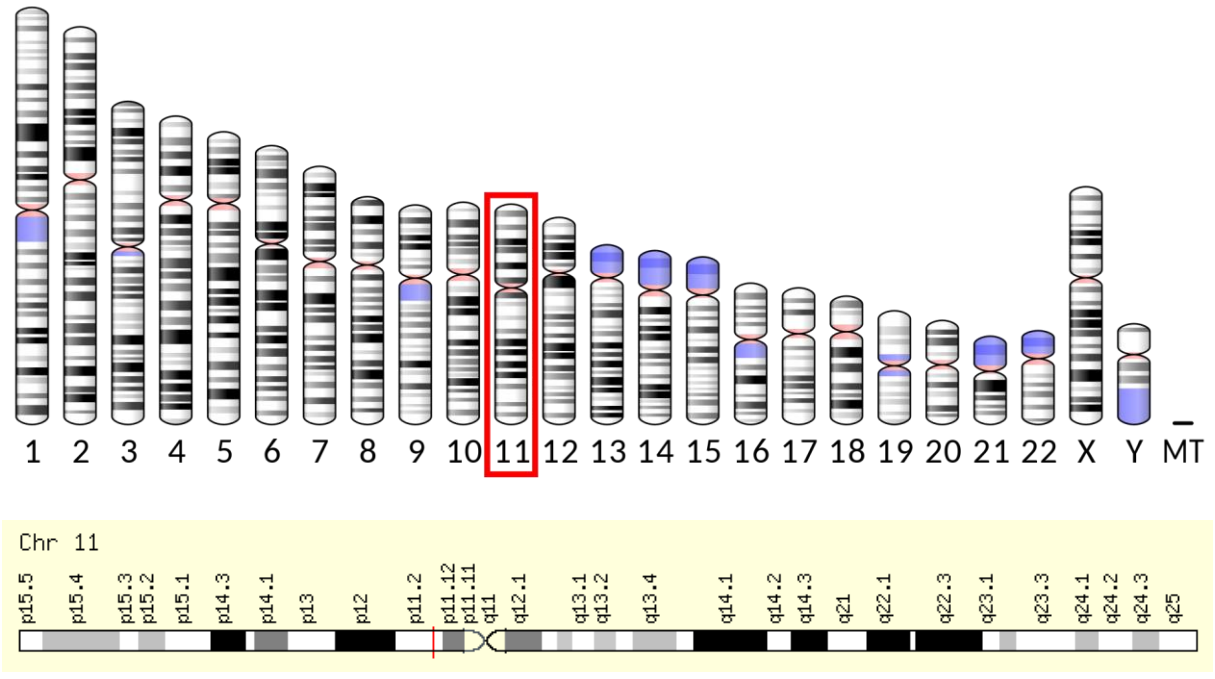
Bu protein ailesinin korunan özellikleri, yaklaşık 100 amino asit uzunluğunda üç ardışık tekrardan oluşan ve mitokondriyal taşıyıcı alan (domain) olarak bilinen üçlü bir yapıdır. Her mitokondriyal taşıyıcı alan, geniş bir hidrofilik bölge ile birbirine bağlanan iki transmembran alfa-sarmal yapısı içerir. MC protein ailesi içerinde yer alam MTCH2 proteini 303 amino asitten oluşmakta, 123-206.

pozisyonlarında tek bir orta mitokondriyal taşıma alanına sahiptir (Şekil 10; sarı renkle gösterilen bölge). MTCH2 oldukça yeni ve çok iyi karakterize edilmemiş 33 kDa ağırlığında bir proteindir (Grinberg ve ark., 2005; Gross, 2005). MTCH2'nin benzersiz lokalizasyonu, amino asit dizisi ile açıklanabilir. MTCH2 proteininin amino asit dizisi, merkezi bir korunmuş bölge içerirken, uzayda yakın olan bir N- ve C-terminal fragmanları oluşturur (bkz. Şekil 10). Genel yapısı itibariyle MTCH2 proteini MC'lerin yapısına benzerdir (Schwarz ve ark., 2007).



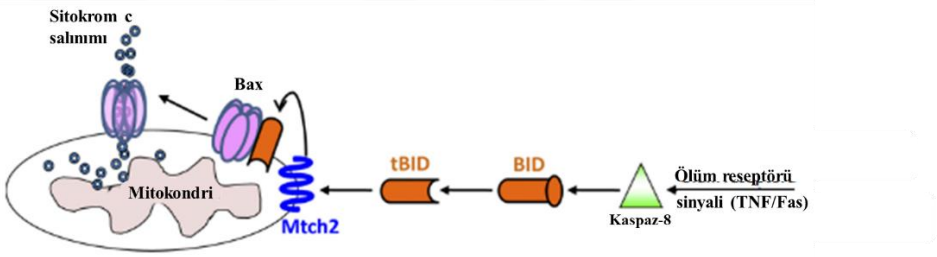
Şekil 10. MTCH2 protein modellemesi. Mitokondriyal taşıma alanına I'inN-terminal sarmalı (mavi) ve Mitokondriyal taşıma alanına III'ün C-terminal sarmalı (kahverengi) (Schwarz ve ark., 2007).

İnsan MTCH2 proteini 11 nolu kromozomun kısa kolunda (P) p.11.2 ile p11.12 bölgeleri arasında yer alan *MTCH2* geni tarafından kodlanır (Şekil 11).



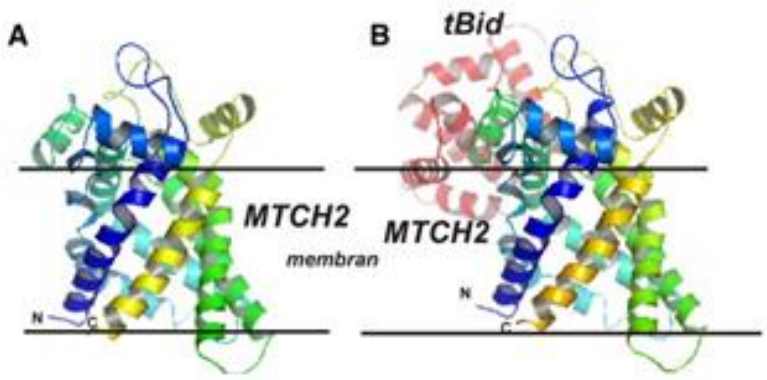
Şekil 11. İnsan *MTCH2* genin kromozom üzerindeki lokasyonu. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000109919;r=11:47617315-47642607 -Erişim tarihi: 10.03.2022).

MTCH2 proteininin apoptoz ile ilişkisi belirlenmiştir. Hem sağlıklı hücrelerin hem de TNFα ölüm sinyali verilen hücrelerin mitokondrileri üzerinde gerçekleştirilen analizler, MTCH2'nin yaklaşık 185 kDa büyüklüğünde bir kompleks yapının içinde yer aldığı ve TNFα ile aktivasyonun hem tBID hem de Bax'ın bu komplekse alınmasına yol açtığını ortaya konmuştur (Grinberg ve ark., 2005) (Şekil 12). Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin komplekse alınması, mitokondriyal ölüm yolunun uyarılması için önemli görünmektedir. TNFα ile indüklenen sitokrom c salınımını inhibe eden Bcl-xl'in aşırı ekspresyonu, ayrıca tBID ve Bax'ın MTCH2 yerleşik kompleksine katılmasını da inhibe eder (Grinberg ve ark., 2005).



Şekil 12. tBID yapısı ve etki mekanizması. Ölüm reseptörleri Fas/TNF'nin aracılık ettiği ölüm sinyalleri, BID'i N-terminal bölgesinden kesen ve aktif BID (tBID) oluşturan kaspaz-8'i aktive eder. tBID, MTCH2 tarafından mitokondriye alınır ve Bax/Bak aktivasyonunu indüklemesini sağlar. Bax/Bak aktivasyonu sitokrom c salınımına yol açarak apoptotik bir yanıta neden olur (Katz ve ark., 2012)'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Hem tBID hem de BAX'ın apoptotik hücrelerde MTCH2 yerleşik kompleksi ile birlikte bulunması gerçeği, MTCH2'nin tBID ile indüklenen Bax aktivasyonu/oligomerizasyonuna dahil olabileceğini düşündürmektedir. tBID'nin Bax'ı BH3 alanı aracılığıyla aktive ettiği bilinmektedir. Ancak tBID'in MTCH2 ile etkileşimi BH3 ve Bax/Bak'tan bağımsızdır (Grinberg ve ark., 2002). Bu, MTCH2'nin, açıkta kalan BH3 alanı yoluyla Bax'ın aktivasyonuna izin vermek için tBID'i zarda stabil bir şekilde sabitleyen ve/veya doğru şekilde konumlandıran tBID için bir çapa proteini olarak hizmet ettiği anlamına gelebilir (Schwarz ve ark., 2007) (Şekil 13).



Şekil 13. MOM-entegre MTCH2 ve MTCH2/tBid komplekslerinin yapısal modelleri. (A) MOM'a entegre edilmiş MTCH2'nin yapısal modeli. (B) MTCH2/tBid kompleksinin yapısal modeli (G.Veresov ve Davidovskii, 2014)'ten değiştirilerek kullanılmıştır).

MTCH2'nin mitokondrideki kesin işlevi belirsiz kalsa da elde edilen bilimsel veriler MTCH2 hücresel metabolizma ve apoptoz süreçlerinde rol aldığını göstermektedir. MTCH2 ayrıca mitokondriyal fisyon ve füzyon dinamiklerini düzenlemekle de ilişkilendirilmiştir (Bahat ve ark., 2018; Djajawi ve ark., 2020).

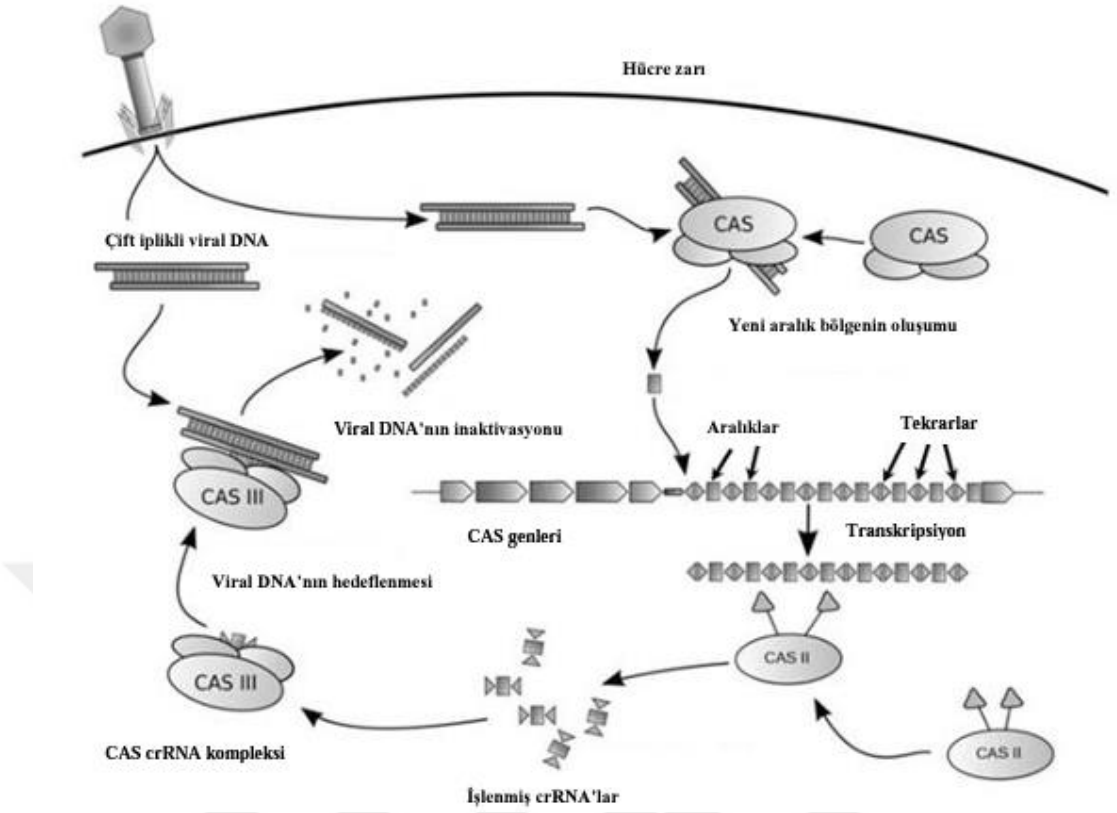
4.8.CRISPR/Cas Teknolojisi ve Gen Düzenleme

CRISPR-Cas sistemini oluşturan düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (*İng. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR*) ve bu kümeler ile ilişkili proteinler (*İng. CRISPR-associated protein / Cas*) birçok bakteri ve arkelerde virüsler ya da yabancı DNA'lara karşı korunma sağlayan bir sistemidir (Barrangou ve Marraffini, 2014). CRISPR-Cas sistemleri CRISPR-ilişkili (Cas) genleri ve bu genlere karşılık gelen CRISPR dizilerini içerir (Nishimasu ve ark., 2014). CRISPR aktivitesi için genellikle CRISPR dizilerine bitişik bulunan ve bir nükleaz enzimini kodlayan CRISPR ilişkili (Cas) genlerin varlığına ihtiyaç vardır (Rath ve ark., 2015). Bu karakteristik CRISPR dizileri yabancı genetik materyalin kısa segmentlerinden türevlenen tekrarlanmayan sekansların tekrarlayan sekanslar arasına girmesi ile oluşturulmuştur (Nishimasu ve ark., 2014) (Şekil 13).

CRISPR bölgeleri ile ilişkili diğer bir özellik, transkripsiyon yönüne göre CRISPR'ın gerisinde yer alan ve lider olarak adlandırılan korunmuş sekansların

varlığıdır. Tekrar bölgelerinin sekansı ve uzunluğu ve aralık bölgelerinin uzunluğu CRISPR bölgesinde çok iyi korunmaktadır, fakat aynı veya farklı genomlarda bu CRISPR bölgeleri farklılık gösterebilmektedir. Tekrar sekansları 21-48 baz çifti (bç) arasında iken, ara bölgeleri 26-72 bç arasındadır. CRISPR bölgesindeki aralık kısımlar birkaç taneden birkaç yüze kadar değişkenlik gösterir (Gün Gök ve Cagdas Tunalı, 2016).

Hücrelerde CRISPR-Cas bağışıklık sisteminin işleyişi üç adımda değerlendirilebilir. İlk adım, dış kaynaklı genomlardan sağlanan DNA parçalarının CRISPR bölgesine entegre edilmesidir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Bu adımda, protoaralıkların seçimi, istilacı plazmid ve bakteriyofaj genomlarında bulunan protoaralık bitişik motiflerin (*İng. protospacer adjacent motif, PAM*) spesifik tanınması ile belirlenir (Jiang ve Doudna, 2015). PAM'lar 2-5 nükleotitten oluşan, yüksek korunmuş dizi motifleridir (Barrangou ve Marraffini, 2014). PAM dizisine sahip yabancı DNA parçası, CRISPR bölgesinde tekrarlayan diziler arasına yerleştirilir. Bakteriye ait CRISPR bölgesindeki tekrarlayan dizilerde PAM tanıma dizilerinin bulunmaması, bakterinin kendi genomunu CRISPR/Cas sisteminden korumasına imkan vermektedir (Jiang ve Doudna, 2015). İkinci adımda, CRISPR bölgesine entegre edilen yabancı DNA'lar üzerinden öncül CRISPR RNA'lar (pre-crRNA) sentez edilir. Pre-crRNA'lar Cas endoribonükleazlar tarafından ekzojen DNA hedef sekanslarıyla Watson-Crick baz eşleşmesi gösteren küçük crRNA'lara dönüştürülür (Savić ve Schwank, 2016). Son aşama, crRNA'ların yabancı DNA'lar üzerinde özgün bölgelere hedeflenmesidir. Bu aşamada crRNA'lar Cas endonükleaz enzimleri ile kompleks oluşturarak DNA üzerinde hedef bölgede kesme işlemi gerçekleşir, bu şekilde viral genomun ya da plazmit DNA'sının çoğalması önlenir (Nishimasu ve ark., 2014) (Şekil 14).



Şekil 14. CRISPR/Cas-III mekanizması: (1) bakteriyi enfekte eden virüs DNA fragmentinin, CRISPR üzerinde tekrarlayan bölgeler arasına entegre edilmesi. (2) CRISPR dizileri üzerinden kodlanan küçük crRNA (CRISPR RNA) dizilerinin oluşumu. (3) Virüs DNA'sında özgün hedef dizilere komplementer crRNA'nın Cas enzimi ile kompleks oluşturması, virüs DNA'sına bağlanması ve virüs DNA'sının kesilmesi (http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/04/sixquestions-about-crisprs.html -Erişim tarihi: 23.03.2022).

CRISPR/Cas sisteminde yer alan Cas proteinleri çok çeşitlidir ve nükleazlar, helikazlar ve RNA bağlanma proteinleri gibi faktörler ile etkileşim gösterirler. Cas1 ve Cas2 proteinleri adaptasyonda rol oynar ve bu proteinler bütün CRISPR-Cas sistemlerinde bulunmaktadır. Diğer Cas proteinleri ise sadece belirli tipte CRISPR-Cas sistemleri ile ilişkilidirler. Cas proteinlerinin çeşitliliği, çoklu CRISPR bölgelerin varlığı ve canlılar arasındaki geçişi CRISPR-Cas sistemlerinin sınıflandırılmalarını zorlaştırmaktadır (Rath ve ark., 2015). Bununla birlikte CRISPR-Cas sistemleri, CRISPR bölgesinin organizasyonu ve Cas genlerine göre üç ana grup (I, II ve III) halinde değerlendirilebilir. Bu gruplarda yer alan sistemler 11 alt tipte (IA'dan I-F'e,

II-A'dan II-C'e, ve III-A'dan III-B'e) değerlendirlmektedir (Jiang ve Doudna, 2015). Tip I sisteminde, oluşan crRNA molekülü Kaskat ve Cas3 proteinleri ile kompleks oluşturarak yabancı DNA'yı kesmektedir. Tip III sisteminde ise pre-crRNA'dan türetilen crRNA molekülleri Cmr/Cas10 veya Csm/Cas10 proteinleri ile kompleks oluştur ve komplekste bulunan Cas enzimleri yabancı DNA'yı kesmektedir. Tip II CRISPR/Cas sistemi, en çok çalışılan ve mekanizması en iyi aydınlatılan sistemdir. Bu sistemde, kodlayıcı olmayan ikinci bir RNA ile birlikte (trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) crRNA ve Cas9 nükleaz enzimi ribonükleoprotein kompleksi oluşturur. Bu kompleks yabancı DNA üzerinde hedef bölgesel kesme işlemini gerçekleştirir (Savić ve Schwank, 2016).

Bakterilerde restriksiyon endonükleaz enzimleri, 1970'li yıllarda bakteriyofajlar üzerine yapılan çalışmalar sırasında keşfedilmiştir (Kelly ve Smith, 1970). DNA üzerinde özgün dizileri tanıyan ve kesme yapan bu enzimler moleküler biyoloji ve genetik çalışmaların seyrini değiştirmiştir. CRISPR/Cas sistemleri restriksiyon endonükleaz enzimleri gibi yabancı DNA molekülleri keserek bu DNA'ların çoğalmasını engelleyen bir tür prokaryotik bağışıklık sistemleridir. Resktriksiyon endonükleaz enzimleri tipik olarak 4-8 bç'den oluşan çift halkalı DNA moleküllerini tanır ve kesme yaparlar. Buna karşın CRISPR/Cas sistemleri daha uzun diziler hedefleyebilmekte ve kolaylıkla herhangi bir DNA ya da RNA molekülünü hedef alacak şekilde manipüle edilebilmektedir (Wilkinson ve Wiedenheft, 2014).

CRISPR/Cas sistemlerinin, özellikle Cas9 tabanlı Tip II sisteminin detaylı olarak karakterize edilmesiyle, bu sistemlerin genom düzenleme çalışmalarında kullanım potansiyeli keşfedilmiştir (Barrangou ve Marraffini, 2014). Tip I ve Tip III CRISPR/Cas sistemleri RNA hedefli nükleaz aktivitesine sahiptirler, ancak bunu büyük bir multrimerik crRNA-Cas ribonükleoprotein kompleksi ile yapmaktadırlar. Bu da bu sistemlerin gen düzenlemede moleküler bir araç olarak geliştirilmelerini zorlaştırmaktadır. Buna karşın Tip II sistemi hedef DNA molekülünü kesen tek bir endonükleaz enzimine dayanmaktadır (Sapranauskas ve ark., 2011). 2013 yılı içerisinde, RNA hedefli Cas9 sisteminin genom düzenleme, genetik taramalar ve gen ekspresyonu düzenlemesi için kullanıldığı bilimsel çalışma ve yayınların sayısında çok büyük artış olmuştur (Pennisi, 2013). Bu tez çalışması kapsamında da HEK293

hücrelerinde MTCH2 proteinini kodlayan *MTCH2* geninin inaktive edilmesinde CRISPR/Cas9 sisteminden yararlanılmıştır.

CRISPR/ Cas9 sisteminin DNA'yı hedeflemek için endonükleaz enzimi ile birlikte crRNA ve tracrRNA'ya gereksinim vardır (Barrangou ve Marraffini, 2014). TracrRNA ile crRNA tek bir rehber RNA şeklinde *(İng. single-guided RNA-sgRNA*) birleştirilebilmektedir. sgRNA'daki crRNA bölgesi hedef diziyi tanıma işlevini korurken, sgRNA'nın ikincil yapısı Cas9 enzimi ile kompleks oluşturma imkanı tanımaktadır (Jinek ve ark., 2012). CRISPR/Cas9 sisteminde sgRNA'nın crRNA bölgesi başka bir DNA dizisini hedeflendirmek için kolayca değiştirilebilmektedir (Hsu ve ark., 2014). Bu durum, geçmişte üzerinde çokça çalışılan ZFN *(İng. zinc finger nuclease)* ve TALEN (*İng. Transcription activator-like effector nuclease*) enzimlerinde oluğu gibi, Cas9'u da genetik mühendisliği aracı olarak kullanmasına olanak sağlamıştır (Gün Gök ve Cagdas Tunalı, 2016). Bununla birlikte CRISPR-Cas9 sistemi ZFN ve TALEN'in aksine, çok daha geniş hedefleme olanağı sunmakta hem de insan hücrelerinde metillenmiş DNA'ları da kesebilmektedir. Bu da diğer nükleazlar ile yapılamayan genetik modifikasyonlara izin vermektedir (Bortesi ve Fischer, 2015; Gün Gök ve Cagdas Tunalı, 2016).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Amido black	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
bis-Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
DAPI(4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glikoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
Magnezyum sülfat	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD

Polietilenglikol-4000	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma Aldrich, ABD
PIPES	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin (PEI)	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum fosfat	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Puromisin	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum deoksikolat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dihidrojen fosfat	Merck, Almanya
Disodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	Sigma Aldrich, ABD
Triptofan	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
2- β -Merkaptoetanol	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonükleazları:

Gen klonlama çalışmalarında, plazmit vektörünün kesimi ve elde edilen plazmit DNA'larının kontrolü çalışmalarında *ApaLI, BbsI, DraI, EcoRV, EcoO109I, ApaLI*

ve *SmaI* (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri

Alkalen fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase) (MBI Fermentas), T4 polinukleotid kinaz (New England Biolabs) ve T4 DNA Ligaz (TaKaRa) kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar

Taq DNA polimeraz (Biotechrabbit, Episozyme veya New England Biolabs) ve Phusion high-fidelity DNA polimeraz (Thermo Scientific) enzimleri kullanıldı.

Diğer enzimler

Komplementer DNA (cDNA) sentezinde reverz transriptaz (Toyobo ya da New England Biolabs) ve DNA/RNA kontaminsayonlarının giderilmesi amacıyla DNaz ve RNaz enzimlerinden yararlanılmıştır.

5.3.Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, RNA izolasyon kiti (Qiagen Cat No./ID: 74104), Lusiferaz assay kiti (Roche Cat.No. 11 814 06 001 ve Promega), Renilla (*Renilla reniformis)* lusiferaz assay kiti (Promega), SEAP assay kiti (Roche, Mannheim, Almanya # 31420), *qPZR Master* karışımı (Thermo ya da Episozyme), orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Western melezleme ve immünfloresan test deneylerinde aşağıdaki tabloda (Tablo 1) verilen birincil ve ikincil antikorları kullanıldı.

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

Birincil Antikorlar:

Antikor adı	**Antikor çeşidi**	**Antikor kaynağı**	**Üretici/Kodu**
Anti-HA	Monoklonal	Fare	Santa Cruz#sc7392
Anti-M1	Poliklonal-antiserum	Tavşan	-
Anti-aktin	Monoklonal	Fare	Abcam#ab11003

İkincil Antikorlar:

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

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı etüv	N-Biotek, Güney Kore
Çalkalayıcı su banyosu	GFL, Almanya
Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet, ABD
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklav	Kermanlar, Türkiye

Soğutmalı santrifüjler	Backman ve Sigma, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Ters/Inverted mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Dikey jel elektroforez cihazları	Omnipage, İngiltere; Bio-Rad, ABD
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
Luminometre	Promega, ABD
Steril çalışma kabini	Holten, Danimarka
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Floresan mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Hassas terazi	Shimadzu, Japonya
Su banyoları	GFL-Thermolab ve Isolab, Almanya
PZR cihazları	ABI : ABD / Techne : ABD
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
CO_2 etüv	Sanyo, Japonya
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	Bio-Rad, ABD
DP72 Peltier Soğutmalı Kamera Bağlı Floresan Mikroskop	Olimpus, Japonya

5.6.Besiyerleri

5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri

10 gr tripton (Bacto), 10 gr sodyum klorür ve 5 gr maya özütü (Bacto) distile su içerisinde çözdürüldü ve hacmi 1 litre olacak şekilde besiyeri hazırlandı. Hazırlanan LB besiyeri, 1 atmosfer basınç altında, 121 °C'da, 20 dakika boyunca otoklavda steril hale getirildi.

5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri

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

5.6.3. Memeli hücrelerinde kullanılan besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde besiyeri olarak glukoz konsantrasyonu 1 g/L olan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)* (Gibco, ABD) kullanıldı. Öncelikle 4x konsantre stok besiyeri hazırlandı. Bunun için 20 g toz haldeki DMEM, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Steril etmek amacıyla iki kez iki farklı 0,2 µm filtrelerden geçirildi. Hücreleri üretme besiyeri, 125 ml 4x konsantre DMEM, 375 ml steril distile su, 50 ml FCS (fetal calf serum) ve 5,5 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin (Gibco) karıştırılarak hazırlandı. Besiyerine 3 ml %7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH 7,3-7,4'e ayarlandı.

5.6.4. Muhafaza Besiyeri (x2)

25 ml 4x konsantre DMEM besiyerleri 2 ml % 10 BSA, 1 ml x100 vitamin çözeltisi (Gibco), 1 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin, 2 µl % 0.25 TPCK tripsin (kimotripsini inaktive etmek için TPCK "N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone" ile işlem görmüş tripsin) çözeltisi steril distile su ile 50 ml'ye tamamlandı ve % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi ile pH'si ayarlandı. Plak testlerinde agaroz içeren muhafaza besiyeri kullanıldı. Bunun için distile su içerisinde hazırlanan % 1.2 (a/h) agaroz, 121 ºC'da 20 dakika otoklavlandıktan sonra 42-44 ºC'a soğutuldu ve x2 konsantre muhafaza besiyeri ile eşit hacimde karıştırılarak kullanıldı.

5.6.5. Serum içermeyen DMEM besiyeri

Plak testlerinde hücrelerin yıkama işlemleri için serum (FCS) içermeyen DMEM besiyeri kullanıldı. Bunun için, 50 ml 4x konsantre DMEM ve 150 ml steril deiyonize distile su karıştırıldı. Ortama 0,5 ml % 7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH ayarı yapıldı.

5.7.Çözeltiler

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

29,0 g akrilamid ve 1 g bis-akrilamid distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve 4 °C'da muhafaza edildi.

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

0,5 gr amido black boyar maddesi 50 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 (APS) çözeltisi (%10 – a/h)

1 g amonyum persülfat, distile su içinde çözündürüldü ve hacmi 10 ml'ye tamamlanarak -20 °C'da saklandı.

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

25 g yağı alınmış süt tozu, bir miktar distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS ve 1 ml %10 sodyum azid (NaN_3) eklendikten sonra toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'da muhafaza edildi.

5.7.5. Etidyum bromür (10 mg/ml)

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

5.7.6. %70 Etil alkol

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

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

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

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

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

°C'da Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanılmak amacıyla 4-8 °C'da muhafaza edildi.

5.7.9. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)

40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 ve 21,6 g $Na_2HPO_4.7H_2O$, 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 kullanılacağı zaman konsantre T-FTS steril distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

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

5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)

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

5.7.12. Kapatma çözeltisi

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

5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0,55M)

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

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

Eşit hacimde metanol ve glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

5.7.15. %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi

5 g (4,72 ml) NP-40, distile su ilave edilerek hacmi 50 ml olacak şekilde hazırlandı. (NP-40, d: 1,06 g/ml)

5.7.16. Paraformaldehit çözeltisi

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

5.7.17. 1,4-piperazindietanesulfonik asit (PIPES) çözeltisi (1 M)

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

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

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

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

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

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

0,2 g polietilenimin distile su içinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildikten sonra -10 °C'de muhafaza edildi.

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

29,44 g potasyum asetat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Potasyum asetat, Mw:98,14).

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

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

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

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

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

93,2 g potasyum klorür distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı (Potasyum klorür, Mw:74,55).

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

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

5.7.26. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)

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

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

10 g SDS, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

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

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

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

36,6 g sodyum klorür, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 250 ml'ye tamamlandı (Sodyum klorür, Mw:58,5).

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

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

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

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

5.7.32. %0,25 Tripsin çözeltisi

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

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

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

5.7.34. Tween-20 çözeltisi (%10)

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

5.8. Tamponlar

5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M PIPES, 2 ml 2,5 M $CaCl_2$, 50 ml 1 M KCl ve 120 ml distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6,8'e ayarlandı. Daha sonra çözelti üzerine 20 ml 0,55 M $MnCl_2$ eklendi, hacmi distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0,2 µm fitreden geçirilerek steril hale getirildi.

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

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

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

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

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

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

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

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

5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

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

5.8.7. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, %0,4 SDS– a/h, pH 8,8)

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

5.8.8. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 – a/h SDS, pH 6,8)

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

5.8.9. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0,125 M Tris, 1,25 M Glisin, pH 8,3)

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

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

200 ml 5x Tris-Glisin tamponu, distile su ile 790 ml'ye tamamlandı, üzerine 10 ml %10 SDS eklendi.

5.8.11. Protein transfer tamponu

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

5.8.12. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M tris; %8 SDS - a/h; %0,2 bromofenol mavisi - a/h ; %4 2-merkaptoetanol - h/h; %40 gliserin - h/h, pH 6,8)

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

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

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

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

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

5.8.15. 20x Konsantre TBS tamponu

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

5.8.16. TBS ve TBS-T tamponu

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

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

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

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

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

5.9. Plazmit Vektörler

Bu tez çalışmasında kullanılan plazmitlerin bir kısmı tez kapsamında oluşturulan, bir kısmı ticari olarak temin edilen, bir kısmı da daha önce farklı çalışmalarda oluşturulan plazmitlerdir. Çalışmada, insan MTCH2 (*İng. Mitochondrial carrier homolog protein 2*) proteinin hücrelerde geçici ekspresyonunda kullanılan pCHA-MTCH2 plazmiti farklı bir proje kapsamında (TÜBİTAK Projesi/112S518) oluşturulmuştur. HEK293 hücrelerinde influenza A virüsü RNA polimeraz enziminin geçici sentezinde ve/veya konak hücre proteinlerinin viral RNA polimeraz enzimine etkilerini belirlemede minireplikon testlerinde (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018) tarafından oluşturulan; influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler [pCAGGS-PB2(W), pCAGGS-PB1(W), pCAGGS-PA(W), pCAGGSPB2(D), pCAGGS-PB1(D) ve pCAGGS-PA(D)], nuklear protein (NP) kodlayan plazmitler [pCAGGS-NP(W) ve pCAGGS-NP(D)] ve pHH21-vNS-Luc belirteç (reporter) plazmiti kullanıldı. Minireplikon sistemi ile influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi aktivitelerinin belirlenmesi çalışmalarında hücre içi kontrol için (normalizasyon) SEAP (*İng. Secreted embryonic alkaline phosphatase*) enzimini kodlayan pSEAP plazmit vektöründen yararlanıldı. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak *MTCH2* 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

Konak proteinlerinin viral replikasyona etkileri ve viral proteinler ile etkileşimlerinin saptanması için yapılan enfeksiyon deneylerinde insan tipi influenza A/WSN/33-H1N1 (WSN) ve kuş tipi influenza A/duck/Pennsylvania-H5N2 (DkPen) virüsleri kullanıldı. Virüs titresi, standart plak testleri ile saptandı.

5.11. Bakteriler

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

5.12. Memeli Hücre Hatları

Memeli hücrelerinde insan MTCH2 proteininin influenza A virüsü polimeraz enzimi ile ilişkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda insan orijinli HeLa (servikal kanser hücreleri), HEK293 (embriyonik böbrek hücreleri) ve plak test deneylerinde MDCK (Madin-Darby Canine böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarından HeLa ilk olarak 1951 yılında Henrietta Lacks isimli serviks kanseri bir hastasının kanserli dokusundan George Gey (Jones ve ark., 1971) tarafından izole edilmiş ve hücre hattı olarak üretilmiştir. HEK-293 hücre hattı ise 1970'li yıllarda Graham ve Alex Van der Eb (Graham ve van der Eb, 1973) tarafından oluşturulmuştur. HEK293 hücreleri hızlı çoğalmaları ve DNA transfeksiyon frekansının yüksek olması gibi özellikleri nedeniyle bilimsel araştırmalarda tercih edilirler. MDCK hücre hattı ise Stewart H. Madin ve Norman B. Darby, Jr., tarafından yetişkin bir Cocker Spaniel köpeğinin böbrek tübülü epitel hücrelerinin 1958'de ilk izolasyonunun ardından, kendi adlarını taşıyan hücre dizisi öncelikle memeli hücrelerinin viral enfeksiyonu için bir model olarak kullanıldı (Gaush ve ark., 1966).

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

Plazmitlerin oluşturulması ve çoğaltılması aşamalarında konak bakteri olarak *E. coli* DH5α ve/veya Mach1 ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C'da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine steril koşullarda ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece üretildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden 2-3 koloni steril kürdan ile alındı ve 5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Bakteriler 37 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında bir gece üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik doygun kültür 200 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 25 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi. Kültürün 600 nm dalga boyunda optik densite (OD_{600}) değeri ortalama 0,25-0,3'e

eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 7000 dev/dak hızda santrifüj edildi ve bakteriler çöktürüldü. Çökelti her bir tüp için 10 ml bakteri transformasyon tamponu içerecek şekilde süspanse edildi ve 20 dakika buzlu su içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 7000 dev/dak hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 20 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 935 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

5.14. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada DNA moleküllerinin analizinde %1-1,5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Bunun için 1 g ya da 1,5 g agaroz 100 ml deiyonize distile su içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 65-70 °C'a düştüğünde üzerine 1,5 ml 50x konsantre TAE ve 0,1-0,2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi. Çözelti yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel, katılaştıktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. Agaroz jel de yürütülen DNA örnekleri UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.15. 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). 0,5 gr agaroz 47 ml distile su içerisinde, mikrodalga fırınında 3 dakika süre ile kaynatıldı ve sonrasında 1 ml TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 ºC'a kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 2 ml ticari sodyum hipoklorit eklendi ve jel kasetine döküldü. Katılaşan agaroz jel 1x TAE tamponuna alındı. RNA örnekleri 2x RNA yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı, 65 ºC'da 5 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 45-50 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrasında jeller 0,5 µg/ml konsantrasyonunda etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 40 devir/dakika hızında bir çalkalayıcı

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

5.16. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

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

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

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

[OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülen örneklerin absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; Kd, (50 µg/ml)]. DNA örneklerinin OD_{260}/OD_{280} değerlerine bakılarak saflıkları hakkında fikir edinildi. (Bu oran kaliteli DNA için ~1,8; RNA için ~2,0 olmalıdır) (Wood, 1983).

5.17. 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 DMEM besiyeri bulunan 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 5 ml DMEM besiyeri içinde süspanse edildi ve içerisinde 10 ml DMEM 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 DMEM 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 %10 (h/h) DMSO içeren FCS içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonları 0,75-1 ml'lik porsiyonlar halinde 2-3 saat -20 °C'da bekletildi ve sonrasında -80 °C'a ayarlı derin dondurucuya aktarıldı.

5.18. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Kültür plaklarında (12-kuyulu veya 6-kuyulu) DMEM besiyerinde üretilen hücreler 5-10 dakika tripsin/EDTA çözeltisinde bekletildi. Petri yüzeyinden koparılan hücreler, uygun hacimde besiyerinde süspanse edildi ve 1000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi, 200 µl T-FTS içerisinde yeniden süspanse edildi ve RNA izolasyonunda kullanıldı. Total RNA izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Roche) kullanıldı ve üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu üzerine 350 µl liziz çözeltisi eklendi ve hücrelerin bir enjektör yardımıyla iyice parçalanmaları sağlandı. Hücre lizatı kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 10 000 dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. RNA bağlı kolon, sırasıyla 500 µl yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son aşamada kolona 50-75 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10000 dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edilerek RNA molekülleri elüe edildi. Ekstre edilen RNA örnekleri reverz (ters) transkripsiyonda kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

5.19. Total RNA Üzerinden cDNA'ların Hazırlanması ve Elde Edilmesi

Tez çalışmamda *MTCH2* geninin transkript düzeyinin azaldığı, arttığı ve tamamen susturulduğu durumlarda virüs replikasyonunun hücreye etkisini araştırmak amacıyla farklı plazmitler kullanılmıştır. Bu plazmitler ve siRNA'lar ile transfekte; virüs ile enfekte edilen HEK293 ve HeLa hücrelerinden total RNA'lar ekstre edildi. RNA'lar agaroz jel elektroforezi tekniği ile kontrol edildikten sonra oligo-dT ve/veya spesifik primerler kullanılarak cDNA'ların hazırlanmasında kullanıldı.

5.19.1. Hücrelerden Total RNA'nın İzole Edilmesi

HeLa ya da HEK293 hücreleri DMEM besiyeri içeren 6-kuyulu ya da 12 kuyulu kültür plakalarına ortalama 1-5x10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler standart

kültür koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 5 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler besiyerinde (2-3 ml) süspanse edildi ve 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilerek çökeltildi. Hücrelerden total RNA ekstraksiyonunda 5.18.'de verilen yöntem izlendi. RNA örnekleri eşit hacimlerde 2x konsantre RNA jel yükleme tamponuyla karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 30 dakikada tamamlandı (bk. 5.15.). Jeller 0.5 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 30 dakika bekletildi ve sonrasında deyonize distile su içerinde en az 30 dakika düşük hızda karıştırılarak yıkandı. RNA bantları UV transillüminatör ile görüntülendi.

5.19.2. RNA'ların Kontrol Edilmesi

Ekstre edilen RNA örnekleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Aranda ve ark., 2012). 1 gram agaroz 94 ml distile su içerisinde, mikrodalga fırınında 3 dakika süre ile kaynatıldı ve sonrasında 2 ml TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 ºC'a kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 4 ml ticari sodyum hipoklorit eklendi ve jel kasetlerine döküldü. Katılaşan agaroz jel 1x TAE tamponuna alındı. RNA örnekleri 2x RNA yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı, 65 ºC'da 5 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 30-45 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrasında jeller 0,5 µg/ml konsantrasyonunda edityum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 40 devir/dakika hızında bir çalkalayıcı üzerinde 1 saat süre ile çalkalandı. RNA moleküllerine bağlanmayan etidyum bromür kalıntılarını uzaklaştırmak için jeller deiyonize distile su ile 30 dakika 40 devir/dakika hızında yıkandı. RNA molekülleri UV transillüminatörde görüntülendi ve bir dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

5.19.3. cDNA'ların Elde Edilmesi (Revers Transkripsiyon)

Hücrelerden ekstre edilen total RNA'lardan reverz transkripsiyon ile cDNA'lar elde edildi. Revers transkripsiyon reaksiyonu 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 0.2 ml'lik PZR tüplerine yaklaşık 1µg total RNA ve 10 pmol oligo dT ya da gene özgü primer eklendi ve hacim 10 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 ºC'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra ortama aşağıda verildiği

şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından 10 µl eklendi ve reaksiyon 45 ºC'da 60 dakikada tamamlandı. Sonrasında enzimler 20 dakika 70 °C'da inaktive edildi ve elde edilen cDNA'lar, klonlama ve PZR deneylerinde kalıp olarak kullanıldı.

Reaksiyon Karışımı

Reaksiyon Tamponu(x10)	:	2,0 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	4,0 µl
RNaz inhibitörü (40U/ µl)	:	0,5 µl
Reverz transkriptaz (200 U/ µl)	:	1,0 µl
Deiyonize distile su	:	2,5 µl
Toplam hacim	:	10 µl

5.19.4. cDNA'ların ACTB ve NS1 Geni Üzerinden Kontrol Edilmesi

Reverz transkripsiyonun kontrolü Aktin β (ACTB) cDNA'larının PZR ile çoğaltılması ve reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenerek yapıldı. PZR için cDNA'lar ve gene özgü primerler (Invitrogen) kullanılarak aşağıda verilen karışımlar hazırlandı.

Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	2,0 µl
İleri/Geri primer karışımı (5 pMol/ µl)	:	6,0 µl
dNTP Karışımı (2,5 mM)	:	1,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	:	2,0 µl
Tampon (x5)	:	2,0 µl
Deiyonize distile su	:	6,8 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	:	0,2 µl
Toplam hacim	:	20 µl

PZR, 95 °C sıcaklıkta 2 dakikalık ön denatürasyon sonrasında, 95 °C'da 15 saniye, 56 °C'da 20 saniye ve 74 °C'da 20 saniye şeklinde 34 döngü halinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmeye alındı.

Spesifik primerle çoğaltılmış olan cDNA'ların kontrolü ise gene özgü primerler ile yapılan PZR sonucuna göre değerlendirildi. Reaksiyon ürünleri agaroz jel

elektroforezi ile incelendi. PZR için cDNA'lar ve gene özgü primerler (Invitrogen) kullanılarak aşağıda verilen karışımlar hazırlandı.

Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	2,0 µl
İleri/Geri primer karışımı (5 pMol/ µl)	:	4,0 µl
dNTP Karışımı (2,5 mM)	:	1,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	:	2,0 µl
Tampon (x5)	:	2,0 µl
Deiyonize distile su	:	9,0 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	:	0,5 µl
Toplam hacim	:	20 µl

PZR, 95 °C sıcaklıkta 2 dakikalık ön denatürasyon sonrasında, 95 °C'da 15 saniye, 55 °C'da 15 saniye ve 74 °C'da 20 saniye şeklinde 35 döngü halinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmeye alındı.

5.19.5. Genlerin cDNA'lar Üzerinden Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması

HEK293 hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden oligo dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı. Reverz transkripsiyon reaksiyonu 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA insan *MTCH2* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı. Knockout edildiği düşünülen insan *MTCH2* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında ve dizi analizlerinde kullanılan primerlerin oluşturulmasında, NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerden yararlanıldı. (MTCH2/NCBI Reference Sequence: XM_005252842.1). Bu gen dizileri üzerinden oluşturulan primerler ise MTCH2 F: ATCATGGTACAGTTCATTGGCAG, MTCH2 R: ATTCAAATTAACATTTTCAGGTCAC).

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	4,0 µl
İleri Primer (10 pMol/ µl)	:	2,0 µl
Geri Primer (10 pMol/ µl)	:	2,0 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	3,0 µl
Tampon (x5)	:	8,0 µl
Deiyoize distile su	:	21,0 µl
Phusion High Fidelity DNA Polimeraz (2 U/µl)	:	0,3 µl
Toplam hacim	:	**40,0 µl**

Reaksiyon koşulları, 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 35 döngü, "95°C - 15 sn" / "54°C- 15 sn" / "74°C-30 sn" ve bir döngü 74 °C'da - 5 dk olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.20. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

Tez çalışması kapsamında insan MTCH2 proteini ile influenza A virüsü M1 proteini arasındaki ilişkiyi memeli hücrelerinde araştırmak amacıyla bir dizi ekspresyon vektörü oluşturuldu. İnsan orijinli HEK293 hücrelerinde doğal ve *knockout* olma olasılığı taşıyan MTCH2 proteinlerini kodlayacak plazmit vektörler, *MTCH2* cDNA'larının pCHA ve pM plazmitlerine klonlanması ile elde edildi. HEK293 *knockout* olduğu düşünülen hücre hatlarından elde edilen insan *MTCH2* cDNA'larını içeren pM vektörleri ve *knockout* edilmesi planlanan MTCH2 hedef dizisi içeren CRISPR/cas9 vektör plazmiti bu tez kapsamında oluşturulmuştur. Tam boyutta *MTCH2* cDNA'sı taşıyan pCHA-MTCH2 plazmiti başka bir proje (TÜBİTAK Projesi/112S518) kapsamında oluşturulmuştur. İnsan *MTCH2* cDNA'sı HEK293 cDNA kitaplığı üzerinden, fosforillenmiş 5'-ATCATGGTACAGTTCATTGGCAG-3'(MTCH2-For) ve 5'-ATTCAAATTAACATTTTCAGGTCAC-3'(MTCH2-Rev) primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltılmış ve EcoRV restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmitinde

(https://www.addgene.org/vector-database/2173/ , Erişim tarihi: 23.03.2022) tavuk ovalbumin geni kontöründe klonlanmıştır

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan primerler ve nükleotid dizileri.

Primer adı	Nükleotid dizisi (5'- 3')
pM-Seq-For	TCATCGGAAGAGAGTAG
pM-Seq-Rev	AAAGCAAGTAAAACCTCTAC
MTCH2-For	ATCATGGTACAGTTCATTGGCAG
MTCH2-Rev	ATTCAAATTAACATTTTCAGGTCAC
NS1-DKP 542-For	TCATCGGTGGACTTGAATGG
NS1-DKP 668-Rev	TCTGACTCAACTCTTCTCGC
MTC-CRP-F1	CACCGGCAGAGAATCCAAGTACTG
MTC-CRP-F2	CACCGTTCCATAATAACCATCTAT
MTC-CRP-R1	AAACCAGTACTTGGATTCTCTGCC
MTC-CRP-R2	AAACATAGATGGTTATTATGGAAC
CRP Seq-For	GATACAAGGCTGTTAGAGAG
Aktin 280 For	ATGGAGTCCTGTGGCATCC
Aktin 552 Rev	CCAGCACAATGAAGATCAAG

Maya ikili hibrit metodu ile yapılan testler sonucunda infuenza A virüsü ile ilişkili olduğu saptanan insan MTCH2 proteininin, 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 *MTCH2* genini hedef alacak rehber oligonükleotidler oluşturuldu ve plazmit vektöründe U6 promotörü kontrolünde klonlandı.

5.20.1. MTCH2 Genini Hedef Alan Rehber RNA'lar Kodlayacak Oligonükleotidlerin Tasarlanması

Çalışmada insan hücrelerinde *MTCH2* geninin hedef alan rehber RNA'ları kodlayacak oligonkleotidler GenScript programı (https://www.genscript.com/ , Erişim tarihi: 23.03.2022) kullanılarak tasarlandı. *MTCH2* geni için iki hedef bölge seçildi.

Rehber RNA'ları kodlayacak oligonukleotitler:

MTC-CRP-F1

5'-CACCGGCAGAGAATCCAAGTACTG-3'

MTC-CRP-R1

5'-AAACCAGTACTTGGATTCTCTGCC-3'

MTC-CRP-F2

5'–CACCGTTCCATAATAACCATCTAT–3'

MTC-CRP-R2

5'–AAACATAGATGGTTATTATGGAAC–3'

Oligonukleotidler T4 polimukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi (bkn. 5.22.3.) Fosforillenmiş komplementer oligonükleotidler eşit miktarlarda karıştırıldı ve birbirine bağlanmaları *(İng. annealing)* için karışım 95 °C sıcaklıkta 2 dakika bekletildi ve sonrasında 0,1°C/saniye hızda soğutmaya ayarlı PZR cihazında kademeli olarak 25 °C'a kadar soğutuldu. Çift zincirli hale getirilen kısa DNA fragmentleri klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20.2. Cas9 ve Rehber RNA Kodlayan Plazmit Vektörün Hazırlanması

Çalışmada, *MTCH2* genini hedef alan rehber RNA'lar için tasarlanan çift zincirli DNA fragmentleri pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne, U6 promotörü kontrolündeki trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) kodlayan dizinin sonunda yer alan *BbsI* enzimi hedef bölgesine klonlandı. Bu nedenle pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü *BbsI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlem için 50 µl'lik hacim içerisinde 2 µg plazmit DNA'sına 5 µl 10x konsantre tampon (NEBuffer 2.1) ve 0.5 µl *BbsI* (5 U) enzimi eklendi. Reaksiyon ortamı, *Bbs*I enzimini inaktive etmek amacıyla 20 dakika

65 °C'da bekletildi. Plazmit DNA'nın defosforilasyonu için örnek üzerine 2 µl (2U) SAP enzimi eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Sonrasında örnekler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve plazmit DNA'sı etil alkol ile çökeltildi. Kesilmiş defosforile DNA örneği kurutuldu, 25 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20.3. 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 çift zincirli oligonukleotid örnekleri karıştırıdı. Ligasyon ve transformasyon işlemi 5.22.3.'te 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.

5.21. **Vektörlerin PZR ile Kontrolü**

Küçük ölçekte hazırlanan pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmit vektörleri için ön kontroller PZR tekniği ile yapıldı. Primer olarak cas/MTCH2-R1 ve cas/MTCH2-R2 ve CF Seq-For kullanıldı.

Reaksiyon Karışımı

DNA	:	2,0 µl
İleri primer (10 pMol/ µl)	:	1,1 µl
Geri primer (10 pMol/ µl)	:	1,1 µl
dNTP Karışımı (2,5 mM)	:	1,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	:	2,0 µl
Tampon (x10)	:	2,0 µl
Deiyonize distile su	:	11,0 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	:	0,2 µl
Toplam hacim	:	20 µl

Reaksiyon koşulları, 95 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 35 döngü, "95°C - 15 sn" / "53°C- 15 sn" / "72°C- 1 dk" ve bir döngü 72 °C'da - 5 dk olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.22. CRISPR/Cas9 tekniği ile *MTCH2* geninin susturulması

HEK293 hücrelerinde MTCH2 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonunu nasıl etkilendiğini saptamak amacıyla, CRISPR/Cas9 tekniğinden yararlanılarak bu proteini kodlayan genin susturulmasına (*İng. knock out*) yönelik çalışmalar yapıldı.

5.22.1. HEK293 Hücrelerinin *MTCH2* Genine Özgü Rehber RNA Kodlayan Vektörlerle Transfeksiyonu

HEK293 hücreleri 5.24.'te belirtildiği şekilde *MTCH2* genini susturmak için oluşturulan plazmit vektörler (pCas9-MTCH2-1, pCas9-MTCH2-2) ile transfekte edildi. HEK293 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 gen için iki ayrı bölgede aynı anda hedef olacak şekilde iki plazmit vektörün karışımı ile (pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2) ile transfekte edildi. Transfeksiyon için toplamda 2 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.

5.22.2. *MTCH2* Geni Bakımından *Knockout* Olma Olasılığı olan Hücre Klonlarının Seçilmesi

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü memeli hücrelerinde seleksiyona olanak tanıyan puromisin direnç geni taşıması sebebiyle plazmit almayan hücreleri bertaraf amacıyla puromisin antibiyotiği kullanıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra kültürlerin besiyerlerine 0,50 µg/µl, 1 µg/µl veya 2 µg/µl final konsantrasyonda olacak şekilde puromisin eklendi ve inkübasyona devam edildi. İki 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 5 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 24-kuyulu plaklara aktarılarak çoğalmaları sağlandı. Tek bir hücreden türetilen hücre klonlarının mRNA üzerinden *MTCH2* geni bakımından knock out olup olmadıkları analiz edildi.

5.22.3. **CRISPR/Cas9 Tekniği ile *MTCH2* Geni Bakımından *Knockout* Edilen Hücrelerin Analiz Edilmesi**

Knockout olduğu düşünülen hücre klonlarında *MTCH2* genlerinde bir bozulma olup olmadığı; bu hücrelerden hazırlanan *MTCH2* cDNA'larının üzerinde çoğaltılan *MTCH2* gen fragmentlerinin DNA dizi analizleri ile incelenmesi ile belirlendi. Bunun için hücre klonlarından total RNA izolasyonu yapıldı. Her molekül izolasyonunda da ticari kitler kullanıldı. Total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı (bkz. 5.19.3). Daha sonra *MTCH2* genine özgü primerler kullanılarak PZR ile *MTCH2* cDNA'ları çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bkz. 5.22.3.). cDNA'lar üzerinde Cas9 enzimine hedef olan bölgeler DNA dizi analizi ile incelenmesi amacıyla analiz için örnekler gönderildi.

MTCH2 cDNA'larının Dizileme Plazmitine Klonlanması:

Hücre lizatından elde edilmiş olan DNA örneklerinin sekans dizileme yöntemi sonucunda çakışan ve kesin sonuç vermeyen kromatogramlar edildiği için, her bir cDNA'nın bir plazmit vektörüne aktarılıp tek tek dizilenmesine karar verildi. Bu amaçla cDNA'lar pM plazmit vektörüne klonlandı. Bunun için cDNA'larının çoğaltılmasında kullanılan sentetik oligonukleotid primerler PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi. Fosforilasyon için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C'da 1 saat bekletildi. Sonrasında 70

°C'da 10 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı. Reaksiyon sonrasında örneklere 20 µl deiyonize distile su eklenerek primer konsantrasyonu 5 pMol olacak şekilde seyreltildi. Sonrasında fosforillenmiş primerler PZR çalışmasında kullanılmak amacıyla -20 °C'da muhafaza edildi.

Reaksiyon Karışımı

İleri Primer (59 nMol/ µl)	:	2,0 µl
Geri Primer (43 nMol/ µl)	:	2,0 µl
rATP karışımı (10 mM)	:	10,0 µl
Reaksiyon Tamponu (x10)	:	2,0 µl
Deiyoize distile su	:	3,0 µl
T4 polinükleotid kinaz (10 U/µl)	:	1 µl
Toplam hacim	:	**20,0 µl**

PZR reaksiyonları 0.2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

cDNA	:	1,0 µl
Fosforillenmiş İleri/Geri Primer karışımı (5 pMol/ µl)	:	4,0 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	3,0 µl
Tampon (x5)	:	8,0 µl
Deiyoize distile su	:	24,0 µl
Phusion DNA Polimeraz (2 U/µl)	:	0,4 µl
Toplam hacim	:	**40,0 µl**

Reaksiyon koşulları, *MTCH2* geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 34 döngü, 95°C-15 sn / 54°C-30 sn / 74°C-30 sn ve bir döngü 74°C-5 dk'da bir döngü olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jelinden Ekstraksiyonu:

DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bunun için örneklerin üzerine 10 µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendi ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası oluşan DNA bantları, UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin agaroz jelden geri alınmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı. İşlemler kit için önerilen yönteme uygun olarak gerçekleştirildi. 30 µl elüsyon tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Dizileme plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması:

Klonlama işlemlerinde, genlerin okuma çerçevelerinin DNA dizinin kodon çerçevesi ile uygunluğu dikkate alındı. Bu nedenle pM plazmit vektörü, SmaI restriksiyon enzimi hedef bölgesinden kesilerek doğrusal hale getirildi. Bunun için 5 µg pM plazmit DNA'sı (10 µl), deiyonize distile su ile 100 µl'ye tamamlandı, üzerine 10 µl 10x konsantre Tango Buffer (Thermo) ve 2 µl (10U) SmaI restriksiyon endonükleazı eklendi ve 30°C'da 1 gece boyunca kesime bırakıldı. Ertesi gün plazmit vektörünü defosforilize etmek amacıyla karışımın içine direkt olarak 4 µl SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 1U/µl -Fermentas) ile defosforile edildi. Bu işlem için örnekler 1 saat boyunca 37 °C'da inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA'sı fenol: kloroform ile ekstre edildi. Bunun için karışımın içine 1:1 oranında fenol:chloroform eklendi ve iyice karışması sağlandı. Sonrasında örnekler 10 dakika boyunca 12000 devir/dakika'da santrifüj edildi. Tüplerde görülen faz ayrımında üst faz dikkatlice yeni tüplere alındı. Bu sıvılara Na-asetat tuzu eklendi, karıştırıldı ve örnekler %100 alkol çözeltisiyle muamele edilip tekrar 5 dakika boyunca 12000 devir/dakika'da santrifüj edildi ve %70'lik etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi 40 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Doğrusal Hale Getirilen Dizileme Plazmit Vektörünün cDNA'lar ile Ligasyonu ve Transformasyonu:

Doğrusal hale getirilen pM plazmit DNA'sı ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılan *MTCH2* cDNA örneklerinin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 10 µl hacim içerinde T4- DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 25-30 ng pM plazmit DNA'sı, 30- 50 ng arasında değişen miktarlarda cDNA ile karıştırıldı. Reaksiyon ortamına 2 µl 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 1 µl (1U) T4 DNA ligaz (TaKaRa) enzimi eklendi. Ligasyon işlemi oda sıcaklığında bir gece boyunca gerçekleştirildi. Kompetent hale getirilen *E. coli* Mach1 hücrelerden 150 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 80 sn 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 katı besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37°C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, pozitif transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlanarak küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması:

Transformasyon sonrası, her bir ligasyon örneği için katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden ortalama 12 koloni, steril kürdan ile alınarak 50 µl deiyonize distile su içerinde süspanse edildi. Sonrasında hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örneklerden 5 µl alınıp 0,2 ml'lik PZR tüplerine aktarıldı ve PZR cihazında 95 °C'da 5 dk bekletildi. Örneklerin üzerine 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 1 µl (10 pmol/µl) hedef bölgesi vektör içerisinde olan ileri primer (pM-Seq-For: 5'-TCATCGGAAGAGAGTAG '-3), 1 µl (10 pmol/ µl), hedef bölgesi vektör içerisinde olan geri primer (pM-Seq-Rev: 5'-AAAGCAAGTAAAACCTCTAC-3), 1 µl dNTP (2,5 mM), 2 µl MgCl2 (25 mM), 8 µl deiyonize distile su ve 0.2 /µl Taq DNA polimeraz (NEB: 5U/µl) eklendi. (Fazla sayıda örnekle çalışıldığı için örnek sayısıyla orantılı olarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan her bir PZR tüpüne 15 µl eklendi). PZR koşulları 95°C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü,

95°C'da 15 sn / 53°C'da 15 sn / 72°C'da 45 sn olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.23. **Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu**

Koloni-PZR sonucunda pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 5 ml doygun kültürler hazırlandı. Bu koloniler steril kürdan ile 4 ml ampisilin içeren LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C'da 180 dev./dk çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 7500 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltisi, 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve 72 karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4°C'da, 14000 dev/dk hızda 20 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'sını içeren üst sıvı üzerine 2.5 hacim isopropanol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C'da, 14000 dev/dk hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi %70 etil alkol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek ikinci kez kontrolleri yapıldı. DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.23.1. **Plazmit DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi**

pM plazmitine belirli cDNA'ların klonlanması ile elde edilen rekombinant vektörler, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildi. DNA örneklerinden 2 µl alındı ve hacmi deiyonize distile ile 18 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon için kullanılan *ApaLI* ve *DraI* enzimleri için uygun x10 konsantre NEB Cut Smart reaksiyon tamponu, 0.3-0.5 µl (3-5 U) restriksiyon enzim(ler)i ve 0.3-0.5 µl RNaz (10 µg/µl) enzimi eklendi. Örnekler 37 °C'da 1-2 saat kesime bırakıldı. Sonrasında örnekler agaroz jele yüklenerek kontrolleri yapıldı.

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

TE tamponu içerisinde çözündürülen DNA örneklerine x5 volume olacak şekilde PEG/NaCl (%20 / 1.25 M) çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca -20 °C'da bekletildi. Sürenin sonunda 4 °C'da 14000 dev/dk hızda, 20 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. Çökelti 1 ml %70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 50 µl TE içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için hizmet alımına gidildi.

5.24. **Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu**

Plazmit vektörlere klonlanan *MTCH2* geninin insan hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıklarını belirlemek, sentez edilen MTCH2 proteininin hücre içi lokalizasyonlarını saptamak, bu proteinlerin influenza PA proteini ile olan ilişkisini ve viral RNA polimeraz enzimi üzerinde olası etkilerini araştırmak amacıyla, 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 (PEI) kullanıldı. PEI ile gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde 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 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.

5.25. **Proteinlerin Western Melezleme Tekniği ile Analizi**

İnsan *MTCH2* genini taşıyan pCHA plazmit vektörü ve Cas9 geni taşıyan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörleri, ve *MTCH2* genine özgü siRNA ile transfekte memeli hücrelerinde belirli proteinlerin analizinde ve bu hücrelerde influenza A virüsü replikasyonunun seyrinin araştırılmasında SDS-PAGE/Western melezleme tekniklerinden yararlanıldı.

5.25.1. **Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması**

Protein elektroforezi için 100x100x1 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller % 10'luk ayırma ve % 5'lik paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. Jellerin % 10'luk akrilamid içeren birinci bölümü (ayırma jeli); 4 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 3 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 5 ml deiyonize distile su, 50 µl APS (%10 w/v) ve 20 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 500-600 µl bütanol yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki bütanol alınarak ikinci bölüm jel için hazır hale getirildi. % 5'lik akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 1 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.5 ml 4X konsantre paketleme jel tamponu, 3,5 ml deiyonize distile su, 20 µl APS (%10 w/v) ve 8 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı.

5.25.2. **Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi**

Hücrelerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 100-200 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95-100 °C'da dakika bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler, 5-20 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi,

poliakrilamid jel elektroforez tamponu ile dolu tank içerisinde ilk 15 dakika 80 volt, daha sonra 140 volt gerilim altında yaklaşık 1-1.5 saatte tamamlandı. Elektroforez sonrası, jel üzerinde ayrılan proteinler nitrosellüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "sünger-filtre kağıdı-nitrosellüloz membran-jel-filtre kağıdı-sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve ısınmayı önlemek için buz aküleri ile soğutulan ortamda 45 dk 45 voltta ve 90 dk 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

5.25.3. **Membrana Transfer Edilen Proteinlerin Görüntülenmesi**

Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, oluşabilecek nonspesifik bağlanmaların önlenmesi için 1-2 saat bloklama solüsyonunda bekletildi ve sonrasında bir gece boyunca bloklama solüsyonu içerisinde 1/500- 1/1000 oranında sulandırılarak hazırlanan primer antikorların etkisinde bırakıldı. Primer antikor olarak virüs M1 proteinini analizinde, tavşan orijinli poliklonal anti-M1 antikorları (Santa Cruz, sc-7392) kullanıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar bir kez TBS-T, iki kez TBS ile 30'ar dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar TBS tamponunda 1/5000 oranında seyreltilen anti-tavşan IgG (Invitrogen / Thermo: 31423) antikoru ile 30 dakika muamele edildi. Sonrasında membranlar tekrar bir kez TBS-T, iki kez TBS ile 20'şer dakika yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (BioVision, 6A20K08200) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.26. **Hücrelerin İnfluenza A Virüsleri ile Enfeksiyonu**

HEK293 *knockout* hücre hatları (1,5-2,5x10^5 hücre/kuyu) DMEM içeren 12-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen DMEM (DMEM-) besiyeri ile iki kez yıkandı. Hücrelere % 1 BSA içeresinde 0,1-1 moi (*İng. multiplicity of infection*) titrede olacak şekilde seyreltilen influenza A/WSN ve A/DkPen virüsleri ile enfekte edildi. Plaklar 10 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da 30 dakika bekletilerek virüslerin tutunması sağlandı. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve ortama 1 ml TPCK Tripsin içeren OPTIMEM eklendi

ve CO_2-etüvde 37 °C'da inkübe edildi. Virüsler ile enfeksiyondan 8 veya 10 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 100-150 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95 °C'da 5 dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. Hazırlanan örneklerden 10-20 µl poliakrilamid jele uygulandı. Yukarıda (bak. 5.25.) anlatıldığı şekilde ayrıştırılan ve PVDF membranlara transfer edilen proteinler içerisinde endojen ACTB proteini ve influenza virüsü proteini (M1) Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu deneylerde primer antikor olarak monoklonal fare anti-aktin ile poliklonal tavşan anti-M1 antikorları kullanıldı. Deney sonucu elde edilen veriler üzerinde viral proteinler ve hücresel ACTB proteini bant yoğunlukları karşılaştırılarak sonuca gidildi.

5.27. İnsan MTCH2 ve Virüs PA Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmünfloresans Yöntemle İncelenmesi

İnsan MTCH2 ve virüs PA proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının ve olası etkileşimlerinin saptanmasında HeLa hücrelerinden yararlanıldı.

5.27.1. HeLa Hücrelerinin Plazmit DNA'lar ile Transfeksiyonu

HeLa hücreleri, içerisine etil alkol ile steril edilen 9 mm çapında yuvarlak lameller yerleştirilmiş 12-kuyulu plaklara ekildi ($7{,}5x10^4$ hücre/kuyu) ve 20-24 saat süre 37°C'da inkübe edildi. Her bir kuyucukta çağalan hücreler, 0,5-1 µg plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Bunun için, pCAGGS-PA(W) ve pCHA-MTCH2 plazmitleri kullanıldı. 5.24.'te belirtildiği şekilde transfekte edilen hücreler, transfeksiyondan 40-48 saat sonra ilgili proteinler için immünfloresans yöntem ile analiz edildi.

5.27.2. Plazmitler ile Transfekte Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin İmmünfloresans Yöntem ile Görüntülenmesi

Plazmit DNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücreleri 5 dakika T-FTS ile yıkandı ve sonrasında % 3 (a/h) paraformaldehid çözeltisi içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler % 0,1'lik NP-40 çözeltisi ile 15 dakika muamele edildi. İstenmeyen antikor bağlanmalarını önlemek için hücreler T-

FTS içerisinde hazırlanmış % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler 1 saat % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1:300 oranında seyreltilerek hazırlanan primer antikorların etkisine 1 saat bırakıldı. Primer antikor olarak HA uzantısı taşıyan proteinleri için fare monoklonal anti HA antikorları kullanıldı. HA uzantılı MTCH2 kodlayan plazmit ile İnfluenza A virüsü PA proteini kodlayan plazmitlerin birlikte transfekte edildiği hücre örneklerinde, anti-HA antikoru ile birlikte tavşan anti- PA poliklonal antikoru da kullanıldı. Hücreler iki kez 15 dakika T-FTS içerisinde tutularak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı ve ikinci kez % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 15 dk bekletildi. Bunu takiben hücreler 60 dakika süreyle % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1:300 oranında sulandırılan Alexa-488 ve/veya Alexa-568 ile konjuge anti-fare ve/veya anti-tavşan ikincil antikorlar ile muamele edildi. Hücre nukleuslarının görüntülenebilmesi için ikincil antikor çözeltilerine 1/2000 seyreltmede DAPI çözeltisi (1 mg/ml) eklendi. Hücreler tekrar iki kez 10 dakika T-FTS ile yıkandıktan sonra, üzerine 2-3 µl kapatma çözeltisi damlatılan lam üzerine kapatıldı, lamellerin çevresine şeffaf oje sürüldü ve DP72 peltier, soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskopta incelendi.

5.28. **MTCH2 Proteininin İnfluenza A Virüs RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması**

Virüs ile enfekte ya da viral RNA polimeraz enzimini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde *MTCH2* geni tarafından kodlanan proteinlerin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri daha önce Turan ve ark. (Turan ve ark., 2004) tarafından geliştirilen influenza A virüsü minireplikon sistemi kullanılarak araştırıldı. Bunun için, HEK293 hücreleri 24 kuyulu plaklara $1x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve hücreler 20-24 saat süre ile standart kültür koşullarında üretildi. Her bir kuyuda üretilen hücreler için, Tablo 3'te verilen miktarlarda influenza A/WSN ya da A/DkPen virüsü minireplikonunu oluşturan plazmitlerin (pHH21-vNS-luc, pRL, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PB2, pCAGGS-PA ve pCAGGS-NP) ve belirli miktarlarda (30 ng, 100 ng ya da 200 ng) insan MTCH2 proteini kodlayan bir plazmitin karışımı hazırlandı ve total plazmit miktarı pCAGGS

plazmit vektörü ile 300 ng'a tamamlandı. Hazırlanan plazmit karışımları PEI kullanılarak (bkz. 5.24.) HEK293 hücrelerine transfekte edildi.

Tablo 3. İnfluenza virüsü minireplikon testlerinde kullanılan, influenza A/WSN ve A/DkPen minireplikonu plazmitleri, diğer plazmitler ve 24-kuyulu plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda her bir kuyucuk için kullanılan plazmit miktarları.

Plazmit	**Miktar (ng/kuyu)**	
	A/WSN minireplikon seti	**A/DkPen minireplikon seti**
pHH21-vNS-luc	20	20
pSEAP	20	20
pCAGGS-PB2	3	10
pCAGGS-PB2	3	10
pCAGGS-PA	3	3
pCAGGS-NP	30	30
pCAGGS-MTCH2	0-200	0-200
pCAGGS	0-214	0-200
Toplam	**300**	**300**

Transfeksiyon sonrası hücreler standart kültür koşullarında inkübe edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra normalizasyon için pSEAP plazmiti üzerinden kodlanan SEAP (*İng. Secreted embryonic alkaline phosphatase*) enzimi kullanıldı. SEAP aktivitesini belirlemek için inkübasyondan 24 saat sonra kültürlerden 100 µl besiyeri örnekleri alındı ve besiyerine salgılanan SEAP aktivitesi ölçüldü. Transfekte kültürler 48 saat sonra hücrler 100 µl liziz tamponunda parçalandı. Lusiferaz aktivitesinin saptanmasında, hazırlanan hücre lizatından 5 µl alındı, 25 µl lusiferaz substratı üzerine eklendi ve luminometre ile 5 saniye süre ile ölçümler alındı. Lüsiferaz aktivitelerinin ölçülmesinde ticari kit (Promega) kullanıldı.

5.29. Besiyerine Salınan Belirteç (Reporter) SEAP Enzimi Aktivitesi Ölçümü

pSEAP plazmiti ile transfekte edilen HEK293 hücre kültürlerinde besiyerine salınan SEAP enzimi aktivitesi ticari kit (Roche, Mannheim, Almanya # 31420) kullanılarak ölçüldü. Bunun için transfeksiyondan 20-24 saat sonra 100 µl besiyeri örnekleri alındı ve 14.000 dev/d hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan alınan 10 µl örnek 30 µl sulandırım çözeltisi ile karıştırıldı ve 65 °C' da 30 dakika bekletildi. Bu örneklerden 10 µl alındı ve eşit hacimde inaktivasyon çözeltisi ile karıştırıldı ve 5 dakika bekletilerek endojen alkalen fosfataz enziminin inaktive olması sağlandı. Son aşamada 10 µl substrat eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra enzim aktivitesi luminometrede (GloMax20/20 Luminometre, Promega) luminesans olarak ölçüldü. Elde edilen ateş böceği lüsiferaz değerleri renilla lüsifereraz değerleri ile normalize edilerek sonuçlar değerlendirildi.

5.30. İnsan MTCH2 Proteininin İnfluenza Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması

Hücrelerde MTCH2 proteini miktarındaki değişmenin influenza virüsü replikasyonunu nasıl etkilediğini saptamak için üç farklı yol izlendi. *i*. hücreler MTCH2 proteini kodlayan plazmit ile transfekte edildi ve bu protein miktarı geçici olarak arttırıldı. *ii*.hücreler *MTCH2* geni için dizayn edilen siRNA'lar ile transfekte edilerek *MTCH2* transkript düzeyi düşürüldü (*knock down*). *iii.* CRISPR/cas9 yöntemiyle *MTCH2* geni *knockout* edildi. Her üç durumda da hücreler influenza A virüsleri ile enfekte edildi ve viral replikasyonun seyri izlendi.

5.30.1. *MTCH2* genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun araştırılması

Hücrelerdeki *MTCH2* geni transkripsiyon düzeyini düşürmek (*knock down*) için HeLa hücreleri, *MTCH2* genine özgü siRNA ile transfekte edildi. D'MEM (+) besiyerinde üretilen hücreler tripsin-EDTA ile süspansiyon haline getirildi ve 1000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler Opti-MEM içerisinde süspanse edildi ve hücre sayısı belirlendi. Hücreler 1×10^6 hücre/ml olacak

şekilde Opti-MEM içerisinde seyreltildi ve siRNA'lar ile transfeksiyonda kullanıldı. Bunun için 20 ve 40 pMol (2/4 µl) *MTCH2* siRNA (10620318,Life Technology) ve negatif kontrol siRNA (sc-37007, Santa Cruz) 100 µl Opti-MEM içerisinde seyreltildi ve aynı hacimde Opti-MEM içerisinde seyreltilen 5 µl RNAi-max (13778075-Invitrogen) ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Hazırlanan siRNA/RNAi-Max karışımı 0,9 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı ve 37 ºC'da düşük hızda dönen bir karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra hücreler her bir kuyusunda 3 ml D'MEM (+) içeren 6-kuyulu plaklara aktarıldı ve standart kültür koşullarında 48 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler tripsin-EDTA ile süspanse edildi ve hücre sayıları belirlendi. Hücrelerin bir kısmı *MTCH2* transkript düzeyini saptamak için total RNA ekstraksiyonunda (bak. 5.19.1.) kullanılmak amacıyla 6-kuyulu plaklara ekildi. Hücrelerin bir kısmı hem influenza A/WSN hem A/Dkpen virüsleri ile enfeksiyon için 12-kuyulu plaklara ($2,5x10^5$ hücre/kuyu) ekildi ve 24 saat 37 °C'da inkube edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 0,1-2 moi titrede influenza A virüsleri ile enfekte edildi (bak. 5.26.). Enfeskiyondan 8-10 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücrlere 200 µl SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda toplandı. Hazırlanan hücre lizatlarında ACTB ile influenza A virüsü M1 proteinleri Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bak. 5.25.).

5.30.2. **siRNA ile transfekte edilen hücrelerde *MTCH2* transkript düzeylerinin saptanması**

MTCH2 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde *MTCH2* transkript düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. Transfekte edilen hücrelerden total RNA ekstre edildi ve cDNA'lar hazırlandı (bak. 5.18.). Kantitasyon için hem hücresel *ACTB* hem de *MTCH2* gen transkript düzeyi belirlendi. Reaksiyon 20 µl hacim içerisinde aşağıda verilen gene özgü primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon Karışımı:

	Konsantrasyon	Miktar (µl) / tüp
cDNA	?	2
İleri Primer (Aktin ya da MTCH2)	2 pMol/µl	2
Geri Primer (Aktin ya da MTCH2)	2 pMol/µl	2
Deiyonize distile su	-	4
qPZR master mix	x2	10

Reaksiyon BioRad, CFX96 model gerçek zamanlı PZR cihazında gerçekleştirildi. PZR koşulları; bir döngü "94 °C, 5 dk" ve 45 döngü "94 °C, 10 sn / 56 °C, 20 sn / 74 °C, 20 sn" ve sonrasında erime eğrisi belirleme şeklinde uygulandı. Ölçülen *MTCH2* transkript düzeyleri *ACTB* transkript düzeyi ile normalize edilerek değerlendirildi.

Primerler:

Primer adı	**Nükleotid dizisi (5'- 3')**
MTCH2 For	ATCATGGTACAGTTCATTGGCAG
MTCH2 Rev	ATTCAAATTAACATTTTCAGGTCAC
Aktin 280 For	ATGGAGTCCTGTGGCATCC
Aktin 552 Rev	CCAGCACAATGAAGATCAAG

5.30.3. **MTCH2 proteinlerindeki artışın influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması**

HEK293 hücrelerinde MTCH2 protein miktarları bu proteinleri kodlayan plazmitlerin geçici transfeksiyonu ile yapay olarak arttırıldı. Bunun için hücreler 12-kuyulu plağa ekildi ($1{,}5x10^5$ hücre/kuyu) ve yaklaşık 24 saat sonra 5.23.'te anlatıldığı şekilde 30-100-300 ng olacak şekilde pCHA-MTCH2 plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen DMEM (DMEM-) besiyeri ile iki kez yıkandı. Hücrelere 250 µl % 1 BSA içeresinde 0,1-2 moi (*İng. multiplicity of infection*) titrede olacak şekilde seyreltilen influenza A/WSN ve A/DkPen virüsleri eklendi. Plaklar virüslerin tutunması için 10 dakika aralıklarla karıştırılarak 30 dakika bekletildi.

Daha sonra virüs süspansiyonları uzaklaştırıldı ve ortama 0,5 µl/ml final konsantrasyonda TPCK Tripsin (ortamda bulunan kimotripsini inaktive etmek için "N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone" ile işlem görmüş tripsin) katılmış OPTIMEM eklendi ve CO_2-etüvde 37 °C'da inkübe edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 100-200 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95-100 °C'da dakika bekletilerek proteinlerin denatüre olması sağlandı. Hazırlanan örneklerden 10-15 µl poliakrilamid jele uygulandı. Yukarıda (bak. 5.24) anlatıldığı şekilde ayrıştırılan ve PVDF membranlara transfer edilen proteinler ACTB proteini ve influenza virüsü M1 proteinleri Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak monoklonal fare anti-aktin ile poliklonal tavşan anti-M1 antikorları kullanıldı. İkincil antikor olarak HRP konjuge keçi anti-tavşan IgG ya da anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Deney sonuçları viral proteinler ve hücresel ACTB proteini bant yoğunlukları karşılaştırılarak değerlendirildi.

5.30.4. **MTCH2 proteinin knockout edildiği hücrelerde influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması**

İnsan *MTCH2* geninin knockout edildiği HEK293 hücrelerine enfeksiyon deneyleri yapılarak virüs replikasyonun etkileri araştırıldı. Bunun için 12-kuyulu plağa üretilen hücreler ($2,5x10^5$ hücre/kuyu) ekildi. İnkübasyondan 24 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen DMEM (DMEM-) besiyeri ile iki kez yıkandı. Hücrelere % 1 BSA içeresinde 1 moi (*İng. multiplicity of infection*) titrede olacak şekilde seyreltilen influenza A/DkPen ve A/WSN virüsleri ile enfekte edildi. Plaklar 10 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da 30 dakika bekletilerek virüslerin tutunması sağlandı. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve ortama 1 ml TPCK Tripsin içeren OPTIMEM eklendi ve CO_2-etüvde 37 °C'da inkübe edildi. Virüsler ile enfeksiyondan 8 ve 12 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. 8. saat sonunda hücrelerin bir kısmı da Gerçek Zamanlı PZR yöntemi ile viral transkript düzeylerinin saptanması amacıyla RNA izolasyonu için toplandı. Bunun için besiyeri uzaklaştırıldı ve üzerine 350 µl RNA Lysis Tamponu eklenerek hücreler toplandı ve

5.18.'de anlatıldığı gibi RNA izolasyonuna tabi tutuldu. Western Melezleme için toplanan diğer hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95-100 °C'da dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. Hazırlanan örneklerden 10-15 µl poliakrilamid jele uygulandı. Yukarıda (bak. 5.24.) anlatıldığı şekilde ayrıştırılan ve PVDF membranlara transfer edilen proteinler içerisinde endojen ACTB proteini ve influenza virüsü proteini (M1) Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu deneylerde primer antikor olarak monoklonal fare anti-aktin ile poliklonal anti-M1 antikorları kullanıldı. Deney sonucu elde edilen veriler üzerinde viral proteinler ve hücresel ACTB proteini bant yoğunlukları karşılaştırılarak sonuca gidildi.

5.31. **Plak testi**

Stokta bulunan İnfluenza A virüslerinin titresi plak testleri ile belirlendi (Turan ve ark., 1996). Plak testleri için MDCK hücrelerinden yararlanıldı. MDCK hücreleri 12-kuyulu plaklarda %5 serum içeren DMEM besiyerinde ortalama $4x10^5$ 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 iki kez serum içermeyen besiyeri ile yıkandı. Sonrasında %1 BSA içerisinde seyreltilen virüs örnekleri ile enfekte edildi (bkz 5.26). Virüs süspansiyonları uzaklaştırıldı ve hücrelere 42 °C'ta bekletilen agaroz içeren muhafaza besiyeri eklendi. Besiyeri katılaştıktan sonra plaklar ters çevrilerek 37 °C'da 2 gün inkübe edildi. Inkübasyon 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 değerlendirildi.

6. BULGULAR

İnfluenza virüsleri, diğer virüslerde olduğu gibi konak hücre metabolizması ile sıkı bir ilişki içerisindedir. Virüs tarafından kodlanan tüm proteinler birden fazla hücresel protein ile etkileşime girerek viral replikasyonun başarı ile sonuçlanmasına katkı sunarlar. İnfluenza virüsü replikasyonu ve transkripsiyonunu kataliz eden ve üç alt üniteden (PB2, PB1 ve PA) oluşan RNA polimeraz enzimi işlevlerini gerçekleştirirken hem konak hücre mRNA'larının sentezinde rol alan başta konak hücre RNA polimeraz enzimi katalitik alt ünitesi olmak üzere transkripsiyon mekanizmasının diğer alt birimleri ile hem de hücresel translasyon ile ilişkili birçok protein ile etkileşime girer (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018). Viral RNA polimeraz enziminin PA alt birimi bu etkileşimlerde temel aktörlerden biridir. Viral RNA polimeraz enzimini oluşturan proteinlerin sadece hücresel transkripsiyon/translasyon sistemleri ile değil farklı işlevlere sahip diğer hücresel proteinler ile de ilişkili oldukları bilinmektedir (Koçmar ve ark., 2022). Dolayısıyla bu çalışmada, viral RNA polimeraz enzimi alt birimlerinden PA proteininin insan Mitokondriyal Taşıyıcı Homolog 2 (MTCH2) proteini ile ilişkisi ve bu ilişkinin viral replikasyon açısından önemi ele alındı. Daha önce yapılan maya ikili hibrit metodu ile tarama çalışmaları sonucunda, *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde influenza A virüsü RNA polimeraz enziminin PA alt ünitesinin insan MTCH2 proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Yayınlanmamış veri / TÜBITAK projesi: 112S518 / Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Kadir Turan). Bu tez çalışması kapsamında ise MTCH2 proteinin influenza A virüsü PA ile ilişkisi insan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinde araştırıldı ve bu proteinin viral replikasyonu nasıl etkilediği sorusuna yanıt arandı. Bu bağlamda insan hücrelerinde MTCH2 proteinini kodlayan ekspresyon vektörleri oluşturuldu. HeLa hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan influenza A virüsü PA proteini ile MTCH2 proteini arasındaki etkileşim immünfloresans tekniği ile araştırıldı. MTCH2 proteininin viral replikasyona etkilerini saptamak için plazmitler ile ya da özgün siRNA'lar ile transfeksiyon sonucunda hücrelerinde bu proteinin düzeyi yapay olarak değiştirildi, bu hücrelerde viral replikasyonun seyri incelendi. Buna ek olarak CRISPR/cas9 tekniği ile *MTCH2* geni inaktive edilen (*knockout)* hücrelerde viral replikasyonun nasıl etkilendiği araştırıldı.

6.1. İnsan MTCH2 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Çalışma kapsamında insan *MTCH2* geni pCHA memeli ekspresyon vektörlerine klonlandı.

6.1.1. İnsan MTCH2 proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler

Maya hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile ilişkili olduğu belirlenen MTCH2 proteininin, memeli hücrelerinde PA proteini ile ilişkisini ve viral replikasyona etkisini araştırmak amacıyla hem geçici ekspresyon için hem de *MTCH2* genini *knockout* etmek için bir dizi vektör oluşturuldu. MTCH2 proteinin kodlayan plazmit ve *MTCH2* genini *knockout* etmekte kullanılan CRISPR/cas9 plazmitlerinin oluşturulmasında aşağıda verilen *MTCH2* referans cDNA dizisinden yararlanıldı ve bu geninin ekzon intron yapısı göz önünde bulunduruldu.

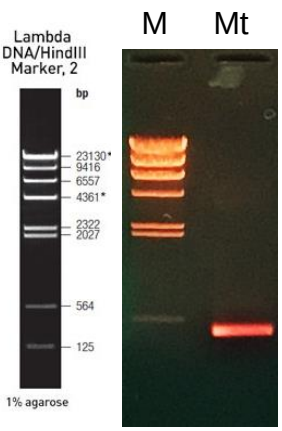
İnsan *MTCH2* cDNA'sı dizisi, Homo sapiens mitochondrial carrier 2 (MTCH2), transcript variant X2, mRNA, (Referans: NM_014342.4)/ https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23788)

AGTGAAACCGGCGGCCCTGGCACGTGACCTAGGACCGGCTCACCGGGTC
GCTTGGTGGCTCCGTCTGTCTGTCCGTCCGCCCGCGGGTGCCATCATGGC
GGACGCGGCCAGTCAGGTGCTCCTGGGCTCCGGTCTCACCATCCTGTCCC
AGCCGCTCATGTACGTGAAAGTGCTCATCCAGGTGGGATATGAGCCTCTT
CCTCCAACAATAGGACGAAATATTTTTGGGCGGCAAGTGTGTCAGCTTCC
TGGTCTCTTTAGTTATGCTCAGCACATTGCCAGTATCGATGGGAGGCGCG
GGTTGTTCACAGGCTTAACTCCAAGACTGTGTTCGGGAGTCCTTGGAACT
GTGGTCCATGGTAAAGTTTTACAGCATTACCAGGAGAGTGACAAGGGTG
AGGAGTTAGGACCTGGAAATGTACAGAAAGAAGTCTCATCTTCCTTTGAC
CACGTTATCAAGGAGACAACTCGAGAGATGATCGCTCGTTCTGCTGCTAC
CCTCATCACACATCCCTTCCATGTGATCACTCTGAGATCTATGGTACAGTT
CATTGGCAGAGAATCCAAGTACTGTGGACTTTGTGATTCCATAATAACCA
TCTATCGGGAAGAGGGCATTCTAGGATTTTTCGCGGGTCTTGTTCCTCGC

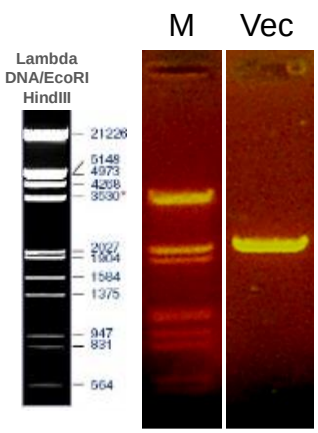
CTTCTAGGTGACATCCTTTCTTTGTGGCTGTGTAACTCACTGGCCTACCTC
GTCAATACCTATGCACTGGACAGTGGGGTTTCTACCATGAATGAAATGAA
GAGTTATTCTCAAGCTGTCACAGGATTTTTTGCGAGTATGTTGACCTATCC
CTTTGTGCTTGTCTCCAATCTTATGGCTGTCAACAACTGTGGTCTTGCTGG
TGGATGCCCTCCTTACTCCCCAATATATACGTCTTGGATAGACTGTTGGTG
CATGCTACAAAAAGAGGGGAATATGAGCCGAGGAAATAGCTTATTTTTC
CGGAAGGTCCCCTTTGGGAAGACTTATTGTTGTGACCTGAAAATGTTAAT
TTGAAGATGTGGGGCAGGGACAGTGACATTTCTGTAGTCCCAGATGCAC
AGAATTATGGGAGAGAATGTTGATTTCTATACAGTGTGGCGCGCTTTTTT
AATAATCATTTAATCTTGGGAAAATTCAGGTGTTTGGTGTCTGCCTTTTTT
GTTCTTTTTTCCAGCACAACATAACTTACCACTGATACTCCCCCTTTAGTT
ATTCTGAATTAGGATATTTTT

MTCH2 proteinin hücrelerde geçici sentezinde kullanılan plazmit, *MTCH2* geninin pCHA plazmitinde EcoRV hedef dizisine eklenmesi ile oluşturuldu. İnsan *MTCH2* cDNA'sı HEK293 cDNA kitaplığı üzerinden, fosforillenmiş 5'-ATCATGGTACAGTTCATTGGCAG-3'(MTCH2-For) ve 5'-ATTCAAATTAACATTTTCAGGTCAC-3'(MTCH2-Rev) primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (Şekil 15A). Elde edilen cDNA EcoRV restriksiyon endonükleaz enzimi ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmitinde (Şekil 15B) tavuk ovalbumin geni promotörü kontöründe klonlandı ve pCHA-MTCH2 plazmit vektörü elde edildi (Şekil 15C).

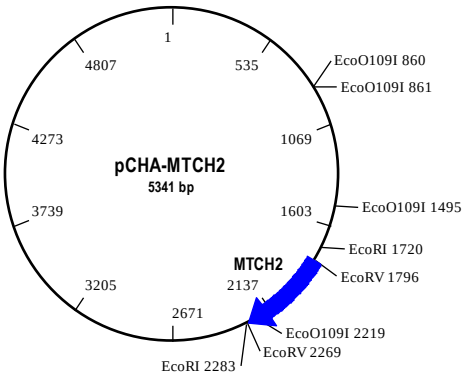
A



B



C

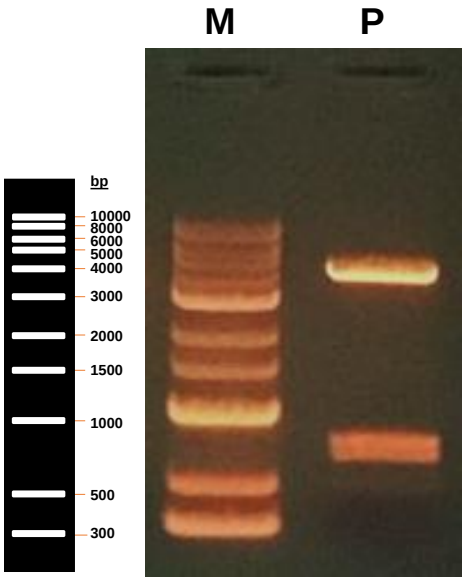


Şekil 15. pCHA-MTCH2 plazmit vektörünün oluşturulması. HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan *MTCH2* gen fragmentlerinin (A) ve EcoRV enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sının (B) agaroz elektroforezi profilleri. C. *MTCH2* geni klonlanan pCHA-MTCH2 plazmitinin restriksiyon haritası. M. HindIII (λ/HindIII) ya da EcoRI/HindIII (λ/HindIII+EcoRI) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmiş Lambda DNA'sı. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

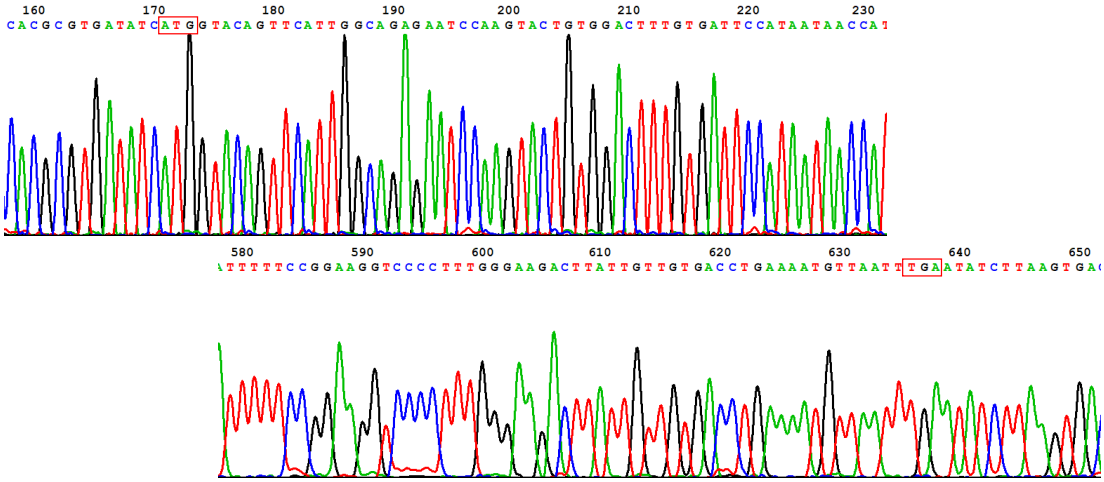
Plazmit haritasının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

pCHA-MTCH2 plazmit DNA'sının doğruluğu hem restriksiyon enzimleri ile kesilerek (3982, 724, 635 bp bantları) (Şekil 16A), hem de dizi analiz ile ortaya kondu (Şekil 16B).

A



B



Şekil 16. pCHA-MTCH2 plazmit DNA'sının kontrolü. A. EcoO109I enzimi ile kesilen plazmit DNA'nın agaroz jel elektroforezi görünümü. M. 1kb DNA standardı (KTK Biyotek., Episozyme). B. Sanger tekniği ile dizilenen *MTCH2* geni kromatogramı.

6.1.2. Memeli Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Mekanizması ile *MTCH2* Genini Knockout Etmek İçin Özgün Rehber RNA (sgRNA) Dizileri Taşıyan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

İnsan orijinli hücrelerde influenza A virüsü replikasyonun nasıl etkileneceğini değerlendirmek için CRISPR/Cas9 tekniği ile endojen *MTCH2* geninin inaktive edilmesi (*İng. knockout*) amaçlandı. Bunun için; öncelikle Cas9 enzimi ve *MTCH2* genini hedef alan rehber RNA dizilerini kodlayan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörleri oluşturuldu. *MTCH2* geni için iki farklı rehber RNA kodlayan dizi tasarlandı.

MTCH/gRNA-1

5' – CACCGGCAGAGAATCCAAGTACTG – 3'
3' – CCGTCTCTTAGGTTCATGACCAAA – 5'

MTCH/gRNA-2

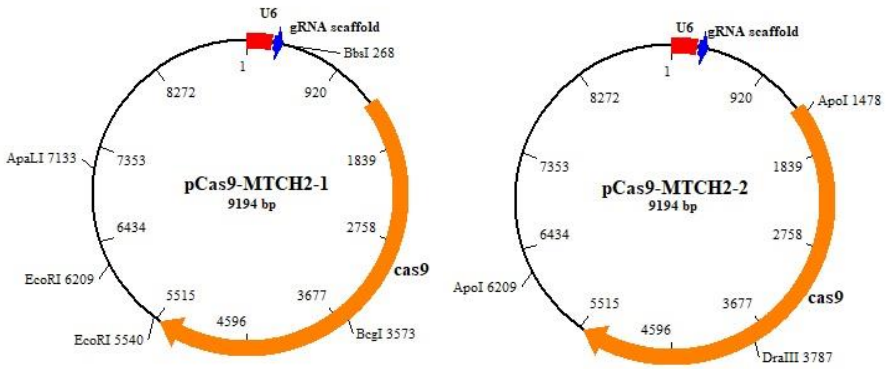
5' – CACCGTTCCATAATAACCATCTAt – 3'
3' – CAAGGTATTATTGGTAGATaCAAA – 5'

Rehber dizilerini kodlayan çift zincirli DNA fragmentleri, BbsI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne klonlandı (Şekil 17).



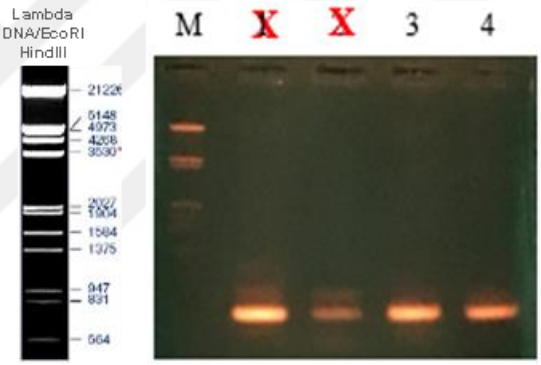
Şekil 17. Cas9 enzimini kodlayan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü haritası ve BbsI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen bu plazmitin agaroz jel elektroforezi profili. P. plazmit DNA'sı. M. λ/HindIII+EcoRI.

Plazmitleri oluşturmak için 20 nükleotid uzunluğundaki rehber RNA kodlayan DNA fragmentleri, BbsI enzimi ile doğrusal hale getirilen plazmit ile ligasyona uğratıldı ve U6 promotörü kontrolünde tracrRNA (trans-aktive edici CRISPR RNA) ile füzyon halinde sentezlenmesine olanak sağlayan vektörler elde edildi. pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 olarak isimlendirilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları Şekil 18'de verildi.



Şekil 18. MTCH2 gRNA'larını kodlayan dizilerin pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmitinde BbsI enzimi hedef bölgesine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. Vektör haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

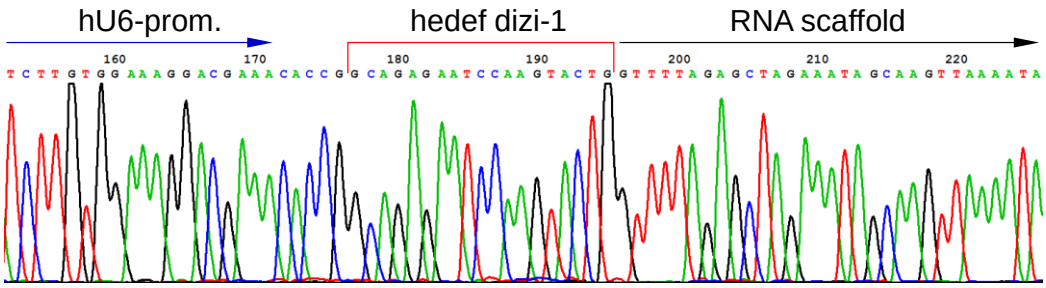
Küçük ölçekte hazırlanan pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmit vektörleri, rehber RNA kodlayan bölgeler için PZR tekniği ile kontrol edildi. Plazmit vektörlerinde klonlanan 20 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentini içine alan bölge PZR ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu için hedef dizisi vektör içinde olan CRP Seq-For ve klonlanan fragmentlere ait geri yönlü primerler (MTCH2-CRP-Rev-1, ya da MTCH2-CRP-Rev-2) kullanıldı (bkz. Tablo 3). PZR ürünleri agaroz elektroforezi ile incelendi (Şekil 19). Elde edilen sonuçlar plazmitlerin MTCH2 için tasarlanan rehber RNA'ları kodlayan fragmentlerini yapılarında taşıdığını ortaya koydu.



Şekil 19. pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmitlerin doğruluklarının PZR ile kontrol edilmesi. PZR ile, klonlanan DNA fragmentlerine özgün primerler kullanılarak çoğaltılan DNA'ların agaroz jel elektroforez profilleri. 3. pCas9-MTCH2-1 plazmiti. 4. pCas9-MTCH2-2 plazmiti. M. λ/HindIII+EcoRI.

Plazmitlere klonlanan kısa DNA fragmentlerinin nükleotid dizileri DNA dizi analizleri ile doğrulandı (Şekil 20).

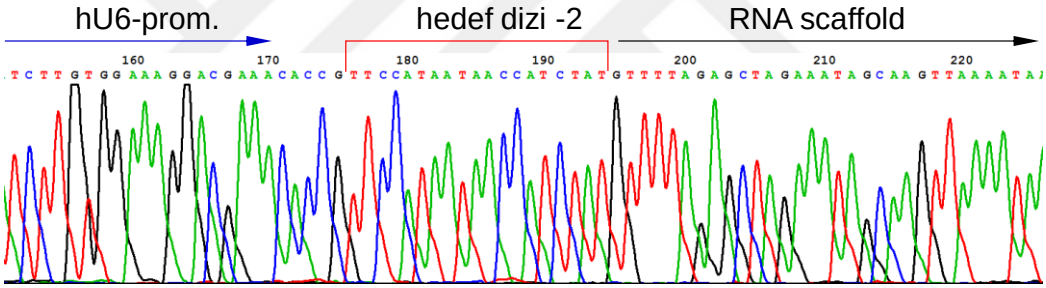
pCas9-MTCH2-1



TATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGCAGAGAATCCAAGTACTGGT

TTTAGAGCTAGAA---

pCas9-MTCH2-2



---TATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG**TTCCATAATAACCATCTAt**

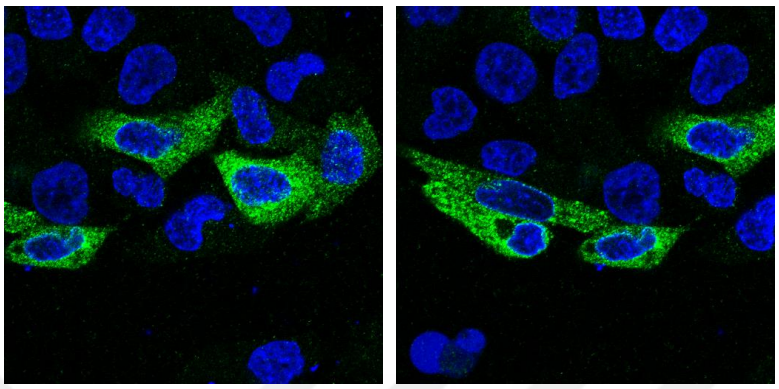
GTTTTAGAGCTAGAA---

Şekil 20. pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmitlerine klonlanan MTCH2/gRNA kodlayıcı bölgelerin DNA dizi analizi kromatogramları.

6.2. Plazmit ile Transfekte Hücrelerde HA Uzantılı MTCH2 Proteininin Ekspresyonu ile İlgili Veriler

pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde MTCH2 proteinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyonu immünfloresan teknikler ile belirlendi. Transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit vektör üzerinden kodlanan HA uzantılı MTCH2 proteinlerinin hücre sitozolünde granüller halinde lokalize

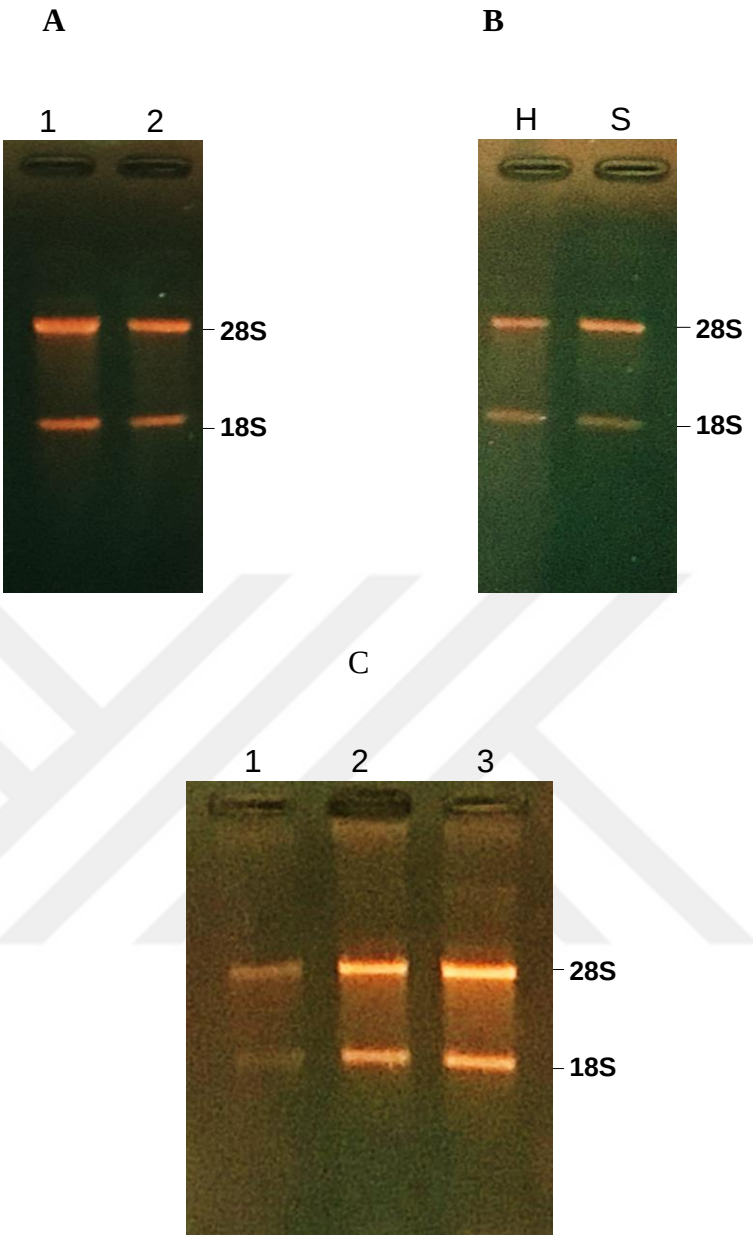
olduğu saptandı (Şekil 21). Bu lokalizasyon şekli MTCH2 proteinlerinin sitoplazmada serbest proteinler halinde olmayıp organellerde yoğunlaştığını gösterdi



Şekil 21. pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde insan MTCH2 proteinlerinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyonunun immünfloresan teknik ile belirlenmesi. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru (Santa Cruz, sc-7392), sekonder antikor olarak ise poliklonlan Alexa-488 konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı.

6.3. Hücrelerden Total RNA Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler

Özgün siRNA'lar ile ya da CRISPR/Cas9 sistemi ile *MTCH2* geni susturulan HeLa ve/veya HEK293 hücrelerinde hücresel ve viral genlerin kantitasyonu çalışmalarında kullanılmak üzere total RNA ekstraksiyonları gerçekleştirildi. RNA'lar RNeasy Plus Mini Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile ekstre edildi. Ekstre edilen total RNA örnekleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Elektroforez sonrası, total RNA'da baskın olarak bulunan 18S ve 28S ribozomal RNA'ların herhangi bir yıkıma uğramaksızın tek bant halinde ayrıldıkları gözlendi (Şekil 22) ve total RNA'lar çalışmanın bir sonraki aşaması olan reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlamak içi kalıp olarak kullanıldı.

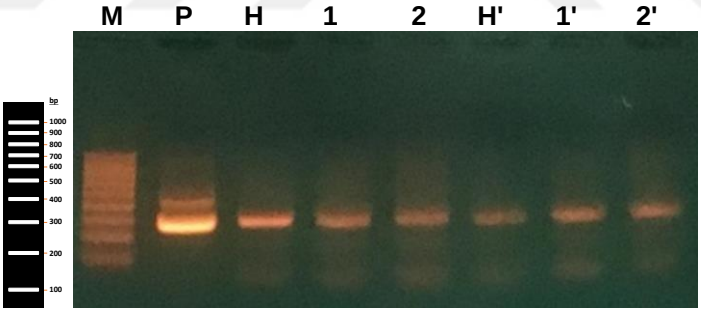


Şekil 22. Farklı amaçlarla hücrelerden ekstre edilen total RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kalitatif analizi. A. CRISPR/cas9 yöntemiyle *knockout* edilen seçilmiş HEK293 hücre klonlarından (1. Klon 14; 2. Klon 20) elde edilen total RNA örnekleri. B. *MTCH2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerden (H. transfekte olmamış HeLa hücreleri; S. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücreleri) ekstre edilen RNA örnekleri. C. CRISPR/cas9 yöntemiyle *knockout* edilmiş ve ve influenza A/Duck/Pen-H5N2 ile enfekte hücrelerden (1. HEK293; 2. Klon 14; 3. Klon 20) ektre edilen RNA örnekleri. RNA örnekleri EtBr katılmamış %1'lik agaroz jelde 30 dakika 100V sabit gerilim altında yürütüldü. Jeller 0.5 µg/ml konsantrasyonda EtBr içeren deiyonize distile suda 30 dakika bekletildi. Daha sonra 30 dakika deiyonize distile da yıkandı ve RNA bantları görüntülendi.

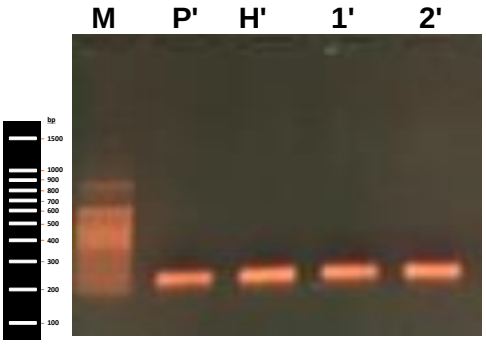
6.4. cDNA'ların Kontrolü ile İlgili Veriler

MTCH2 genine özgü siRNA'lar ya da CRISPR/Cas9 plazmitleri ile transfekte edilen hücrelerde gerek endojen *MTCH2* transkriptinin gerekse bu hücrelerin enfeksiyonundan sonra viral transkriptlerin analizinde reverz transkripsiyon-PZR tekniklerinden yararlanıldı. Total RNA'lar üzerinden oligo-dT ya da virüs spesifik primerler kullanılarak hazırlanan cDNA'lar; hücresel ACTB geni ya da ilgili viral gen PZR ile çoğaltılarak kontrol edildi. ACTB geni ile yapılan kontrollerde Tablo 3'te nükleotid dizileri verilen Act 280-For ve Act 552-Rev primerleri kullanıldı. PZR sonucunda beklenen 272 bç boyutlarında DNA fragmentleri saptandı (Şekil 23A). CRISPR/Cas9 ya da siRNA'lar ile *MTCH2* geni susturulan ve influenza A DkPen virüsü ile enfekte edilen hücrelerden hazırlanan cDNA örneklerinin kontrolünde Tablo 2'de dizileri verilen NS1-DkPen 542-For ve NS1-DkPen 686-Rev primer çiftinden yararlanıldı (Şekil 23B). PZR sonuçları reverz transkripsiyon reaksiyonlarının sorunsuz çalıştığını ortaya koydu.

A



B

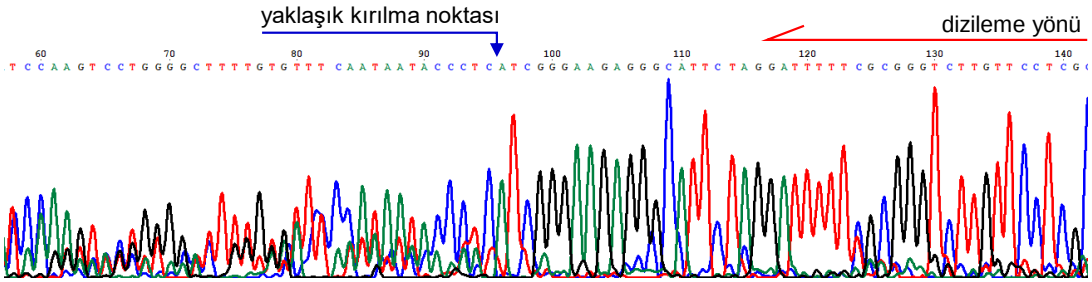


Şekil 23. Farklı amaçlarla hazırlanan cDNA'ların PZR ile kontrol edilmesi. A. HEK293 (H), Klon 14 (1), Klon 20 (2) hücrelerinden oligo dT primerler ile hazırlanan cDNA'larda ACTB geninin PZR ile çoğaltılması. H', 1' ve 2' nolu örnekler influenza virüsleri ile enfekte olan hücreleri göstermektedir. P. pCHA-ACTB plazmit DNA'sı. B. İnfluenza virüsleri ile enfekte edilen hücrelerden NS1-DkPen 686-Rev primeri ile hazırlanan cDNA'ların viral cDNA için kontrolü. P', pCHA-NS1(DkPen) plazmit DNA'sı. ACTB gen fragmentinin çoğaltılmasında, Act 280-For/Act 552-Rev primer çifti; viral cDNA'ların çoğaltılmasında NS1-DkPen 542-For/NS1-DkPen 686-Rev primer çifti kullanıldı. M. 100 bp DNA standardı (KTK Biyotek., Episozyme). Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

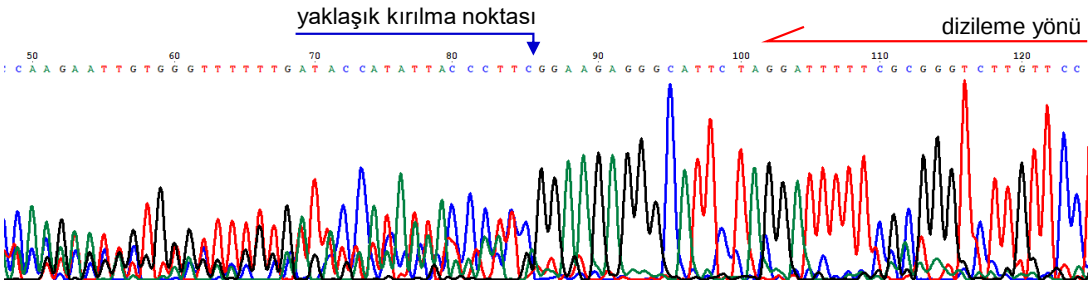
6.5. CRISPR/Cas9 Mekanizması ile *Knockout* Edilen Hücrelerin Analizi ile İlgili Veriler

pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmitleri ile transfekte edildikten sonra puromisin antibiyotiği varlığında seçilen klonların *MTCH2* geni bakımından mutasyona uğrayıp uğramadıkları, bu hücrelerden hazırlanan *MTCH2* cDNA'larının nükleotid dizileri saptanarak değerlendirilirdi. Bunun için ilk aşamada elde edilen *MTCH2* cDNA'ları PZR ile çoğaltıldı ve PZR ürünleri dizilendi (Şekil 24). Bu veriler *MTCH2* geninin mutasyona uğradığını göstermekle birlikte mutasyonun şekli hakkında net bir sonuç vermedi. Bu nedenle alternatif bir yol denendi. PZR ile çoğaltılan *MTCH2* cDNA'ları bir plazmit vektöre klonlandı ve *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Belirli sayıda transformanttan elde edilen plazmitler restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kontrolleri yapıldıktan sonra *MTCH2* geni için dizilendi.

Örnek 1



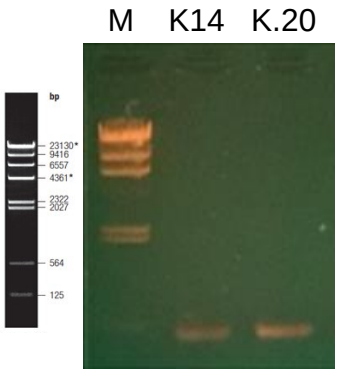
Örnek 2



Şekil 24. *Knockout* hücre klonlarından hazırlanan cDNA üzerinden PZR ile çoğaltılan ve MTCH2-Rev primeri kullanılarak dizilenen örneklere ait kromatogramlar.

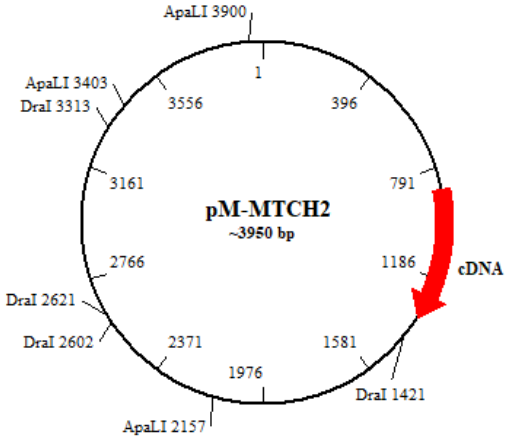
6.4.1. Dizileme Plazmitlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Dizileme plazmiti olarak pM plazmitinden yararlanıldı. pM plazmit DNA'sı SmaI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. CRISPR/Cas9 plazmitleri ile transfekte edilen ve seleksiyonu yapılan hücre klonlarından hazırlanan cDNA'lar üzerinden *MTCH2* cDNA'ları, fosforillenmiş MTCH2-For ve MTCH2-Rev primerler ile çoğaltıldı (Şekil 25).



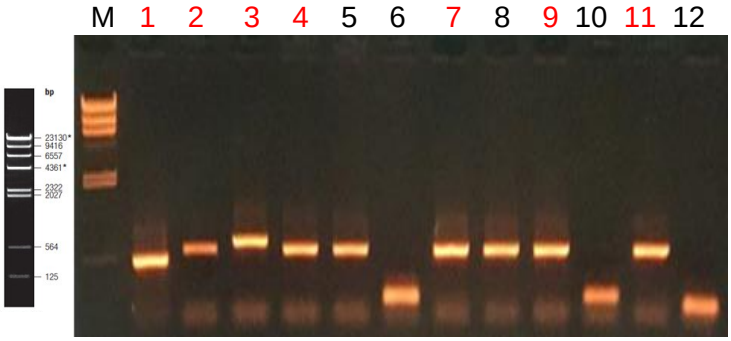
Şekil 25. Klon14 ve Klon20 hücrelerine ait cDNA'lar üzeninden fosforillenmiş primerler ile çoğaltılan *MTCH2* geni agaroz jel görüntüsü. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. M. λ/HindIII DNA standardı.

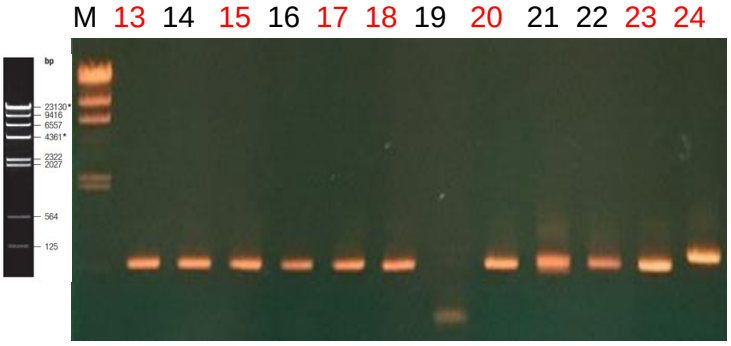
Elde edilen PZR ürünleri pM/SmaI plazmiti ile ligasyona uğratıldı ve Şekil 26'da haritası verilen plazmit(ler) elde edildi.



Şekil 26. DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere, *knockout* olduğu düşünülen hücre hatlarından elde edilen *MTCH2* cDNA'larının pM plazmitine klonlanması ile elde edilen rekombinant plazmit(lerin) haritası.

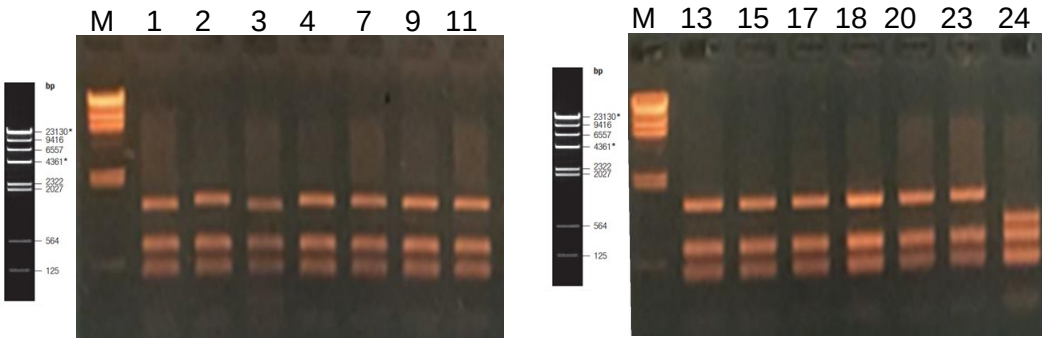
MTCH2 cDNA'ları taşıyan plazmitlerin transformasyon sonrası seçilmesi koloni PZR yöntemi ile gerçekleştirildi. Tüm plazmitler için *MTCH2* cDNA'larının her iki tarafında plazmit içerisinde belirli hedeflere bağlanan 5'-TCATCGGAAGAGAGTAG-3' (pM-sq-For) ve 5'-AAAGCAAGTAAAACCTCTAC-3' (pM-sq-Rev) dizilerine sahip primer çifti kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 27'de verildi. PZR ile test edilen transformantların çoğunluğunda farklı büyüklüklerde cDNA fragmentleri gözlendi.





Şekil 27. Klon 14 ve klon 20 hücrelerinden elde edilen *MTCH2* cDNA'ları klonlanarak elde edilen rekombinant plazmitlerin koloni PZR ile analizi. 1-12 numaralı örnekler klon 14 cDNA'sı içeren; 13-24 numaralı örnekler klon 20 cDNA'sı içeren plazmitleri temsil etmektedir. Kırmızı renkle belirtilen koloni örnekleri küçük ölçekte plazmit DNA'sı izolasyonunda kullanıldı. M. Lambda EcoRI/HindIII. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

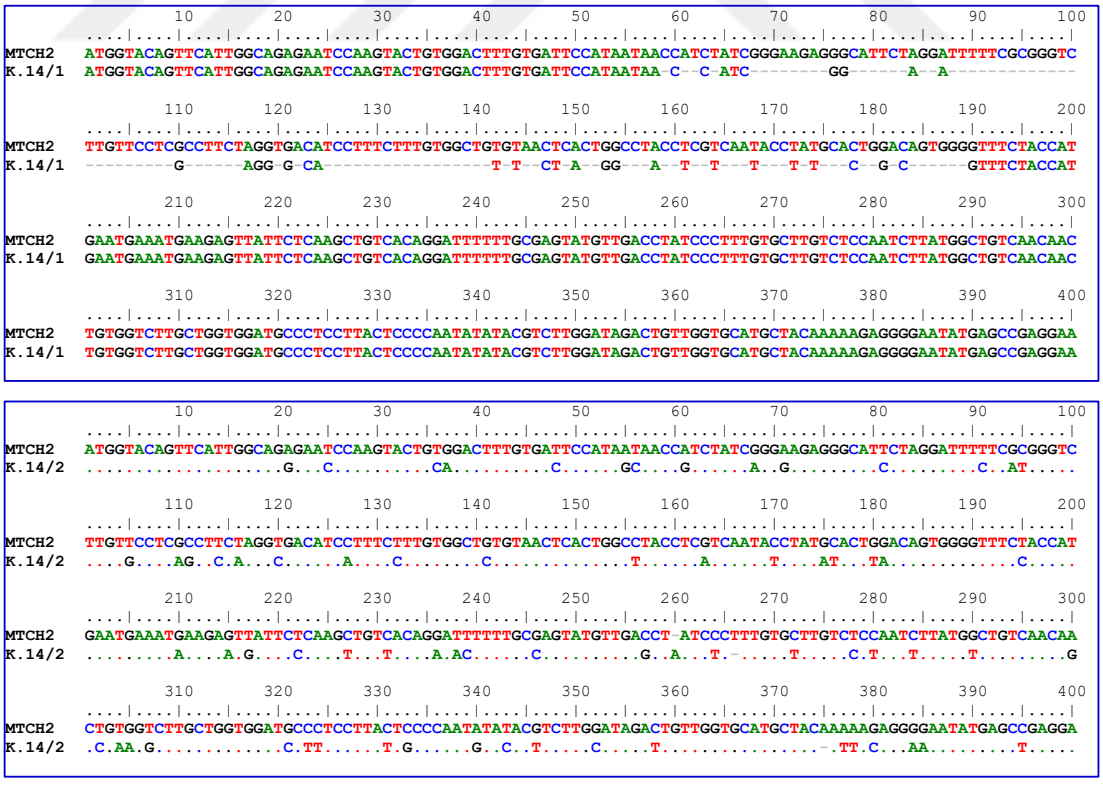
Koloni PZR ile ön kontrolü yapılan örneklerden Şekil 27 üzerinde kırmızı ile işaretli olanlar) küçük ölçeklerde plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmit DNA'ları pM-MTCH2 vektör restriksiyon haritası göz önünde bulundurularak, *ApaLI* ve *DraI* enzimleri ile kesilerek kontrol edildi. Plazmit örneklerinin çoğunda beklenen boyutlara yakın DNA fragmentleri (1474, 736, 692, 497, 445 bp) saptandı (Şekil 28). Belirli sayıda plazmit DNA'sı DNA dizi analizi ile değerlendirildi.

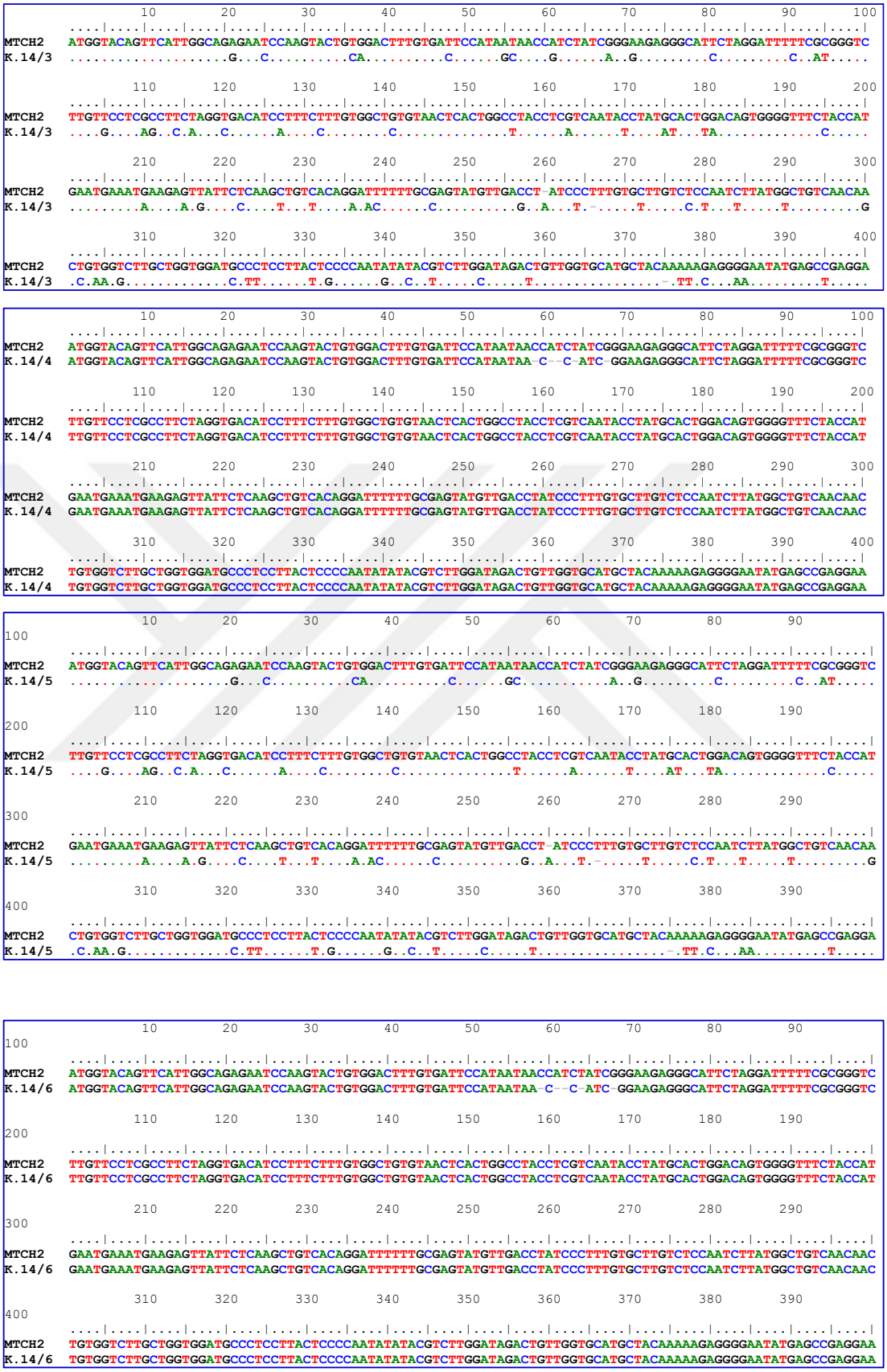


Şekil 28. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi sonuçları. 1-11 numaralı örnekler klon 14' ait; 23-36 numaralı örnekler klon 20'ye ait *MTCH2* cDNA'ları klonlanan plazmitleri temsil etmektedir. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. M. Lambda EcoRI/HindIII.

6.4.2. pM Plazmitlerine Klonlanan *MTCH2* cDNA'larının Dizilenmesi ile İlgili Veriler

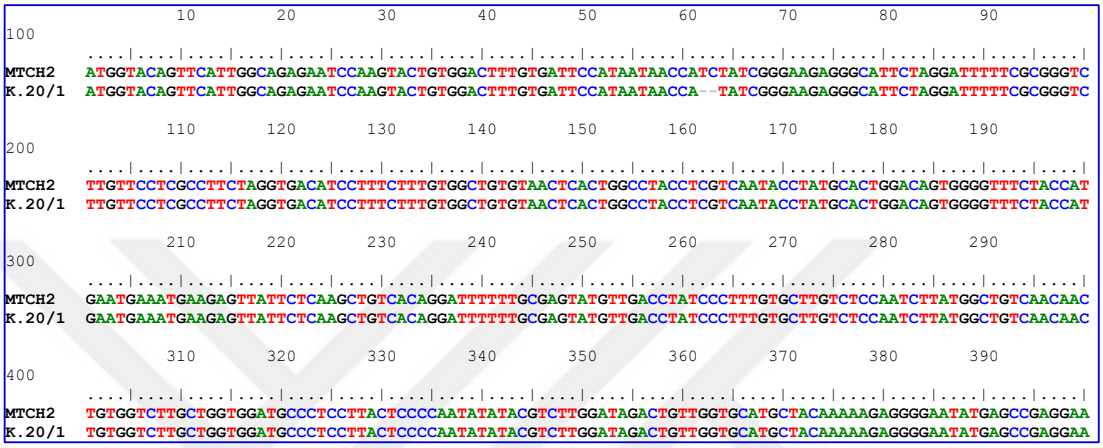
MTCH2 geni *knockout* edilen hücrelerin homozigot/heterozigot olduğu bilgilerini elde etmek, beklenen mutasyonların hedeflenen bölgede oluşup oluşmadığını saptamak amacıyla; transformant bir bakteri kolonisinden izole edilen plazmitlerin çok yüksek olasılıkla tek tip olduğu bilgisi temel alınarak birden fazla sayıda plazmit üzerinde taşınan *MTCH2* geni DNA dizi analizi ile incelendi. Klon 14 *MTCH2* cDNA'sı taşıyan 6 adet plazmit örneği; klon 20 *MTCH2* cDNA'sı taşıyan 5 adet plazmit örneği dizilendi (Şekil 29). Aşağıdaki verilen dizilerden de görüldüğü gibi klon 14'e ait dizilenen *MTCH2* cDNA örneklerinden üçünün (K.14/2, K.14/3 ve K.14/5) pseudo *MTCH2* geni olduğu diğer iki örneğin (K.14/4 ve K.14/6) ise 63. nükleotid sonrasında 5 nükleotid delesyonlu olduğu saptandı. Bir örnekte (K.14/1) ise 63-190. nükleotidler arsında büyük bir delesyon ve yeni farklı nükleotid eklenmeleri saptandı. Örnekler arasında doğal *MTCH2* dizisine sahip örnek saptanmadı.

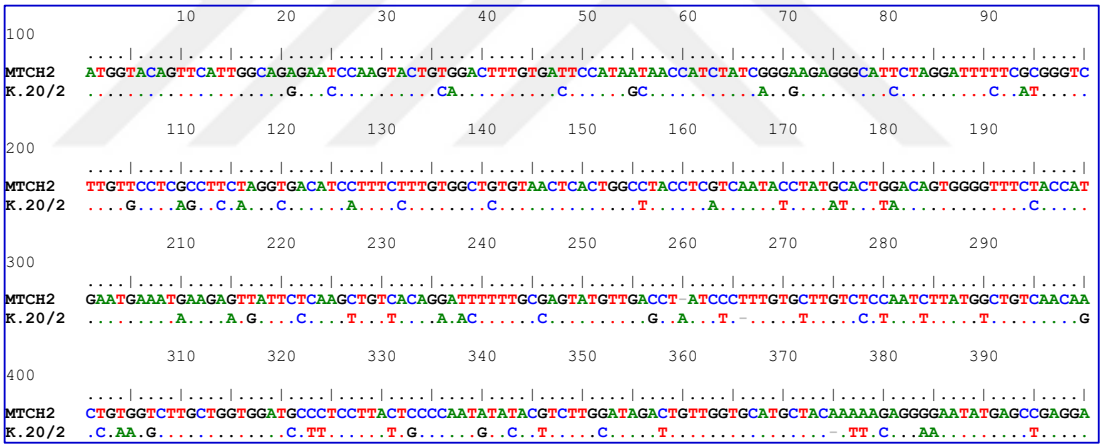


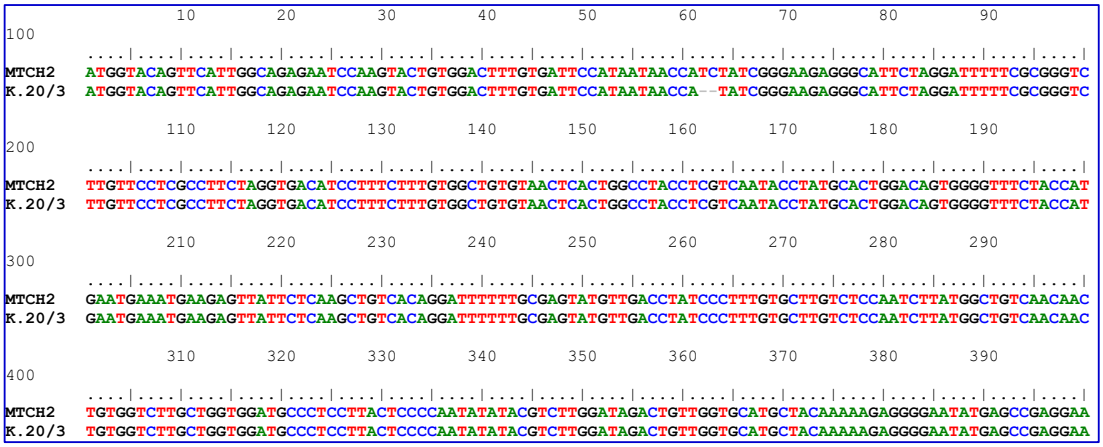


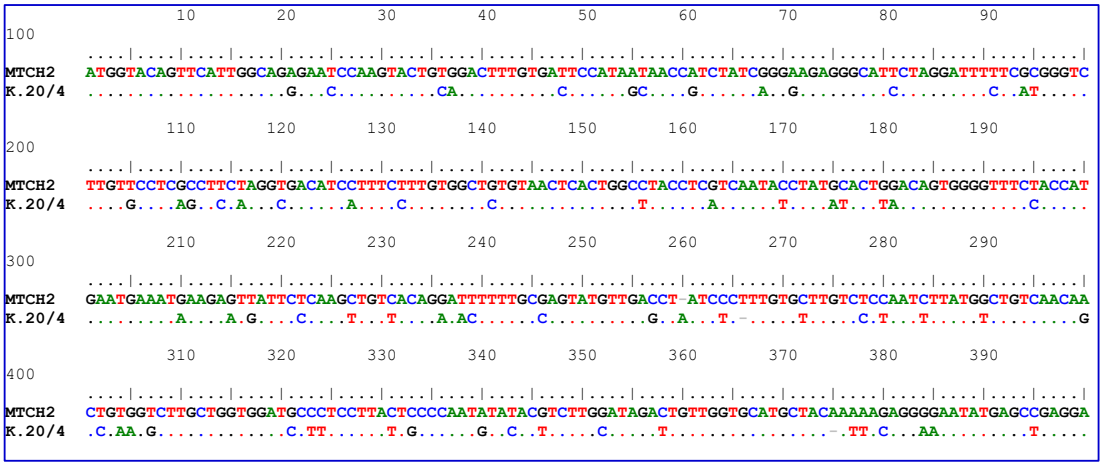
Şekil 29. Klon 14'e ait *MTCH2* cDNA örneklerinin kromotogram sonuçlarının analizi.

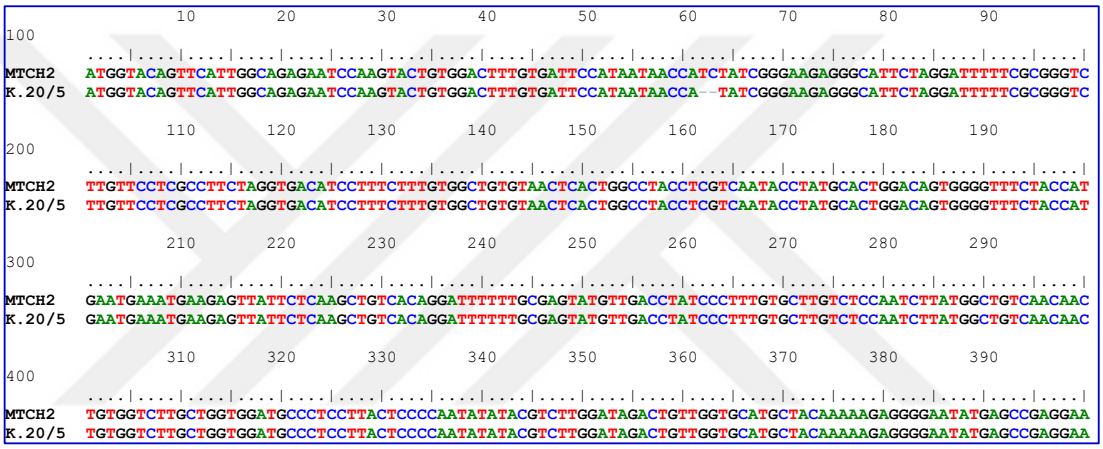
Klon 20 *MTCH2* cDNA'sı taşıyan 5 adet plazmit örneği analiz edildi. Bu örneklerden ikisinin (K.20/2 ve K.20/4) psödo *MTCH2* cDNA'sı, üç örneğin (K.20/1, K.20/3 ve K.20/5) ise 61.nukleotid sonrasında iki nükleotid delesyonlu olduğu belirlendi. Bu örnekler arasında da doğal *MTCH2* dizisine sahip cDNA saptanamadı.







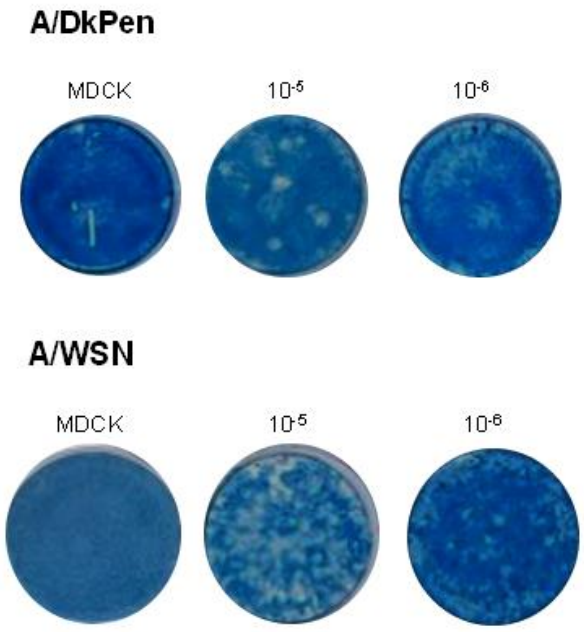




Şekil 30. Klon 20'ye ait *MTCH2* cDNA örneklerinin kromotogram sonuçlarının analizi.

6.6. İnfluenza A Virüslerinin Titrasyonu ile İlgili Veriler

Tez çalışmasında kullanılan influenza A virüsü stoklarında virüs titrasyonları MDCK hücreleri kullanılarak plak testleri ile belirlendi. 12-kuyulu plaklarda tam tabaka oluşturacak şekilde üretilen MDCK hücreler, T-FTS içerinde hazırlanan %1 BSA çözeltisinde belirli oranlarda seyreltilmiş virüs önekleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan sonra hücreler agaroz içeren muhafaza besiyerinde yaklaşık 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler fikse edildi ve amido black boyası ile boyanarak enfeksiyon odaklar (plaklar) görünür hale getirildi (Şekil 30). Oluşan plak sayıları ve seyreltme oranlarına göre virüs titreleri plak oluşturan birim/ml (*İng. plaque forming unit; pfu/ml*) olarak belirlendi. Influenza A/WSN virüsleri için ortalama 1-3x10^7 pfu/ml, influenza A/DkPen virüsleri içi 2-5x10^6 pfu/ml virüs titrasyonları saptandı.



Şekil 31. İnfluenza A/DkPen ve A/WSN virüslerinin plak testi ile titrasyonu. Virüslerin titrasyonunda 12-kuyulu plaklarda üretilen MDCK hücreleri kullanıldı. Hücreler şekil üzerinde belirtilen oranlarda seyreltilen virüs örnekleri ile (250 µl/kuyu) ile enfekte edildi.

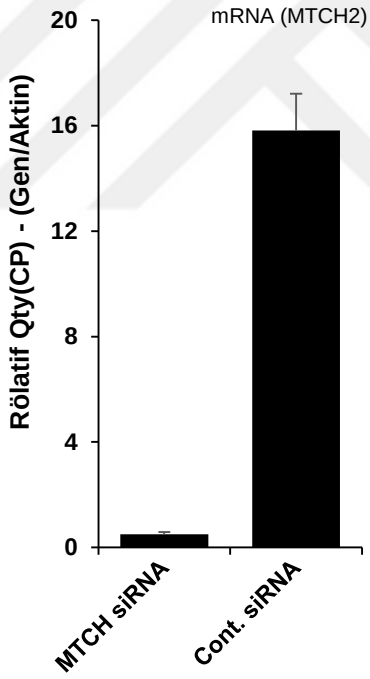
6.7. Hücrelerde MTCH2 Düzeyinde Meydana Gelen Değişikliklerin İnfluenza A Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile ilgili Veriler

Maya hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösterdiği saptanan insan MTCH2 proteinin insan orijinli HeLa ve HEK293 hücrelerinde virüs replikasyonuna etkilerini saptamak için farklı yöntemler izlendi. *i. MTCH2* geni için tasarlanmış siRNA'lar ile hücrelerde *MTCH2* transkript düzeyinin düşürülmesi (*knockdown*) ve bu hücrelerde viral replikasyonun viral RNA temelinde kantitatif PZR ile; protein temelinde viral proteinlerin Western melezleme ile analizi. *ii.* pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen ve protein düzeyi arttırılan hücrelerde viral replikasyonun viral proteinlerin Western melezleme ile analizi. *iii.* CRISPR/Cas9 tekniği ile elde edilen ve *MTCH2* geni için delesyonlu olduğu saptanan hücrelerde viral replikasyonun protein temelinde analizi ya da bu hücrelerde viral çoğalmanın plak testi ile saptanması. *iv. MTCH2* geni susturulan hücrelerde ya da plazmit transfeksiyonu ile MTCH2 protein düzeyi arttırılan

hücrelerde influenza A virüsü mini replikon'ları kullanılarak, viral RNA polimeraz enzimi aktivitelerinin saptanması.

6.7.1. *Knockdown* Edilen HeLa hücrelerinde Viral Replikasyonun Seyri ile İlgili Veriler

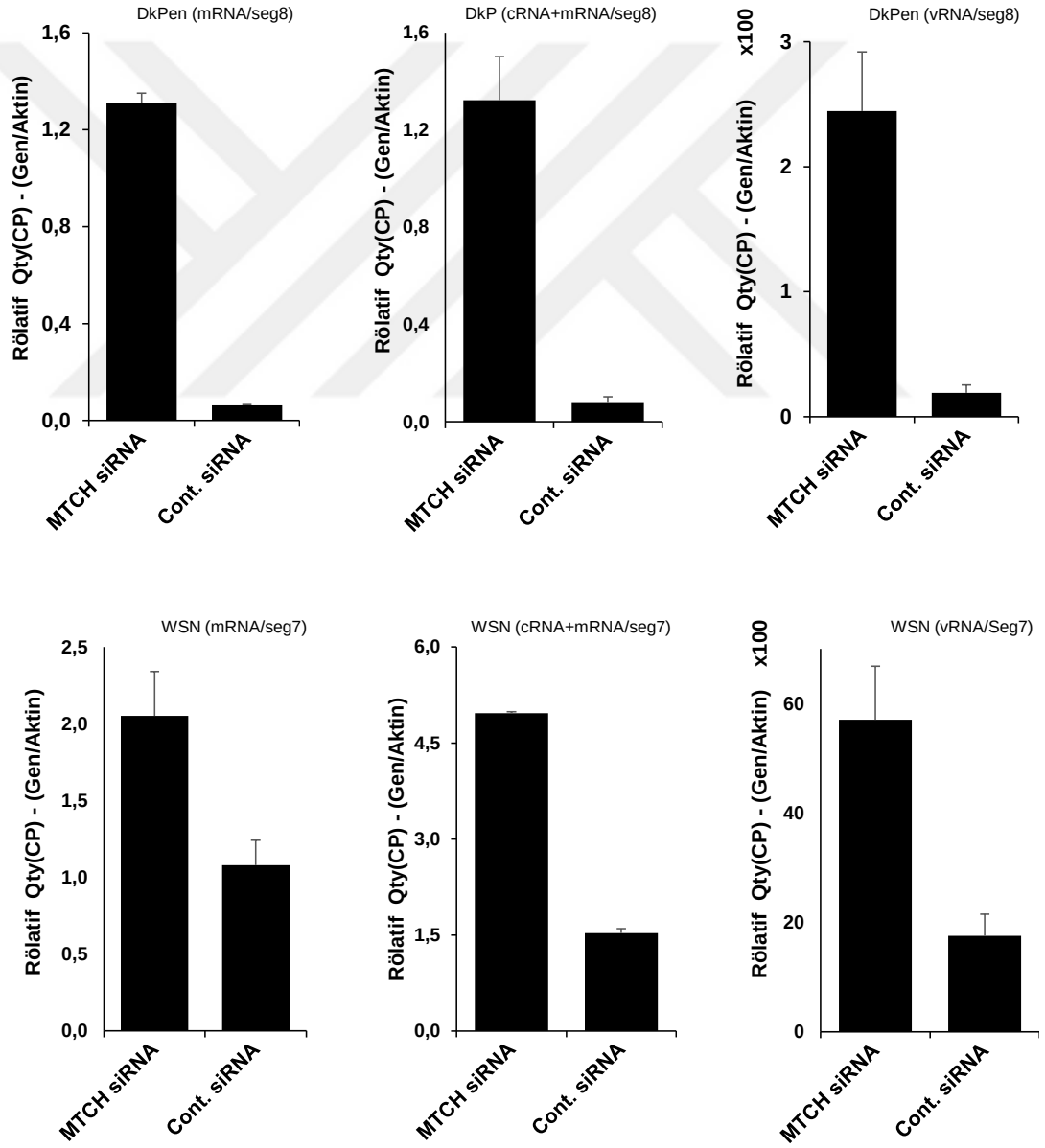
MTCH2 geni için tasarlanmış siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerden, transfeksiyondan 60 saat sonra ekstre edilen RNA moleküllerinde *MTCH2* ve *ACTB* transkript düzeye gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. *MTCH2* transkript düzeyi hücresel *ACTB* transkript düzeyi ile normalize edilerek, *MTCH2* transkript düzeyindeki düşüş ortaya kondu (Şekil 32). Elde edilen sonuçlar, özgün siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinden *MTCH2* transkript düzeyinin rölatif olarak ortalama % 95'in üzerinde azaldığını gösterdi.



Şekil 32. *MTCH2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde endojen *MTCH2* transkript düzeyi.

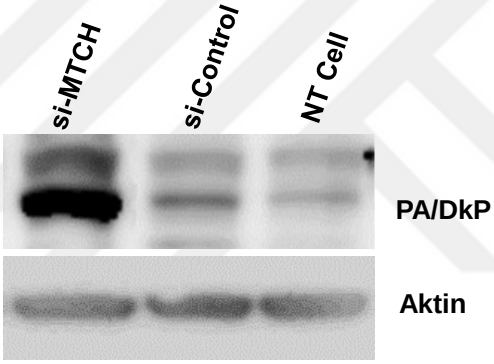
MTCH2 geni *knockdown* hücrelere siRNA transfeksiyonundan 72 saat sonra ~0.2 moi dozda İnfluenza A/WSN ve A/DkPen tipi virüsler ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücrelerden ekstre edilen RNA molekülleri arasında viral RNA moleküllerinin (vRNA, cRNA+mRNA ve mRNA) düzeyleri kantitatif PZR

(qPZR) tekniği ile ortaya kondu (Şekil 33). Deney sonuçları, *MTCH2* geni *knockdown* edilen hücrelerde özellikle DkPen tipi virüsler ile enfekte hücrelerde tüm viral RNA moleküllerinde (mRNA, cRNA+mRNA, vRNA) düzeylerinin kontrol hücrelere göre büyük oranda artış gösterdiği saptandı. Benzer şekilde İnfluenza A/WSN virüsleri ile enfekte hücrelerde de viral RNA moleküllerinin kontrol hücrelere oranla anlamlı düzeyinde arttığı bununla birlikte bu ataşın DkPen tipi virüse göre daha düşük düzeyde olduğu görüldü.



Şekil 33. *MTCH2* genine özgü siRNA (*MTCH2* siRNA) ile *knockdown* edilen ve sonrasında İnfluenza A/DkPen veya İnfluenza A/WSN virüsler ile enfekte edilen HeLa hücrelerinde viral RNA moleküllerinin qPZR ile kantitasyonu. Hücreler 12-kuyulu plaklarda üretildi ve 20 pM siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra enfekte edilen hücrelerden, enfeksiyondan 8 saat sonra total RNA ekstraksiyonu yapıldı ve bu RNA'lardan hazırlanan cDNA'larda viral RNA miktarları belirlendi.

Viral RNA'ların kantitasyonu ile birlikte enfeksiyondan 12 saat sonra hazırlanan hücre lizatlarında viral protein (PA proteini) ve hücresel ACTB protein düzeyleri Western melezleme tekniği ile bakıldı (Şekil 34). Elde edilen veriler, Şekil 33'te verilen viral RNA düzeyleri ile paralellik gösterdiğini, virüs proteinlerinde de belirgin olarak artış olduğunu, dolayısıyla viral replikasyonun *MTCH2* geni susturulan hücrelerde pozitif yönde etkilendiğini ortaya koydu.

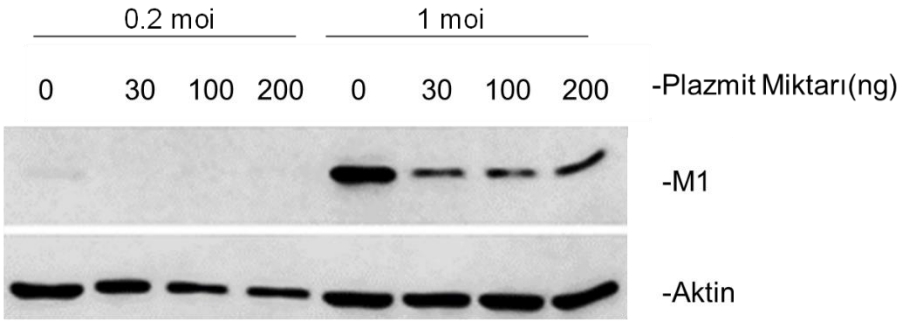


Şekil 34. *MTCH2* geni için *knockdown* edilen ve İnfluenza A/DkPen tipi virüs ile enfekte edilen HeLa hücrelerinde viral PA proteinin Western melezleme ile analiz edilmesi. Hücreler enfeksiyondan 12 saat sonra SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda parçalandı. Proteinler, 100x100x1 mm boyutlarda %10'lu poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırdı ve PVDF membrana transfer edildi. Membran poliklonal tavşan anti-PA antikorları ya da monoklonal fare anti-aktin antikorları ile işleme kondu. Sekonder antikor olarak HRP konjuge keçi anti-tavşan IgG ya da anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Elektroforez işlemi 140 V/jel sabit gerilim altında 75 dakikada tamamlandı.

6.7.2. HEK293 hücrelerinde Geçici Transfeksiyon ile MTCH2 Protein Düzeyindeki Artışın Viral Replikasyona Etkileri ile İlgili Veriler

Bu deneylerde HEK293 hücreleri kullanıldı. 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra hücreler 0.2 moi ve 1 moi dozda İnfluenza A/DkPen virüsü ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücreler SDS-PAGE örnek yükleme tamponu

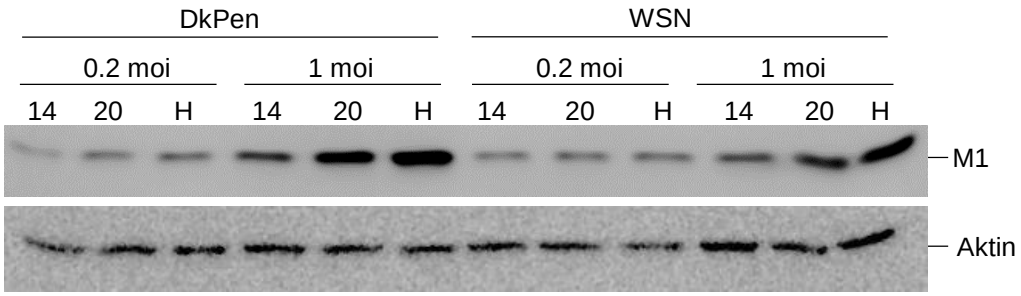
içerisinde parçalandı ve hücre lizatlarında proteinler Western melezleme ile analiz edildi (Şekil 35). Elde edilen veriler hücrelerde *MTCH2* geni ekspresyonundaki artışın viral replikasyonda yavaşlamaya neden olduğunu ortaya koydu.



Şekil 35. MTCH2 proteini kodlayan plazmit vektörü ile geçici olarak transfekte edilen ve sonrasında influenza A/DkPen virüsü ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinde viral M1 proteini miktarlarının Western melezleme ile incelenmesi. Hücreler şekil üzerinde gösterilen miktarlarda pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edildi. K. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak tavşan monoklonal anti-M1 antikoru, sekonder antikor olarak ise HRP konjuge keçi anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı. Elektroforez işlemi belirtilen koşullarda (bkn. Gereç ve Yöntem 5.25.) gerçekleştirildi. Protein bantları kemilüminesans substrat (BioVision, 6A20K08200) ile görüntülendi. Görüntülemede DNR Bio marka jel görüntüleme cihazı kullanıldı.

6.7.3. CRISPR/Cas9 Tekniği ile Knockout edilen HEK293 Hücrelerinde Viral Replikasyonun Seyri ile İlgili Veriler

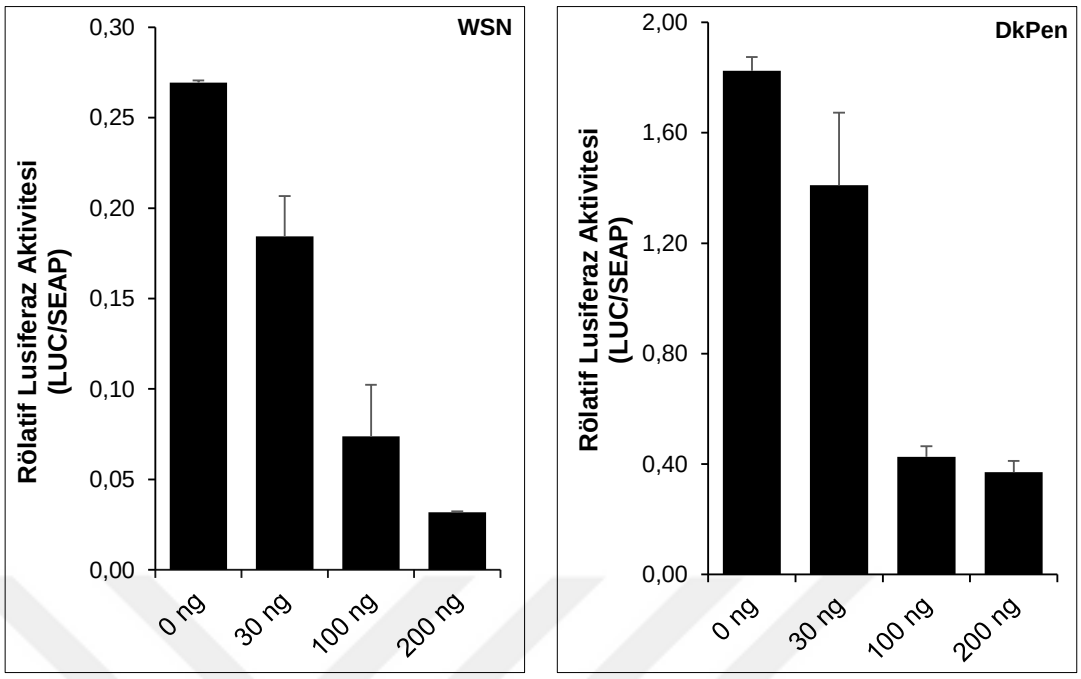
MTCH2 genini hedef alan ve *knockout* olmasını sağlayan CRISPR/cas9 plazmitiyle transfekte olan hücre hatları influenza A/DkPen ve influenza A/WSN virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 10 saat sonra SDS örnek tamponu içerisinde parçalanan hücre lizatlarında influenza virüsü M1 proteini miktarları Western melezleme tekniği ile karşılaştırıldı (Şekil 36). Virüs ile enfekte olan kontrol HEK293 hücreleri ile karşılaştırıldığında, *MTCH2* geni bakımından *knockout* olduğu belirlenen klon 14 ve klon 20 hücrelerinde viral M1 protein miktarında siRNA'lar ile *knockdown* edilen hücrelerin aksine bir artış görülmedi, nispeten bir azalma saptandı.



Şekil 36. *Knockout* edilen hücre hatlarının influenza A/DkPen ve influenza A/WSN virüsü ile enfeksiyon sonrası virüs M1 protein miktarının Western melezleme tekniği ile analizi. 14. Virüs ile enfekte klon 14, 20. virüs ile enfekte klon 20, H. Virüs ile enfekte HEK293 hücresi. Elektroforez ve Western melezleme işlemleri (bkn. Gereç ve Yöntem 5.25.) belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.7.4. İnfluenza A Virüsü Mini-Replikon Modeli ile Elde Edilen Veriler

İnsan MTCH2 proteinin etkileşim halinde olduğu influenza PA proteininin viral RNA polimeraz enziminin alt ünitesi olması nedeniyle, bu proteinin viral RNA polimeraz enzimine olası etkileri minireplikon modeli (Turan ve ark., 2004) üzerinde araştırıldı. Deneylerde MTCH2 proteininin etkileri test edildi. Geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde MTCH2 protein miktarındaki artışın hem influenza A/WSN virüsü hem de DkPen virüsü RNA polimerazın enzimi üzerinde negatif etkili olduğu saptandı (Şekil 37).

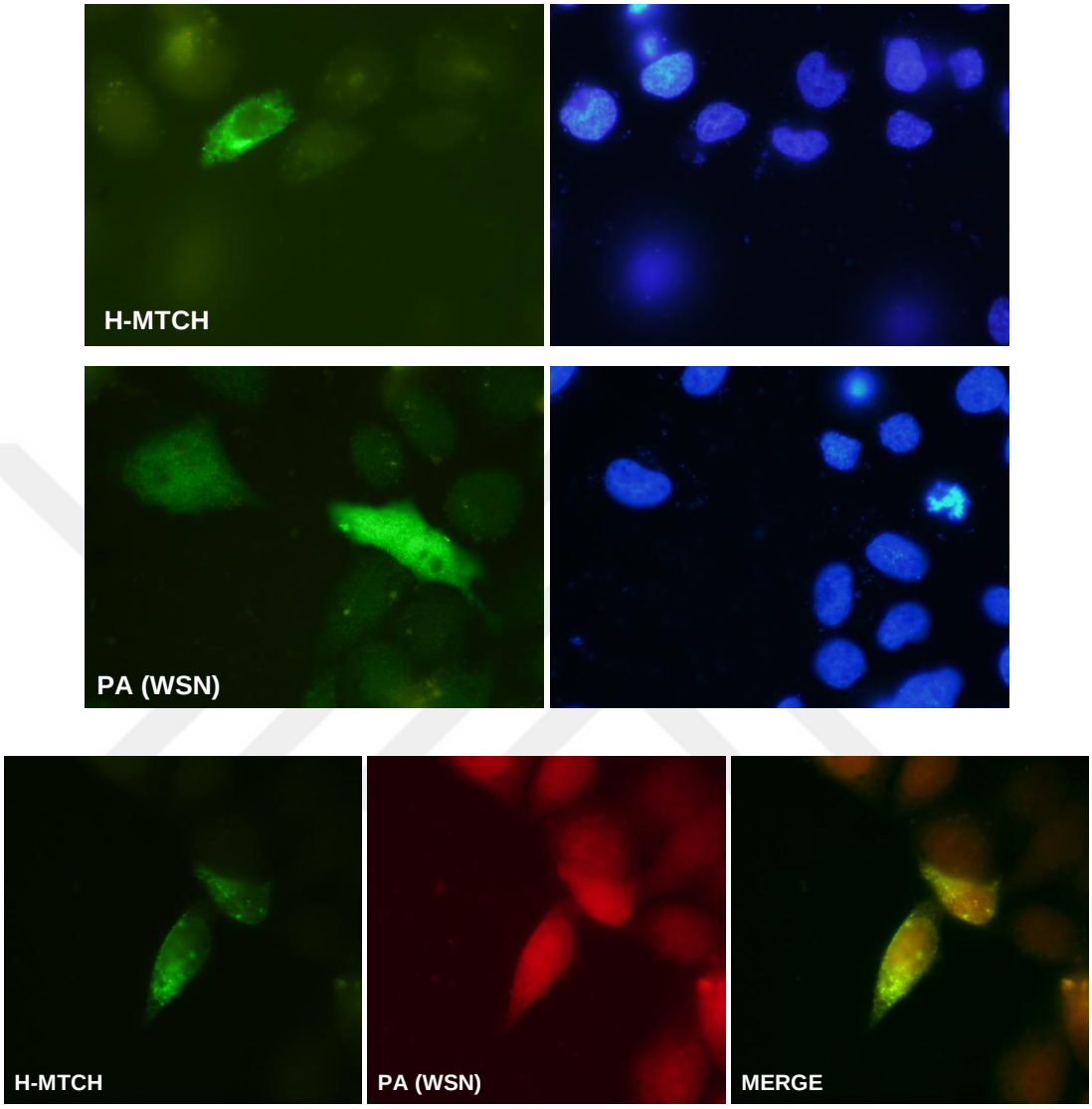


Şekil 37. HEK293 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile miktarı arttırılan MTCH2 proteininin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri. 24-kuyulu kültür plaklarında üretilen HEK293 hücreleri belirlenen miktarlarda minireplikon plazmitleri ve artan miktarlarda MTCH2 kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyerlerinde belirteç SEAP aktiviteleri ticari SEAP assay kiti ile belirlendi. Belirteç lusiferaz aktivitesi SEAP aktivitesi ile normalize edildi.

6.8. **Birlikte Sentez Edilen Viral PA ve MTCH2 Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler**

Plazmit vektörleri ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde influenza virüsü PA ve MTCH2 proteinlerinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyon profilleri immünfloresan teknikler ile saptandı. Hücreler transfeksiyondan 40-44 saat sonra Gereç ve Yöntemler kısmında (bak. 5.26.) açıklandığı şekilde paraformaldehit ile fikse edildi. Hücreler fare monoklonal anti-HA antikoru (HA uzantılı MTCH2 için) ve/veya tavşan poliklonal anti-PA antikorları ile işleme kondu. Daha sonra Alexa-488 ve/veya Alexa-568 ile konjuge sekonder antikorlar ile işaretlenen proteinler floresan mikroskop altında incelendi (Şekil 38). Genel olarak değerlendirildiğinde ele alınan *MTCH2* geninin HeLa hücrelerinde ekspresyon yaptığı, HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden sentez edilen influenza A virüsü PA proteininin MTCH2 proteini

ile benzer lokalizasyon profilleri verdiği ve önemli ölçüde ko-lokalizasyon gösterdiği saptandı.



Şekil 38. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan MTCH2 proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve MTCH2 proteinlerinin lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare orijinli anti-HA antikoru (1/300 seyreltme) ve tavşan orijinli anti-PA antikoru (1/300 seyreltme); sekonder antikor olarak ise Alexa 568-konjuge anti-fare IgG antikoru (1/300 seyreltme) ve Alexa 488-konjuge anti-tavşan IgG antikoru (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfluenza A virüsleri sekiz parçadan oluşan tek iplikli negatif polaritede RNA genomuna sahip membranlı virüslerdir. Virüs RNA molekülleri nükleoprotein (NP) ile kompleks halinde viral ribonükleoprotein partikülleri (vRNP) şeklindedir (Couch, 1996). Bu virüslerin enfeksiyon yaptıkları hücrelerde virüs RNA moleküllerinin replikasyonunu ya da transkripsyonunu gerçekleştirecek enzimler bulunmamaktadır. Bu işlevleri gerçekleştirecek RNA-bağımlı RNA polimeraz (*İng. RNA-dependent RNA polymerase : RdRp*) enzimi vRNP'ler bağlı olarak taşınmaktadır. İnfluenza virüsü RdRp enzimi virüsün en büyük ilk üç RNA segmenti üzerinden kodlanan PB2, PB1 ve PA proteinlerinden oluşan heteromerik yapıda bir enzimdir (Coloma ve ark., 2009). RdRp enzimi viral RNA'ların hem replikasyonunu hem de transkripsiyonunu (viral RNA'lar üzerinden mRNA moleküllerinin sentez edilmesini kataliz eder (Nagata ve ark., 2006).

İnfluenza virüsleri membranda bulunan glikoprotein yapıda hemaglutinin (HA) antijenleri vasıtasıyla konak hücre membranında yer alan proteinlere bağlı sialik asit bakiyelerine tutunurlar. Bu bağlanma sonrasında virüs partikülleri hücre tarafından fagosite edilir (Skehelve Wiley, 2000). Dolayısıyla influenza virüsü ve konak hücre proteinleri arasındaki etkileşim viral tutunma ile başlar ve hücre içerisinde bu etkileşimler artarak çok daha karmaşık hal alır. Hücrelerde endozom içerisinde yer alan virüs partiküllerine ait vRNP'ler, başta HA proteini olmak üzere virüse ait M1 ve M2 proteinlerinin katkısı ile viral ve endozom membranlarının kaynaşması sonucunda sitoplazmada serbest kalırlar. İnfluenza A virüslerinde viral replikasyon ve transkripsiyon olayları, diğer birçok RNA virüsünün aksine konak hücre nukleusunda gerçekleşir. Bunun önemli nedenlerinden biri, virüs transkripsiyonunun konak hücre RNA polimeraz II enzimi kompleksine olan bağımlılığıdır (Ahlquist, 2002). Bu nedenle sitoplazmada serbest kalan vRNA'lerin nukleusa taşınması söz konusudur. Sitoplazma-nukleus arası transport işlemleri rastgele işlemler olmayıp nukleus por kompleksini oluşturan proteinler ve kargo taşıyıcı bir dizi proteinin fonksiyonu sonucunda gerçekleşen olaylardır (Han ve ark., 2010). Dolaysıyla bu aşamada da vRNP'leri oluşturan proteinler birçok hücresel protein ile etkileşime girer. Sadece sitoplazmadan nukleusa geçiş aşamasında değil, nukleusta oluşan yeni vRNP'lerin sitoplazmaya taşınmasında da nükleer por

kompleks proteinleri ile influenza A virüsü NS2 ve M1 proteinleri rol alırlar (Satterly ve ark., 2007).

Konak hücre nukleusuna taşınan vRNP'ler üzerinden viral mRNA moleküllerinin sentez edilmesi, vRNA'ler üzerinde taşınan virüs RdRp enzimi katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu işlemler için viral RdRP enzimi konak hücre RNA polimeraz II enzimi kompleksi tarafından yeni sentez edilmekte olan hücresel mRNA'ların 5-ucundan 7-metil guanozin şapka yapısı ile birlikte ortalama 10-13 nükleotidden oluşan kısmını keserek, viral mRNA moleküllerinin sentezinde primer olarak kullanırlar. "*Cap-snacthing*" olarak tanımlanan bu olayda viral RdRp enzimini oluşturan protein alt ünitelerinden PB2, konak mRNA'nın 5'-Cap yapısına bağlanmada, PA alt ünitesi ise nükleaz aktivitesi ile kesme işlevini yerine getirir (De Vlugt ve ark., 2018). Bu durum viral RdRp enzimini oluşturan alt ünitelerinin de birçok hücresel protein ile ilişki içerisinde işlevlerini gerçekleştirebildiğini ortaya koymaktadır.

Viral enfeksiyonlara karşı konak organizmalar gerek hücre dışında gerekse hücre içeresinde viral replikasyonu yavaşlatacak ya da inhibe edecek çeşitli savunma mekanizmalarına sahiptirler. Hücre içerinde özellikle interferonların etkisi ile sentezi indüklenen Mx1, MxA ve ve RNaz L gibi proteinler (Kodym ve ark., 2009) değişik etki mekanizmaları ile viral replikasyon üzerinde negatif yönde etki gösterirler. Bu proteinlere viral replikasyon sırasında oluşan çift zincirli RNA molekülü ile aktive olan protein kinaz-R (PKR) ve mRNA moleküllerinin yıkımından sorumlu 2'-5' oligoadenilat sentazı (OAS) da eklemek gerekir (Knapp ve ark., 2003).

Mevcut literatür verileri, influenza A virüslerinin viral replikasyonun başlangıcı olan virüsün konak hücreye tutunması aşamasından, yeni oluşan virüs partiküllerinin serbestleşmesine kadar gerçekleşen olaylar sırasında onlarca hücresel protein ile etkileşim içerisine girdiğini açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Virüs ile ilişki içerinde olan bu proteinlerin bir kısmı viral replikasyon üzerinde negatif yönde etki gösterirken (Kodym ve ark., 2009). bazı proteinler virüsün çoğalmasını kolaylaştırıcı etki yapmaktadır (Chen ve ark., 2014). Söz konusu konak proteinlerin neler olduğu ve viral replikasyon üzerinde hangi yönde ve ne tür mekanizmalar ile etki yaptığının ortaya konması, virüsler ile mücadelede strateji geliştirmede hayati

önem taşımaktadır. Bu bağlamda tez çalışması kapsamında, proteinler arası ilişkilerin belirlenmesinde önemli tekniklerden olan, maya ikili-hibrit tekniği ile influenza A virüsü PA proteini ile ilişkili olduğu belirlenen *Mitokondriyal Taşıyıcı Homolog Protein* 2'nin (İng. *Mitochondrial carrier homolog protein 2-MTCH2*) influenza A virüsü replikasyonu açısından önemi araştırıldı.

MTCH2 proteini, 11 no'lu kromozom üzerinde lokalize olan, 38299 baz çiftinden oluşan (chr11:47,604,309-47,642,607) *MTCH2* geni üzerinden kodlanmaktadır. (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTCH2 , Erişim tarihi 01.03.2022). Bu proteinin virüsler ile ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. MTCH2 proteinin işlevi çok iyi bilinmemekle birlikte, son yılarda yapılan çalışmalarda obezite ve apoptoz ile ilişkili olduğu belirtilmektedir.

Maya hücrelerinde, plazmit vektör üzerinden kodlanan ve bait (yem) olarak kullanılan influenza A virüsü PA proteinin MTCH2 proteini ile etkileşim içinde olduğu belirlenmiştir (yayımlanmamış veri). Maya ikili-hibrit metodu hücre içerisinde proteinler arası etkileşimlerin saptanmasında ve proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde etkili bir yöntem olmakla birlikte, yapay bir sistem olması ve çoğunlukla ele alınan proteinler için doğal bir ortam olmaması nedeniyle tek başına yeterli bir teknik değildir. Bu nedenle maya hücrelerinden elde edilen verilerin, farklı teknikler ile desteklenmesi gerekir. Memeli hücrelerinde de bu etkileşimin olup olmadığının ortaya konması ve MTCH2 proteininin influenza A virüsü replikasyonu üzerinde nasıl bir etki yaptığının saptanması tez çalışmasının amacını oluşturmuştur. Bu amaç doğrultusunda, DNA teknolojilerinden de yararlanılarak oluşturulan yapay sistemlerden yararlanıldı.

Çalışmada, MTCH2 proteinin HeLa ya da HEK293 hücrelerinde miktarını arttırmak için pCHA-MTCH2 plazmit vektörü (Şekil 15 ve 16); HEK293 hücrelerinde MTCH2 genini CRISPR/Cas9 tekniği ile *knockout* etmek için pCas9-MTCH2-1 ve pCas9-MTCH2-2 plazmit vektörleri (Şekil 18); *knockout* hücrelerin analizinde MTCH2 cDNA'larının analizinde pM-MTCH2 (cDNAs) plazmit vektörleri (Şekil 26) oluşturuldu. pCHA-MTCH2 vektörünün elde edilmesinde MTCH2 geni reverz transkripsiyon-PZR (RT-PZR) ile HEK293 hücrelerine ait cDNA üzerinden elde edildi ve pCHA plazmit vektöründen EcoRV restriksiyon

endonükleaz enzimi hedef bölgesine, tavuk ovalbümin geni promotörü kontrolünde klonlandı. CRISPR/Cas9 tekniği ile MTCH2 genini *knockout* etmek için belirlenen hedef dizilere bağlanacak olan gRNA dizilerini kodlayan kısa çift zincirli DNA fragmentleri, komplementer sentetik oligonukleotid primerlerin eşleştirilmesi (*anneling*) ile elde edildi ve pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmitinde BbsI restriksiyon endonükleaz enzimi hedef bölgesinde *scaffold* RNA kodlayıcı diziye eklenecek şekilde klonlandı (Şekil 17). *Knockout* edilen HEK293 hücreleri arasından seçilen tek hücreden türetilen klonlarda, genom üzerinde hedef MTCH2 geninde beklenen bozulmanın gerçekleşip gerçekleşmediğini saptamak için, DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere, bu hücrelerde sentez edilen MTCH2 mRNA'ları üzerinden RT-PZR ile elde edilen cDNA'lar pM plazmit vektöründe SmaI restriksiyon endonükleaz enzimi hedef bölgesine klonlandı. Elde edilen tüm plazmit DNA'ları koloni-PZR, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim ve/veya DNA dizi analizi teknikleri ile incelendi ve doğrulukları ortaya kondu (Şekil 27; 28; 29; 30)

MTCH2 oldukça yeni tanımlanmış, Bcl-2 protein ailesinin pro-apoptotik üyesi olan BID (*BH3-interacting domain death agonist*) proteini için reseptör gibi işlev gören mitokondriyal dış membran üzerinde lokalize olmuş bir proteindir (Zaltsman ve ark., 2010). Bu çalışmada hücrelerde MTCH2 ekspresyon düzeyini geçici transfeksiyon ile yapay olarak arttırmak için pCHA-MTCH2 plazmit vektörü kullanıldı. HeLa hücrelerinde bu plazmit üzerinden kodlanan HA-uzantılı MTCH2 (H-MTCH2) proteinin ekspresyonu ve hücre içi lokalizasyonu immünfloresan teknikler ile belirlendi. H-MTCH2 proteinin transfekte hücrelerde etkin olarak sentez edildiği ve sitoplazma içerisinde tipik mitokondrial lokalizasyon gösterdiği ortaya kondu (Şekil 21).

Maya hücrelerinde influenza virüsü RdRp enzimi PA alt ünitesi ile etkileşim gösteren MTCH2 proteinin, memeli hücrelerinde virüs replikasyonunun olası etkilerini saptamak için hücrelerde (HEK293) bu proteinin miktarı geçici transfeksiyon ile arttırıldı. Değişen miktarlarda MTCH2 proteini kodlayan pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen, dolayısıyla MTCH2 protein miktarı değiştirilen hücrelerde iki farklı yöntem izlenerek viral replikasyonunun nasıl etkilendiği değerlendirildi. MTCH2 proteini RNA polimeraz alt ünitesi olan PA

proteini ile ilişkilendirildiği için, bu proteinin öncelikle viral RNA polimeraz enzimine etkileri araştırıldı ve bunun için (Turan ve ark., 2004) tarafından geliştirilen influenza virüsü mini-replikon modelinden yararlanıldı. İnfluenza A virüsü mini-replikon modeli viral RdRp enzimi alt ünitelerini (PB1, PB2 ve PA) ve NP'yi kodlayan ekspresyon vektörleri ve influenza A virüsü sekizinci RNA segmentinin (NS1 ve NS2 proteinlerini kodlar) 5'- ve 3'- uçlarındaki translasyona katılmayan bölgeleri (NTR: non-translated region) arasına ters oryantasyonda lüsiferaz geni taşıyan yapay viral RNA kodlayan bir belirteç plazmit vektöründen (pHH21-vNS-Luc) oluşmaktadır. İnfluenza virüsü mini-replikon modeli özellikle hücresel proteinlerin direkt olarak viral RNA polimeraz enzimine etkilerini saptamak için önemli veriler sunan yapay bir sistemdir (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018; Gelmez, 2019; Koçmar ve ark., 2022). Bazı hücresel proteinlerin hücre içi miktarlarındaki artışlar, transkripsiyon ve/veya translasyonu önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Min ve ark., 2007). Bu durum mini-replikon modelleri için bir dezavantaj olmakla birlikte, sisteme eklenen ve hücresel RNA polimeraz II enzimi promotörü kontrolünde anlatımı yapılan belirteç bir enzim (bu çalışmada SEAP kullanılmıştır) sonuçların normalizasyonuna olanak sunmaktadır. Bu çalışmada artan miktarlarda pCHA-MTCH2 plazmit DNA'sı ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde hem influenza A/WSN virüsü hem de A/DkPen virüsü RNA polimerazın enzimi aktivitesinde önemli ölçüde azalma olduğu saptandı (Şekil 37). Enzim aktivitesindeki bu azalmanın MTCH2 proteinin PA proteinine bağlanması ve RdRp enzim kompleksinin oluşmasında negatif etki yapmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu etkinin moleküler düzeyde mekanizması hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Hücrelerde MTCH2 protein miktarındaki artışın influenza A virüsü replikasyonunu saptamak için ikinci yol olarak; pCHA-MTCH2 plazmiti ile transfekte edilen hücreler virüs ile enfekte edildi ve virüsün erken evre replikasyonu, viral proteinler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilerek değerlendirildi. Hücreler transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra farklı dozlarda İnfluenza A/DkPen virüsü ile enfekte edildi ve enfeksiyondan 8 saat sonra, viral M1 protein düzeyleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar MTCH2 proteini miktarındaki artışın viral replikasyon üzerinde negatif yönde bir etki yaptığını, transfekte edilen hücrelerde viral protein düzeyinin kontrole göre daha düşük

düzeyde olduğunu ortaya koydu (Şekil 35). Bu sonuç, mini-replikon modeli ile elde edilen verileri destekler nitelikte verilerdir.

Ökaryotik hücrelerinde, proteinlerin işlevlerini saptamak için izlenen *in vivo* yöntemlerden biri de yukarıda belirtildiği gibi ilgili protein miktarının yapay olarak arttırılmasının yanı sıra, bu protein düzeyinin düşürülmesi ya da tamamen ortadan kaldırılması yöntemidir. Belirli bir proteinin hücrelerde sentezinin tümüyle bloke edilmesi ilgili genin inaktive edilmesi (*knockout*) ile mümkündür. *Knockout* işlemleri hücre için esansiyel olan genler için uygulanabilir değildir. Buna karşın, siRNA (small interfering RNA) kullanarak genlerin işleyişini transkript düzeyinde kontrol etme olanağı sağlayan RNA interferens (RNAi) tekniği, istenilen genlerin hücre içi transkript düzeylerinin dolayısıyla ilgili proteinlerin miktarlarının düşürülmesine imkân sağlamaktadır. RNAi tekniği 1998'de Carnegie Bilim Enstitüsü'nden Andrew Fire ve Massachusetts Üniversitesi'nden Craig Mello tarafından *Caenorhabditis elegans* adlı nematodda gen ekspresyonu üzerinde yaptıkları çalıştırmalar sırasında keşfedilmiştir (Fire ve ark., 1998). Bu araştırmacılar RNAi ile ilgili çalışmalarından dolayı 2006 yılında Nobel ödülü almışlardır. Daha sonraki yıllarda Elbashir ve arkadaşları (Elbashir ve ark., 2001) sentetik siRNA'ların memeli hücrelerinde RNAi sistemini indükleyebileceğini gösterdiler. Bu keşifler, siRNA tekniklerinin hem moleküler hücre biyolojide ve moleküler genetik alanında yapılan bilimsel çalışmalarda hem de biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasının önünü açtı. RNAi teknolojisi sadece hücresel proteinlerin işlevlerini saptamak için değil, aynı zamanda özellikle viral replikasyon açısından proteinlerin önemini ve etkilerini saptamak için de kullanılmaktadır. Pirinçal ve ark. (Pirinçalve Turan, 2021), RNA helikazlar arasında yer alan DDX56 proteinini kodlayan *DDX56* geni siRNA'lar ile *knockdown* edilen hücrelerde influenza A virüsü replikasyonunu negatif yönde etkilediğini, dolayısıyla bu proteinin viral replikasyon için pozitif regülatör olduğunu belirlemişlerdir. Benzer şekilde Şenbaş ve ark. (Şenbaş Akyazi ve ark., 2020), HeLa hücrelerinde, nükleer por kompleksi bileşenlerinden olan ve influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkilendirdikleri NUP214 proteinini kodlayan geni özgün siRNA'lar ile *knockdown* edilen hücrelerde virüs replikasyonunun baskılandığını ve bu proteinin influenza virüsü replikasyonu için önemli bir hücresel faktör olduğunu göstermişlerdir. Bu tez çalışması kapsamında da MTCH2 proteinin

influenza A virüsleri ile ilişkisini saptamak ve işlevi hakkında ipuçları elde etmek amacıyla RNAi tekniğinden yararlanıldı. HeLa hücreleri *MTCH2* geni için tasarlanmış siRNA'lar ile transfekte edildi ve ilk aşamada *MTCH2* transkript düzeyi belirlendi. MTCH2-siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, transfeksiyondan 60 saat sonra transkript düzeyinin ortalama %95 oranında düştüğü ortaya kondu (Şekil 32). *Knockdown* hücreler insan (A/WSN) ve kuş tipi influenza A (DkPen) virüsleri ile enfekte edildi ve enfeksiyonun erken aşamasında (8.saat) hücrelerde sentez edilen viral RNA (mRNA, mRNA+cRNA, vRNA) miktarları gerçek zamanlı-PZR ile belirlendi (Şekil 33). Elde edilen bulgular, kontrol siRNA ile karşılaştırıldığında MTCH2-siRNA ile *knockdown* edilen hücrelerde her iki virüs tipinde de viral RNA'ların önemli ölçüde artış gösterdiğini, bununla birlikte kuş tipi A/DkPen virüslerinde viral RNA düzeyindeki artış oranının A/WSN tipi virüse göre çok daha yüksek değerlerde olduğunu ortaya koydu. Bu veriler MTCH2 proteinin influenza A virüsü replikasyonu üzerinde negatif bir etki gösterdiğini ve bu etkinin virüs tipine göre farklı düzeylerde olduğunu gösterdi. İnfluenza A virüsleri insan dışında diğer birçok memeli türünde ve özellikle kuş türünde enfeksiyonlara neden olmaktadır (Cauldwell ve ark., 2014). Bununla birlikte, bu virüslerin konak türleri arasında geçişleri çeşitli hücresel faktörler ve virüsün kendi protein yapıları nedeniyle kolay olmamaktadır (Ran ve ark., 2013; Lipatov ve ark., 2004). Dolaysıyla bu protein faktörler virüs patogenezini de büyük ölçüde etkilemektedir. Konak spesifikliği ve patogenezde belirleyen viral faktörlerin başında virüsün HA yüzey antijen proteini ve viral RNA polimeraz enzimi alt üniteleri gelmektedir (Nayak ve ark., 2009). Daha önce yapılan çalışmalar, viral RNA polimerazın konak seçimi ve patogenezde önemli olduğunu göstermiştir. Örneğin polimeraz enziminin PB2 alt ünitesinde 627.pozisyonda yer alan amino asidin değişmesinin konak spesifikliğini etkilediği hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir (Kirui ve ark., 2014; Shinya ve ark., 2004). PB2 proteininin bu pozisyonunda lizin amino asidinin yer alması, virüsün fareler için patojenik olmasına neden olurken, glutamik asit olması non-patojenik olmasına neden olmaktadır (Zhu ve ark., 2010). PB2 proteininde 627.pozisyonunda lizin bulunması influenza virüsünün memelilerde sadece alt solunum yolları değil aynı zamanda üst solunum yollarında da etkin replikasyonuna olanak vermektedir. Bunlara ek olarak başta interferonlar ile ilişkili proteinler olmak üzere birçok

hücresel protein faktör virüs replikasyonu üzerinde virüs tipine de bağlı olarak farklı düzeylerde etkiler göstermektedir (Graef ve ark., 2010). Bu çalışmanın konusu olan MTCH2 proteini interferonlar ile ilişkili bir protein olmamakla birlikte, iki farklı virüs tipinin replikasyonu üzerinde farklı düzeylerde etki göstermesi beklenen bir durumdur. Kuş tipi İnfluenza A/DkPen virüsleri insan hücrelerinde daha zor replike olan virüslerdir (Beare ve Webster, 1991). Bu durum çok sayıda hücresel ve viral faktöre bağlı olmakla birlikte, bu faktörlerden birinin de MTCH2 proteini olduğu düşünülebilir.

Ökaryotik hücrelerde, esansiyel olmayan genlerin *knockout* edilmesi, bu gen tarafından kodlanan proteinin işlevi hakkında önemli veriler sunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* gibi basit ökaryotik mayalarda homolog rekombinasyon tekniği ile spesifik genleri inaktive etmek oldukça kolaydır (Stuckey ve Storici, 2013). Bu nedenle, 1996 yılında tüm genom dizisi belirlenen *S. cerevisiae*'nin tüm genleri için *knockout* bir maya koleksiyonu elde etme projesi hayata geçirilmiş ve ortalama 6000 gen için delesyonlu klon elde edilmiştir. Proje çalışmaları 1998'de başlamış ve 2002'de tamamlanmıştır (Giaever ve Nislow, 2014). Bu delesyonlu maya koleksiyonu influenza A virüs replikasyonu için önemli olabilecek konak hücre proteinlerinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Naito ve ark., 2007). Mayaların aksine memeli hücrelerinde istenilen genlerin özgün olarak *knockout* edilmesi oldukça zordur. Bu nedenle memeli hücrelerinde gen inaktivasyonu için farklı stratejiler üzerinde durulmuştur. Bunların başında genetik olarak modifiye edilmiş nükleaz enzimleri ile hedef dizileri kesmek ve bu bölgelerin bozulmasını sağlama stratejisi gelmektedir. Bunun için Çinko-parmak Nükleazları (İng. zinc-finger nucleases) (Santiago ve ark., 2008; Malphettes ve ark., 2010; Hauschild-Quintern ve ark., 2013) ve Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Efektör Nüklezlar (*İng. Transcription activator-like effector nucleases / TALENs*) (Stroud ve ark., 2013) ile çalışmalar yapılmıştır. Bu alanda son yılların en önemli keşiflerinden olan "Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar" (*İng. Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats /CRISPRs*) ile ilişkili (*İng. CRISPR-associated/Cas*) nükleaz enzimleri memeli hücrelerinde belirli genlerin *knockout* edilmesini oldukça kolaylaştırmıştır. Kısaca CRISPR/Cas teknolojisi olarak bilinen bu teknik hem hedef genlerin inaktif edilmesine hem de istenilen dizilerin

yeniden düzenlenmesine olanak sunmaktadır. İlk kez prokaryotlarda keşfedilen bu sistem, Cas nükleazları rehber RNA'lar aracılığıyla istilacı genetik materyale (plazmit ya da bakteri virüsleri) yönlendiren bir sistemdir. Bu sistem bakteri ve arkelerde adaptif bağışıklık sistemlerinin temelini oluşturur (Wiedenheft ve ark., 2012). CRISPR yapılar ilk kez 1987 yılında Yoshizumi Ishino (Ishino ve ark., 1987) tarafından *Escherichia coli*'de fosfat metabolizmasında rol oynayan genler analizi sırasında tespit edildi. Fakat bu dizlerin işlevi uzun bir süre gizemini korudu. Daha sonra yapılan çalışmalarda CRISPR dizlerinin prokaryotlarda bakteriyofajlara dirençle ilgili olduğu belirlendi (Barrangou ve ark., 2007). Feng Zhang'ın liderliğinde yürütülen çalışmalarda, CRISPR/Cas sisteminin memeli hücrelerinde de çalıştığı gösterildi ve bu teknolojinin kompleks yapıda ökaryotik organizma genlerin inaktivasyonu veya düzenlenmesi çalışmalarında kullanılmasının yolu açıldı (Cong ve ark., 2013). CRISPR/Cas teknolojisi günümüzde yaygın olarak kullanılan çok önemli bir teknoloji haline geldi.

Günümüzde, memeli hücrelerine de uygulanabilmesi nedeni ile CRISPR/Cas tekniği ile genlerin *knockout* edilmesi çalışmaları, RNAi tekniği ile genlerin *knockdown* edilmesi kadar yaygın hale geldi. Bu çalışmada da siRNA transfeksiyonu ile *MTCH2* geni transkript düzeyini düşürme çalışmalarına ek olarak, CRISPR/Cas tekniği uygulanarak *MTCH2* genini *knockout* etme çalışmaları gerçekleştirildi. Bunun için Ran ve ark. (Ran ve ark., 2013) tarafından geliştirilen pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2 plazmit vektöründen yararlanıldı. Bu plazmit vektörüne *MTCH2* genini hedef alacak rehber RNA kodlayan DNA dizileri klonlandı (Şekil 17 ve 18). Elde edilen CRISPR/Cas9 plazmit DNA'ları HEK293 hücrelerine transfekte edildi ve tek bir hücreden türetilen klonlar elde edildi. *MTCH2* geni için *knockout* olduğu düşünülen aday klonlardan hazırlanan cDNA'lar DNA dizi analizleri ile analiz edildi. Detaylı olarak değerlendirilen klonlardan ikisinde (Klon 14 ve Klon 20), *MTCH2* genlerinde delesyon belirlendi (Şekil 29 ve 30). Klon 14'ten elde edilen cDNA'lar içerisinde iki farklı tipte delesyon saptandı. Her iki delesyonun da genin kodon çerçevesinde kaymaya neden olacak tarzda olduğu belirlendi. Bununla birlikte BLAST analizleri, Klon 14'ten elde edilen bazı cDNA'ların pseudo *MTCH2* genine ait olduğunu oraya koydu. Klon 14 hücrelerine ait sınırlı sayıda analiz edilen cDNA'lar arasında doğal *MTCH2* cDNA'sına rastlanmadı. Dolayısıyla Klon 14'ün

büyük olasılıkla her iki gen alleli için, farklı şekillerde de olsa mutasyonlu olduğu sonucuna varıldı. Buna karşın Klon 20'ye ait analiz edilen cDNA'lar arasında üç ayrı örnekte kodon çerçevesinde kayma ile sonuçlanan aynı tip delesyon belirlendi. Bu klonda da incelenen cDNA'lar arasında doğal *MTCH2* cDNA'sına rastlanmazken, pseudo *MTCH2* gen dizilerine rastlandı. Diploit bir hücrede iki farklı allelde enzimatik kesim sonrası aynı şekilde onarılma olasılığının düşük olacağı değerlendirildiğinde, Klon 20 hücrelerinin heterozigot halde doğal ve delesyonlu *MTCH2* genleri taşıdığı düşünülmektedir.

CRISPR/Cas tekniği ile *knockout* edilen ve DNA dizi analizleri ile *knockout* oldukları doğrulanan Klon 14 ve Klon 20 hücreleri İnfluenza A/WSN ve A/DkPen tipi virüsler ile enfekte edildi. Kontrol olarak normal HEK293 hücrelerinin kullanıldığı deneylerde, enfeksiyondan 10 saat sonra hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve viral M1 protein düzeyleri Western melezleme tekniği ile karşılaştırıldı. Standart olarak endojen ACTB proteininden yararlanıldı. *MTCH2* siRNA'lar ile *knockdown* edilen hücrelerde viral RNA ve protein düzeyleri beklendiği gibi önemli düzeyde artış gösterirken, bu gen bakımından *knockout* olduğu saptanan Klon 14 ve Klon 20 hücrelerinde beklenin aksine viral protein düzeyinde bir azalma görüldü (Şekil 36). Laboratuvarımızda doğal MTCH2 proteinine karşı antikor bulunmadığından dolayı, Western melezleme ile *knockout* hücreleri bu protein için kontrol etme olanağımız olmadı. Klon 20'nin *MTCH2* geni için heterozigot olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla Klon 20'de tek allel üzerinden eksprese olan *MTCH2* proteini, viral replikasyon üzerinde belirgin bir farklılığın ortaya çıkmasına engel oluşturabilir. Buna karşın Klon 14'ten elde edilen cDNA'lar arasında *MTCH2* geninde, kodon çerçevesinde kaymaya neden olan iki farklı delesyonun saptanması, analiz edilen 6 örnek arasında doğal *MTCH2* cDNA'sına rastlanmaması, bu klonun MTCH2 proteini üretmeme olasılığını güçlendirmektedir. Bu bağlamda ele alındığında MTCH2 proteinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi PA alt ünitesi ile etkileşim dışında örneğin apoptoz gibi farklı mekanizmalar ile de viral replikasyon üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan birçok çalışmada hücrelerde mitokondri dış membranında lokalize olan MTCH2 proteini programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz ile ilişkilendirilmektedir (Zaltsman ve ark., 2010; Schwartz ve ark., 2007).

Mitokondrilerde BID için reseptör görevi gördüğü düşünülen MTCH2'nin Fas-aracılı karaciğer apoptozunda kritik bir rol oynadığı ifade edilmektedir (Maryanovich ve ark., 2015). Diğer taraftan mitokondri metabolizmasına olan etkilerine bağlı olarak Alzheimer, obesite ve diabet ile de ilişkilendirilmektedir. (Rottiers ve ark., 2017; Ruggiero ve ark., 2017). Bu olaylar arasında apoptoz mekanizmaları virüslerin replikasyonu açısında büyük önem taşımaktadır. İnfluenza A virüsleri, kodladığı çeşitli proteinler aracılığıyla konak hücre proliferasyonu, protein sentezi, otofaji ve apoptoz gibi hücresel süreçleri etkilerler (Ampomah ve Lim, 2020; Çağlayan ve Turan, 2021). Apoptoz, çeşitli patojenlere karşı doğuştan gelen bir hücresel yanıt olarak kabul edilse de influenza A virüsleri, etkin viral replikasyon ve yayılma için konak hücre apoptozunu modüle ederler. Bununla birlikte apoptozun viral replikasyonun düzenlenmesindeki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Örneğin, influenza A virüsleri replikasyonu desteklemek için enfeksiyonun erken aşamalarında apoptozu inhibe ederken, daha sonraki aşamalarda, enfekte olmuş hücrelerin ölümünü hızlandırmak için apoptozu aktive eder (Chen ve ark., 2001; Zhirnov ve ark., 2002). Önce hücreleri apoptozdan korumak için anti-apoptotik PI3k-Akt sinyalini başlatır (Ehrhardt ve ark., 2007). Bu ilk antiapoptotik yanıtı, enfeksiyonun sonraki aşamalarında apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölüm yollarının desteklenmesi izler. Bu tez kapsamında *MTCH2* geni *knockout* edilmiş hücrelerde apoptoz ile ilgili bir çalışma yapılmamıştır. Spekülatif bir yaklaşım olmakla birlikte, bu hücrelerdeki apoptoz mekanizmaların *MTCH2* geninin işlevsizleştirilmesinden dolayı influenza A virüslerinin replikasyonu beklenenin aksine negatif yönde etkilenmiş olabilir. Dolayısıyla *knockout* hücrelerde influenza A virüsü replikasyonu siRNA'lar ile *knockdown* edilen hücrelerden farklı bir seyir izleyebilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında insan hücrelerinde mitokondri dış membranında lokalize olan ve mitokondri metabolizması ile yakından ilişkili MTCH2 proteininin İnfluenza A virüsü RNA polimeraz alt ünitelerinden PA proteini ile ilişkisi ve bu ilişkinin virüs replikasyonu açısında önemi farklı teknikler kullanılarak değerlendirildi. Daha önce maya hücrelerinde PA proteinin ile etkileşimi saptanan insan MTCH2 proteinin, virüs için doğal konak olan insan orijinli HeLa ve HEK293 hücrelerinde de viral replikasyon açısından önemli fonksiyonlar üstlendiği ortaya kondu. HeLa hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden aynı anda sentez edilen

PA ve MTCH2 proteinlerinin benzer lokalizasyon profilleri göstermesi bu iki proteinin fiziksel etkileşimini destekler nitelikte bulundu (Şekil 38). Hücrelerde geçici plazmit transfeksiyonu ile MTCH2 proteini miktarının arttırılmasının İnfluenza A virüsü replikasyonu üzerinde negatif etki oluşturdu. Yapay minireplikon modellerinde MTCH2 proteinin artan konsantrasyonlarda viral RdRp enzimini inhibe ettiği belirlendi. Bununla birlikte RNAi teknolojisi ile hücrelerde *MTCH2* geninin *knockdown* edilmesi viral replikasyon üzerinde stimüle edici bir etki gösterdi. Elde edilen bu sonuçlar insan MTCH2 proteinin İnfluenza A virüsleri için negatif etkili bir hücresel faktör olduğunu düşündürdü. Buna karşın, CRISPR/Cas9 mekanizmaları ile *knockout* edilen HEK293 hücrelerinde beklenenin aksine İnflueza A virüsü replikasyonun negatif yönde etkilendiği saptandı. MTCH2 proteinin hücrelerde appoptoz mekanizması ile ilişkili olması ve İnfuenza A virüslerinin viral replikasyonun erken evrelerinde apoptozu baskılayıcı etki yaparken ilerleyen evrelerde apoptozu indükleyici etkiler ortaya koyması, MTCH2'nin virüs replikasyonu ile ilişkisinin oldukça karmaşık olduğu sonucunu doğurdu. Dolayısıyla bu çalışmada elde edilen veriler, İnfluenza A virüsü tarafından konak hücre apoptoz mekanizmasının modülasyonunda MTCH2 proteinin önemini ve işleyiş mekanizmalarının ortaya konmaya yönelik çalışmalar için temel oluşturacak nitelikte verilerdir.

8. KAYNAKLAR

Adrain, C.; Murphy, B.M.; Martin, S.J. Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. The Journal of biological chemistry. 2005 Feb 11;280(6):4663-4673.

Ahlquist, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. Science. 2002 May 17;296(5571):1270-1273.

Amorim, M.J.; Digard, P. Influenza A virus and the cell nucleus. Vaccine. 2006 Nov 10;24(44-46):6651-6655.

Ampomah, P.B.; Lim, L.H.K. Influenza A virus-induced apoptosis and virus propagation. Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2020 Feb;25(1-2):1-11.

Andrade, F.; Bull, H.G.; Thornberry, N.A.; Ketner, G.W.; Casciola-Rosen, L.A.; Rosen, A. Adenovirus L4-100K Assembly Protein Is a Granzyme B Substrate that Potently Inhibits Granzyme B-Mediated Cell Death. Immunity. 2001 2001/06/01/;14(6):751-761.

Arakaki, R.; Yamada, A.; Kudo, Y.; Hayashi, Y.; Ishimaru, N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. Critical reviews in immunology. 2014;34(4):301-314.

Aranda, P.S.; LaJoie, D.M.; Jorcyk, C.L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis. 2012 Jan;33(2):366-369.

Asha, K.; Kumar, B. Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! Journal of clinical medicine. 2019 Feb 5;8(2).

Ashkenazi, A.; Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. Current Opinion in Cell Biology. 1999 1999/04/01/;11(2):255-260.

Azzeh, M.; Flick, R.; Hobom, G. Functional analysis of the influenza A virus cRNA promoter and construction of an ambisense transcription system. Virology. 2001 Oct 25;289(2):400-410.

Bahat, A.; Goldman, A.; Zaltsman, Y.; Khan, D.H.; Halperin, C.; Amzallag, E.; Krupalnik, V.; Mullokandov, M.; Silberman, A.; Erez, A.; Schimmer, A.D.; Hanna, J.H.; Gross, A. MTCH2-mediated mitochondrial fusion drives exit from naïve pluripotency in embryonic stem cells. Nature communications. 2018 Dec 3;9(1):5132.

Bancroft, C.T.; Parslow, T.G. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. Journal of virology. 2002;76(14):7133-7139.

Barman, J.; Kumar, R.; Saha, G.; Tiwari, K.; Dubey, V.K. Apoptosis: Mediator Molecules, Interplay with Other Cell Death Processes and Therapeutic Potentials. Current pharmaceutical biotechnology. 2018;19(8):644-663.

Barrangou, R.; Fremaux, C.; Deveau, H.; Richards, M.; Boyaval, P.; Moineau, S.; Romero, D.A.; Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science. 2007 2007/03//;315(5819):1709-1712.

Barrangou, R.; Marraffini, L.A. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. Molecular cell. 2014 Apr 24;54(2):234-244.

Bayliss, R.; Littlewood, T.; Stewart, M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. Cell. 2000 Jul 7;102(1):99-108.

Beare, A.S.; Webster, R.G. Replication of avian influenza viruses in humans. Archives of virology. 1991;119(1-2):37-42.

Ben Safta, T.; Ziani, L.; Favre, L.; Lamendour, L.; Gros, G.; Mami-Chouaib, F.; Martinvalet, D.; Chouaib, S.; Thiery, J. Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2015 Jan 1;194(1):418-428.

Benedict, C.A.; Norris, P.S.; Prigozy, T.I.; Bodmer, J.L.; Mahr, J.A.; Garnett, C.T.; Martinon, F.; Tschopp, J.; Gooding, L.R.; Ware, C.F. Three adenovirus E3 proteins cooperate to evade apoptosis by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1 and -2. The Journal of biological chemistry. 2001 Feb 2;276(5):3270-3278.

Benedict, C.A.; Norris, P.S.; Ware, C.F. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. Nature immunology. 2002 Nov;3(11):1013-1018.

Borner, C.; Andrews, D.W. The apoptotic pore on mitochondria: are we breaking through or still stuck? Cell Death & Differentiation. 2014 2014/02/01;21(2):187-191.

Bortesi, L.; Fischer, R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnology advances. 2015 Jan-Feb;33(1):41-52.

Bouloy, M.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J.; Krug, R.M. Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. Journal of virology. 1979 Dec;32(3):895-904.

Bourmakina, S.V.; García-Sastre, A. Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. Journal of General Virology. 2003;84(3):517-527.

Brojatsch, J.; Naughton, J.; Rolls, M.M.; Zingler, K.; Young, J.A.T. CAR1, a TNFR–Related Protein, Is a Cellular Receptor for Cytopathic Avian Leukosis–Sarcoma Viruses and Mediates Apoptosis. Cell. 1996 1996/11/29/;87(5):845-855.

Burleigh, L.M.; Calder, L.J.; Skehel, J.J.; Steinhauer, D.A. Influenza a viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. Journal of virology. 2005 Jan;79(2):1262-1270.

Calder Lesley, J.; Wasilewski, S.; Berriman John, A.; Rosenthal Peter, B. Structural organization of a filamentous influenza A virus. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010 2010/06/08;107(23):10685-10690.

Cann, A.J. Chapter 3 - Genomes. In: Cann, A.J., editor, Principles of Molecular Virology (Sixth Edition). Boston: Academic Press; 2016b. p. 59-104.

Cann, A.J. Chapter 6 - Infection. In: Cann, A.J., editor, Principles of Molecular Virology (Sixth Edition). Boston: Academic Press; 2016a. p. 173-220.

Cauldwell, A.V.; Long, J.S.; Moncorgé, O.; Barclay, W.S. Viral determinants of influenza A virus host range. Journal of General Virology. 2014;95(6):1193-1210.

Celepli, S.; Bigat, İ.; Celepli, P.; Karagin, P.H. Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu. 2020.

Chakrabarti, A.K.; Pasricha, G. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. Virology. 2013 Jun 5;440(2):97-104.

Chanturiya, A.N.; Basañez, G.; Schubert, U.; Henklein, P.; Yewdell, J.W.; Zimmerberg, J. PB1-F2, an influenza A virus-encoded proapoptotic mitochondrial protein, creates variably sized pores in planar lipid membranes. J Virol. 2004 Jun;78(12):6304-6312.

Chávez-Galán, L.; Arenas-Del Angel, M.C.; Zenteno, E.; Chávez, R.; Lascurain, R. Cell Death Mechanisms Induced by Cytotoxic Lymphocytes. Cellular & Molecular Immunology. 2009 2009/02/01;6(1):15-25.

Chen, G.; Liu, C.H.; Zhou, L.; Krug, R.M. Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein. Cell host & microbe. 2014 Apr 9;15(4):484-493.

Chen, W.; Calvo, P.A.; Malide, D.; Gibbs, J.; Schubert, U.; Bacik, I.; Basta, S.; O'Neill, R.; Schickli, J.; Palese, P.; Henklein, P.; Bennink, J.R.; Yewdell, J.W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nature medicine. 2001 Dec;7(12):1306-1312.

Chen, Z.; Li, Y.; Krug, R.M. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. The EMBO journal. 1999 Apr 15;18(8):2273-2283.

Cheung, P.P.; Rogozin, I.B.; Choy, K.T.; Ng, H.Y.; Peiris, J.S.; Yen, H.L. Comparative mutational analyses of influenza A viruses. RNA (New York, NY). 2015 Jan;21(1):36-47.

Chipuk, J.E.; Moldoveanu, T.; Llambi, F.; Parsons, M.J.; Green, D.R. The BCL-2 Family Reunion. Molecular Cell. 2010 2010/02/12/;37(3):299-310.

Coloma, R.; Valpuesta, J.M.; Arranz, R.; Carrascosa, J.L.; Ortín, J.; Martín-Benito, J. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. PLoS pathogens. 2009 Jun;5(6):e1000491.

Cong, L.; Ran, F.A.; Cox, D.; Lin, S.; Barretto, R.; Habib, N.; Hsu, P.D.; Wu, X.; Jiang, W.; Marraffini, L.A.; Zhang, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013 Feb 15;339(6121):819-823.

Couch, R.B. Orthomyxoviruses. In: Baron, S., editor, Medical Microbiology. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston.; 1996.

Crow, M.; Deng, T.; Addley, M.; Brownlee, G.G. Mutational analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication. Journal of virology. 2004 Jun;78(12):6263-6270.

Cruz, C.D.; Palosaari, H.; Parisien, J.P.; Devaux, P.; Cattaneo, R.; Ouchi, T.; Horvath, C.M. Measles virus V protein inhibits p53 family member p73. 2006;80(11):5644-5650.

Czabotar, Peter E.; Westphal, D.; Dewson, G.; Ma, S.; Hockings, C.; Fairlie, W.D.; Lee, Erinna F.; Yao, S.; Robin, Adeline Y.; Smith, Brian J.; Huang, David C.S.; Kluck, Ruth M.; Adams, Jerry M.; Colman, Peter M. Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. Cell. 2013 2013/01/31/;152(3):519-531.

ÇaĞlayan, E.; Turan, K. Expression profiles of interferon-related genes in cells infected with influenza A viruses or transiently transfected with plasmids encoding viral RNA polymerase. Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi. 2021;45(1):88-103.

De Vlugt, C.; Sikora, D.; Pelchat, M. Insight into Influenza: A Virus Cap-Snatching. Viruses. 2018 Nov 16;10(11).

Deng, T.; Vreede, F.T.; Brownlee, G.G. Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. Journal of virology. 2006 Mar;80(5):2337-2348.

Deveraux, Q.L.; Reed, J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes & development. 1999 Feb 1;13(3):239-252.

Didonato, J.A.; Mercurio, F.; Karin, M. NF-κB and the link between inflammation and cancer. 2012;246(1):379-400.

Djajawi, T.M.; Liu, L.; Gong, J.N.; Huang, A.S.; Luo, M.J.; Xu, Z.; Okamoto, T.; Call, M.J.; Huang, D.C.S.; van Delft, M.F. MARCH5 requires MTCH2 to coordinate proteasomal turnover of the MCL1:NOXA complex. Cell death and differentiation. 2020 Aug;27(8):2484-2499.

Dou, D.; Revol, R.; Östbye, H.; Wang, H.; Daniels, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. Front Immunol. 2018;9:1581-1581.
Duwe, S. Influenza viruses – antiviral therapy and resistance. German Medical Science - Infectious Disease. 2017 04/25;5:1-10.

Edlich, F.; Banerjee, S.; Suzuki, M.; Cleland, Megan M.; Arnoult, D.; Wang, C.; Neutzner, A.; Tjandra, N.; Youle, Richard J. Bcl-xL Retrotranslocates Bax from the Mitochondria into the Cytosol. Cell. 2011 2011/04/01/;145(1):104-116.

Ehrhardt, C.; Wolff, T.; Pleschka, S.; Planz, O.; Beermann, W.; Bode, J.G.; Schmolke, M.; Ludwig, S. Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. Journal of virology. 2007 Apr;81(7):3058-3067.

Elbashir, S.M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature. 2001 May 24;411(6836):494-498.

Enami, M.; Sharma, G.; Benham, C.; Palese, P. An influenza virus containing nine different RNA segments. Virology. 1991 Nov;185(1):291-298.

Engelhardt, O.G.; Fodor, E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. Reviews in medical virology. 2006 Sep-Oct;16(5):329-345.

Engelhardt, O.G.; Smith, M.; Fodor, E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. Journal of virology. 2005 May;79(9):5812-5818.

Fields, B.N.K.D.M.H.P.M. Fields virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.K.; Kostas, S.A.; Driver, S.E.; Mello, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature. 1998 Feb 19;391(6669):806-811.

Flynn, O.; Gallagher, C.; Mooney, J.; Irvine, C.; Ducatez, M.; Hause, B.; McGrath, G.; Ryan, E. Influenza D Virus in Cattle, Ireland. Emerging infectious diseases. 2018 Feb;24(2):389-391.

Fortes, P.; Lamond, A.I.; Ortín, J. Influenza virus NS1 protein alters the subnuclear localization of cellular splicing components. The Journal of general virology. 1995 Apr;76 (Pt 4):1001-1007.

Francis, T., Jr. A NEW TYPE OF VIRUS FROM EPIDEMIC INFLUENZA. Science (New York, NY). 1940 Nov 1;92(2392):405-408.

Fujii, K.; Fujii, Y.; Noda, T.; Muramoto, Y.; Watanabe, T.; Takada, A.; Goto, H.; Horimoto, T.; Kawaoka, Y. Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. Journal of virology. 2005 Mar;79(6):3766-3774.

G.Veresov, V.; Davidovskii, A.I. Structural insights into proapoptotic signaling mediated by MTCH2, VDAC2, TOM40 and TOM22. Cellular Signalling. 2014 2014/02/01/;26(2):370-382.

Gamblin, S.J.; Skehel, J.J. Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins*. Journal of Biological Chemistry. 2010 2010/09/10/;285(37):28403-28409.

García, M.A.; Meurs, E.F.; Esteban, M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. Biochimie. 2007 2007/06/01/;89(6):799-811.

Gaush, C.R.; Hard, W.L.; Smith, T.F. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY). 1966 Jul;122(3):931-935.

Gelmez, N. İnsan Beta Aktin Proteini ile İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Araştırılması [İstanbul]: Marmara Üniversitesi; 2019.

Gerl, M.J.; Sampaio, J.L.; Urban, S.; Kalvodova, L.; Verbavatz, J.-M.; Binnington, B.; Lindemann, D.; Lingwood, C.A.; Shevchenko, A.; Schroeder, C.; Simons, K. Quantitative analysis of the lipidomes of the influenza virus envelope and MDCK cell apical membrane. Journal of Cell Biology. 2012;196(2):213-221.

Ghosh, A.P.; Klocke, B.J.; Ballestas, M.E.; Roth, K.A. CHOP Potentially Co-Operates with FOXO3a in Neuronal Cells to Regulate PUMA and BIM Expression in Response to ER Stress. PLOS ONE. 2012;7(6):e39586.

Giaever, G.; Nislow, C. The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. Genetics. 2014 Jun;197(2):451-465.

Gibbs James, S.; Malide, D.; Hornung, F.; Bennink Jack, R.; Yewdell Jonathan, W. The Influenza A Virus PB1-F2 Protein Targets the Inner Mitochondrial Membrane via a Predicted Basic Amphipathic Helix That Disrupts Mitochondrial Function. Journal of Virology. 2003 2003/07/01;77(13):7214-7224.

Gonzalvez, F.; Ashkenazi, A. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. Oncogene. 2010 2010/08/01;29(34):4752-4765.

Graef, K.M.; Vreede, F.T.; Lau, Y.F.; McCall, A.W.; Carr, S.M.; Subbarao, K.; Fodor, E. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence

by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. Journal of virology. 2010 Sep;84(17):8433-8445.

Graham, F.L.; van der Eb, A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 1973 Apr;52(2):456-467.

Grinberg, M.; Sarig, R.; Zaltsman, Y.; Frumkin, D.; Grammatikakis, N.; Reuveny, E.; Gross, A. tBID Homooligomerizes in the mitochondrial membrane to induce apoptosis. The Journal of biological chemistry. 2002 Apr 5;277(14):12237-12245.

Grinberg, M.; Schwarz, M.; Zaltsman, Y.; Eini, T.; Niv, H.; Pietrokovski, S.; Gross, A. Mitochondrial carrier homolog 2 is a target of tBID in cells signaled to die by tumor necrosis factor alpha. Molecular and cellular biology. 2005 Jun;25(11):4579-4590.

Gross, A. Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? Journal of bioenergetics and biomembranes. 2005 Jun;37(3):113-119.

Guicciardi, M.E.; Gores, G.J. Life and death by death receptors. The FASEB Journal. 2009;23(6):1625-1637.

Gün Gök, Z.; Cagdas Tunalı, B. Biology, Mechanism and Applications of CRISPR-Cas Immune System. Uluslararası Muhendislik Arastirma ve Gelistirme Dergisi. 2016 06/15;8:11-21.

Hagen, M.; Chung, T.D.; Butcher, J.A.; Krystal, M. Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. Journal of virology. 1994 Mar;68(3):1509-1515.

Han, H.; Cui, Z.Q.; Wang, W.; Zhang, Z.P.; Wei, H.P.; Zhou, Y.F.; Zhang, X.E. 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. The Journal of general virology. 2010 Dec;91(Pt 12):2907-2917.

Happo, L.; Strasser, A.; Cory, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. Journal of Cell Science. 2012;125(5):1081-1087.

Hauschild-Quintern, J.; Petersen, B.; Cost, G.J.; Niemann, H. Gene knockout and knockin by zinc-finger nucleases: current status and perspectives. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2013 Aug;70(16):2969-2983.

Hay, S.; Kannourakis, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. Journal of General Virology. 2002;83(7):1547-1564.

Holsinger, L.J.; Lamb, R.A. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. Virology. 1991 Jul;183(1):32-43.

Hotchkiss, R.S.; Strasser, A.; McDunn, J.E.; Swanson, P.E. Cell Death. New England Journal of Medicine. 2009;361(16):1570-1583.

Houser, K.; Subbarao, K. Influenza Vaccines: Challenges and Solutions. Cell Host & Microbe. 2015 2015/03/11/;17(3):295-300.

Hovanessian, A.G. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: The 2′–5′oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2007 2007/10/01/;18(5):351-361.

Hsu, P.D.; Lander, E.S.; Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell. 2014;157(6):1262-1278.

Huang, Q.; Sivaramakrishna, R.P.; Ludwig, K.; Korte, T.; Böttcher, C.; Herrmann, A. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a

fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. Biochimica et biophysica acta. 2003 Jul 11;1614(1):3-13.

Huang, S.S.H.; Banner, D.; Paquette, S.G.; Leon, A.J.; Kelvin, A.A.; Kelvin, D.J. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection. The Journal of general virology. 2014 Oct;95(Pt 10):2127-2139.

Hutchinson, E.C.; Charles, P.D.; Hester, S.S.; Thomas, B.; Trudgian, D.; Martínez-Alonso, M.; Fodor, E. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. Nature Communications. 2014 2014/09/16;5(1):4816.

Imamoto, N.; Tachibana, T.; Matsubae, M.; Yoneda, Y. A Karyophilic Protein Forms a Stable Complex with Cytoplasmic Components Prior to Nuclear Pore Binding *. Journal of Biological Chemistry. 1995;270(15):8559-8565.

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. Journal of bacteriology. 1987 Dec;169(12):5429-5433.

Ivanova, P.T.; Myers, D.S.; Milne, S.B.; McClaren, J.L.; Thomas, P.G.; Brown, H.A. Lipid Composition of the Viral Envelope of Three Strains of Influenza Virus—Not All Viruses Are Created Equal. ACS Infectious Diseases. 2015 2015/09/11;1(9):435-442.

Ivashkiv, L.B.; Donlin, L.T. Regulation of type I interferon responses. Nature Reviews Immunology. 2014 2014/01/01;14(1):36-49.

Jiang, F.; Doudna, J.A. The structural biology of CRISPR-Cas systems. Current opinion in structural biology. 2015 Feb;30:100-111.

Jinek, M.; Chylinski, K.; Fonfara, I.; Hauer, M.; Doudna, J.A.; Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science (New York, NY). 2012 Aug 17;337(6096):816-821.

Jlobodzinska, M. Reproduction of influenza C Taylor 1233, virus in various tissue systems. Arch Immun Ther Exp. 1972;20(4):497-505.

Jones, H.W., Jr.; McKusick, V.A.; Harper, P.S.; Wuu, K.D. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. Obstetrics and gynecology. 1971 Dec;38(6):945-949.

Juozapaitis, M.; Antoniukas, L. [Influenza virus]. Medicina (Kaunas, Lithuania). 2007;43(12):919-929.

Kaelin Jr, W.G. The emerging p53 gene family. 1999;91(7):594-598.

Kato, H.; Takeuchi, O.; Sato, S.; Yoneyama, M.; Yamamoto, M.; Matsui, K.; Uematsu, S.; Jung, A.; Kawai, T.; Ishii, K.J.; Yamaguchi, O.; Otsu, K.; Tsujimura, T.; Koh, C.-S.; Reis e Sousa, C.; Matsuura, Y.; Fujita, T.; Akira, S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature. 2006 2006/05/01;441(7089):101-105.

Katz, C.; Zaltsman-Amir, Y.; Mostizky, Y.; Kollet, N.; Gross, A.; Friedler, A. Molecular basis of the interaction between proapoptotic truncated BID (tBID) protein and mitochondrial carrier homologue 2 (MTCH2) protein: key players in mitochondrial death pathway. The Journal of biological chemistry. 2012 Apr 27;287(18):15016-15023.

Katz, G.; Benkarroum, Y.; Wei, H.; Rice, W.J.; Bucher, D.; Alimova, A.; Katz, A.; Klukowska, J.; Herman, G.T.; Gottlieb, P. Morphology of influenza B/Lee/40 determined by cryo-electron microscopy. PloS one. 2014;9(2):e88288.

Kawai, T.; Akira, S. Toll-like Receptor and RIG-1-like Receptor Signaling. Annals of the New York Academy of Sciences. 2008 2008/11/01;1143(1):1-20.

Kelly, T.J.; Smith, H.O. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae: II. Base sequence of the recognition site. Journal of Molecular Biology. 1970 1970/07/28/;51(2):393-409.

Kim-Campbell, N.; Gómez, H.; Baz1r, H.l. Cell Death Pathways. Critical Care Nephrology. 2019.

Kirui, J.; Bucci, M.D.; Poole, D.S.; Mehle, A. Conserved features of the PB2 627 domain impact influenza virus polymerase function and replication. Journal of virology. 2014;88(11):5977-5986.

Knapp, S.; Yee, L.J.; Frodsham, A.J.; Hennig, B.J.; Hellier, S.; Zhang, L.; Wright, M.; Chiaramonte, M.; Graves, M.; Thomas, H.C.; Hill, A.V.; Thursz, M.R. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. Genes and immunity. 2003 Sep;4(6):411-419.

Kochs, G.; García-Sastre, A.; Martínez-Sobrido, L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. Journal of virology. 2007 Jul;81(13):7011-7021.

Koçmar, T.; Çağlayan, E.; Rayaman, E.; Nagata, K.; Turan, K. Human sorting nexin 2 protein interacts with Influenza A virus PA protein and has a negative regulatory effect on the virus replication. Molecular biology reports. 2022 Jan;49(1):497-510.

Kodym, R.; Kodym, E.; Story, M.D. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase is activated by a specific RNA sequence motif. Biochemical and biophysical research communications. 2009 Oct 16;388(2):317-322.

Komiyama, T.; Quan, L.T.; Salvesen, G.S. Inhibition of Cysteine and Serine Proteinases by the Cowpox Virus Serpin CRMA. In: Suzuki, K.; Bond, J.S., editors, Intracellular Protein Catabolism. Boston, MA: Springer US; 1996. p. 173-176.

Krug, R.M.; Morgan, M.A.; Shatkin, A.J. Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. Journal of virology. 1976 Oct;20(1):45-53.

Lamb, R.; Krug, R. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. Fields Virology Volume 1. 2001 01/01;1.

Lazarovits, J.; Naim, H.Y.; Rodriguez, A.C.; Wang, R.H.; Fire, E.; Bird, C.; Henis, Y.I.; Roth, M.G. Endocytosis of chimeric influenza virus hemagglutinin proteins that lack a cytoplasmic recognition feature for coated pits. J Cell Biol. 1996;134(2):339-348.

Lei, Y.; Moore, C.B.; Liesman, R.M.; O'Connor, B.P.; Bergstralh, D.T.; Chen, Z.J.; Pickles, R.J.; Ting, J.P.Y. MAVS-mediated apoptosis and its inhibition by viral proteins. PLoS One. 2009;4(5):e5466-e5466.

Li, M.L.; Rao, P.; Krug, R.M. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. The EMBO journal. 2001 Apr 17;20(8):2078-2086.

Lipatov, A.S.; Govorkova, E.A.; Webby, R.J.; Ozaki, H.; Peiris, M.; Guan, Y.; Poon, L.; Webster, R.G. Influenza: emergence and control. Journal of virology. 2004 Sep;78(17):8951-8959.

Liu, B.; Meng, D.; Wei, T.; Zhang, S.; Hu, Y.; Wang, M. Apoptosis and Pro-inflammatory Cytokine Response of Mast Cells Induced by Influenza A Viruses. PLOS ONE. 2014;9(6):e100109.

Lu, M.; Lawrence David, A.; Marsters, S.; Acosta-Alvear, D.; Kimmig, P.; Mendez Aaron, S.; Paton Adrienne, W.; Paton James, C.; Walter, P.; Ashkenazi, A. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. Science. 2014 2014/07/04;345(6192):98-101.

Lu, Y.; Qian, X.Y.; Krug, R.M. The influenza virus NS1 protein: a novel inhibitor of pre-mRNA splicing. Genes & development. 1994 Aug 1;8(15):1817-1828.

Ma, W.; Kahn, R.E.; Richt, J.A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. Journal of molecular and genetic medicine : an international journal of biomedical research. 2008 Nov 27;3(1):158-166.

Malphettes, L.; Freyvert, Y.; Chang, J.; Liu, P.Q.; Chan, E.; Miller, J.C.; Zhou, Z.; Nguyen, T.; Tsai, C.; Snowden, A.W.; Collingwood, T.N.; Gregory, P.D.; Cost, G.J. Highly efficient deletion of FUT8 in CHO cell lines using zinc-finger nucleases yields cells that produce completely nonfucosylated antibodies. Biotechnology and bioengineering. 2010 Aug 1;106(5):774-783.

Maruyama, J.; Nao, N.; Miyamoto, H.; Maeda, K.; Ogawa, H.; Yoshida, R.; Igarashi, M.; Takada, A. Characterization of the glycoproteins of bat-derived influenza viruses. Virology. 2016 2016/01/15/;488:43-50.

Maryanovich, M.; Zaltsman, Y.; Ruggiero, A.; Goldman, A.; Shachnai, L.; Zaidman, S.L.; Porat, Z.; Golan, K.; Lapidot, T.; Gross, A. An MTCH2 pathway repressing mitochondria metabolism regulates haematopoietic stem cell fate. Nature communications. 2015 Jul 29;6:7901.

Masurel, N.; Marine, W.M. Recycling of Asian and Hong Kong influenza A virus hemagglutinins in man. American journal of epidemiology. 1973 Jan;97(1):44-49.

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. The Journal of infectious diseases. 2006 May 1;193(9):1229-1235.

Meylan, E.; Curran, J.; Hofmann, K.; Moradpour, D.; Binder, M.; Bartenschlager, R.; Tschopp, J. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. Nature. 2005 2005/10/01;437(7062):1167-1172.

Min, J.Y.; Li, S.; Sen, G.C.; Krug, R.M. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. Virology. 2007 Jun 20;363(1):236-243.

Minn, A.J.; Vélez, P.; Schendel, S.L.; Liang, H.; Muchmore, S.W.; Fesik, S.W.; Fill, M.; Thompson, C.B. Bcl-xL forms an ion channel in synthetic lipid membranes. Nature. 1997 1997/01/01;385(6614):353-357.

Monné, M.; Palmieri, F. Antiporters of the mitochondrial carrier family. Current topics in membranes. 2014;73:289-320.

Morens, D.M.; Taubenberger, J.K.; Fauci, A.S. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. New England Journal of Medicine. 2009;361(3):225-229.

Morens, D.M.; Taubenberger, J.K.; Folkers, G.K.; Fauci, A.S. Pandemic influenza's 500th anniversary. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2010 Dec 15;51(12):1442-1444.

Munger, J.; Roizman, B. The Us3 protein kinase of herpes simplex virus 1 mediates the posttranslational modification of BAD and prevents BAD-induced programmed cell death in the absence of other viral proteins. 2001;98(18):10410-10415.

Murti, K.G.; Webster, R.G.; Jones, I.M. Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. Virology. 1988 Jun;164(2):562-566.

Nagata, K.; Kato, K.; Takizawa, N. [Nuclear functions in virus replication]. Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme. 2006 Nov;51(14 Suppl):2274-2286.

Naito, T.; Kiyasu, Y.; Sugiyama, K.; Kimura, A.; Nakano, R.; Matsukage, A.; Nagata, K. An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2007 2007/11/13;104(46):18235-18240.

Nakajima, K. [Influenza virus genome structure and encoded proteins]. Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine. 1997 Oct;55(10):2542-2546.

Nayak, D.P.; Balogun, R.A.; Yamada, H.; Zhou, Z.H.; Barman, S. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus research. 2009 Aug;143(2):147-161.

Nayak, D.P.; Hui, E.K.; Barman, S. Assembly and budding of influenza virus. Virus research. 2004 Dec;106(2):147-165.

Nemeroff, M.E.; Barabino, S.M.; Li, Y.; Keller, W.; Krug, R.M. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. Molecular cell. 1998 Jun;1(7):991-1000.

Neumann, S.; El Maadidi, S.; Faletti, L.; Haun, F.; Labib, S.; Schejtman, A.; Maurer, U.; Borner, C. How do viruses control mitochondria-mediated apoptosis? Virus research. 2015 Nov 2;209:45-55.

Nie, Z.; Phenix, B.N.; Lum, J.J.; Alam, A.; Lynch, D.H.; Beckett, B.; Krammer, P.H.; Sekaly, R.P.; Badley, A.D. HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. Cell Death & Differentiation. 2002 2002/11/01;9(11):1172-1184.

Nishimasu, H.; Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Konermann, S.; Shehata, S.I.; Dohmae, N.; Ishitani, R.; Zhang, F.; Nureki, O. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell. 2014 Feb 27;156(5):935-949.

Noda, T. [Orthomyxoviruses]. Uirusu. 2012;62(2):219-228.

Noda, T.; Sagara, H.; Yen, A.; Takada, A.; Kida, H.; Cheng, R.H.; Kawaoka, Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. Nature. 2006 Jan 26;439(7075):490-492.

Nomura-Takigawa, Y.; Nagano-Fujii, M.; Deng, L.; Kitazawa, S.; Ishido, S.; Sada, K.; Hotta, H. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. The Journal of general virology. 2006 Jul;87(Pt 7):1935-1945.

Ohta, A.; Nishiyama, Y. Mitochondria and viruses. Mitochondrion. 2011 Jan;11(1):1-12.

Palese, P.; Tobita, K.; Ueda, M.; Compans, R.W. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology. 1974 Oct;61(2):397-410.

Palmieri, F. Diseases caused by defects of mitochondrial carriers: a review. Biochimica et biophysica acta. 2008 Jul-Aug;1777(7-8):564-578.

Palmieri, F. Mitochondrial Metabolite Carrier Protein Family. In: Lennarz, W.J.; Lane, M.D., editors, Encyclopedia of Biological Chemistry (Second Edition). Waltham: Academic Press; 2013. p. 149-158.

Pennisi, E. The CRISPR craze. Science (New York, NY). 2013 Aug 23;341(6148):833-836.

Pflug, A.; Gaudon, S.; Resa-Infante, P.; Lethier, M.; Reich, S.; Schulze, W.M.; Cusack, S. Capped RNA primer binding to influenza polymerase and implications

for the mechanism of cap-binding inhibitors. Nucleic acids research. 2018 Jan 25;46(2):956-971.

Pham, P.T.V.; Turan, K.; Nagata, K.; Kawaguchi, A. Biochemical characterization of avian influenza viral polymerase containing PA or PB2 subunit from human influenza A virus. Microbes and infection. 2018 Jun-Jul;20(6):353-359.

Pichlmair, A.; Reis e Sousa, C. Innate Recognition of Viruses. Immunity. 2007 2007/09/21/;27(3):370-383.

Pinto, L.H.; Holsinger, L.J.; Lamb, R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell. 1992 May 1;69(3):517-528.

Pinto, L.H.; Lamb, R.A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. The Journal of biological chemistry. 2006 Apr 7;281(14):8997-9000.

Pirinçal, A.; Turan, K. Human DDX56 protein interacts with influenza A virus NS1 protein and stimulates the virus replication. Genetics and molecular biology. 2021;44(1):e20200158.

Pleschka, S.; Ludwig, S.; Planz, O.; Wolff, T. Signaling Pathways Induced by Influenza Viruses. RNA Viruses: WORLD SCIENTIFIC; 2009. p. 109-129.

Plotch, S.J.; Bouloy, M.; Krug, R.M. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979 Apr;76(4):1618-1622.

Plotch, S.J.; Tomasz, J.; Krug, R.M. Absence of detectable capping and methylating enzymes in influenza virions. Journal of virology. 1978 Oct;28(1):75-83.

Poon, L.L.; Fodor, E.; Brownlee, G.G. Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. Journal of virology. 2000 Jan;74(1):418-427.

Postigo, A.; Eitz Ferrer, P. Viral inhibitors reveal overlapping themes in regulation of cell death and innate immunity. Microbes and Infection. 2009 2009/11/01/;11(13):1071-1078.

Prikhod'ko, E.A.; Prikhod'ko, G.G.; Siegel, R.M.; Thompson, P.; Major, M.E.; Cohen, J.I. The NS3 protein of hepatitis C virus induces caspase-8-mediated apoptosis independent of its protease or helicase activities. Virology. 2004 2004/11/10/;329(1):53-67.

Ran, F.A.; Hsu, P.D.; Wright, J.; Agarwala, V.; Scott, D.A.; Zhang, F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature protocols. 2013 Nov;8(11):2281-2308.

Rath, D.; Amlinger, L.; Rath, A.; Lundgren, M. The CRISPR-Cas immune system: biology, mechanisms and applications. Biochimie. 2015 Oct;117:119-128.

Roberts, A.; Kretzschmar, E.; Perkins, A.S.; Forman, J.; Price, R.; Buonocore, L.; Kawaoka, Y.; Rose, J.K. Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. Journal of virology. 1998 Jun;72(6):4704-4711.

Robertson, J.S.; Schubert, M.; Lazzarini, R.A. Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. Journal of virology. 1981 Apr;38(1):157-163.

Rosário-Ferreira, N.; Preto, A.J.; Melo, R.; Moreira, I.S.; Brito, R.M.M. The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection. International Journal of Molecular Sciences. 2020;21(4):1511.

Rota, P.A.; Wallis, T.R.; Harmon, M.W.; Rota, J.S.; Kendal, A.P.; Nerome, K. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. Virology. 1990 1990/03/01/;175(1):59-68.

Rottiers, V.; Francisco, A.; Platov, M.; Zaltsman, Y.; Ruggiero, A.; Lee, S.S.; Gross, A.; Libert, S. MTCH2 is a conserved regulator of lipid homeostasis. Obesity (Silver Spring, Md). 2017 Mar;25(3):616-625.

Ruggiero, A.; Aloni, E.; Korkotian, E.; Zaltsman, Y.; Oni-Biton, E.; Kuperman, Y.; Tsoory, M.; Shachnai, L.; Levin-Zaidman, S.; Brenner, O.; Segal, M.; Gross, A. Loss of forebrain MTCH2 decreases mitochondria motility and calcium handling and impairs hippocampal-dependent cognitive functions. Scientific reports. 2017 Mar 9;7:44401.

Samji, T. Influenza A: understanding the viral life cycle. Yale J Biol Med. 2009;82(4):153-159.

Santiago, Y.; Chan, E.; Liu, P.Q.; Orlando, S.; Zhang, L.; Urnov, F.D.; Holmes, M.C.; Guschin, D.; Waite, A.; Miller, J.C.; Rebar, E.J.; Gregory, P.D.; Klug, A.; Collingwood, T.N. Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Apr 15;105(15):5809-5814.

Sapranauskas, R.; Gasiunas, G.; Fremaux, C.; Barrangou, R.; Horvath, P.; Siksnys, V. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli. Nucleic acids research. 2011 Nov;39(21):9275-9282.

Satterly, N.; Tsai, P.L.; van Deursen, J.; Nussenzveig, D.R.; Wang, Y.; Faria, P.A.; Levay, A.; Levy, D.E.; Fontoura, B.M. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007 Feb 6;104(6):1853-1858.

Savić, N.; Schwank, G. Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine. 2016 Feb;168:15-21.

Schaecher, S.R.; Touchette, E.; Schriewer, J.; Buller, R.M.; Pekosz, A. Severe acute respiratory syndrome coronavirus gene 7 products contribute to virus-induced apoptosis. J Virol. 2007 Oct;81(20):11054-11068.

Scheiffele, P.; Rietveld, A.; Wilk, T.; Simons, K. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. The Journal of biological chemistry. 1999 Jan 22;274(4):2038-2044.

Schroeder, C.; Heider, H.; Möncke-Buchner, E.; Lin, T.I. The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. European biophysics journal : EBJ. 2005 Feb;34(1):52-66.

Schwarz, M.; Andrade-Navarro, M.A.; Gross, A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2007 May;12(5):869-876.

Shaw, M.L.; Stone, K.L.; Colangelo, C.M.; Gulcicek, E.E.; Palese, P. Cellular Proteins in Influenza Virus Particles. PLOS Pathogens. 2008;4(6):e1000085.

Shi, Y. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. Molecular Cell. 2002 2002/03/01/;9(3):459-470.

Shimizu, K.; Iguchi, A.; Gomyou, R.; Ono, Y. Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site. Virology. 1999 Feb 15;254(2):213-219.

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 Mar 15;320(2):258-266.

Shirayama, R.; Shoji, M.; Sriwilaijaroen, N.; Hiramatsu, H.; Suzuki, Y.; Kuzuhara, T. Inhibition of PA endonuclease activity of influenza virus RNA polymerase by Kampo medicines. Drug Discoveries & Therapeutics. 2016;10(2):109-113.

Shisler, J.; Yang, C.; Walter, B.; Ware, C.F.; Gooding, L.R. The adenovirus E3-10.4K/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis. Journal of Virology. 1997;71(11):8299-8306.

Skehel, J.J.; Wiley, D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. Annual review of biochemistry. 2000;69:531-569.

Smith, G.L.; Hay, A.J. Replication of the influenza virus genome. Virology. 1982 Apr 15;118(1):96-108.

Smith, W.; Andrewes, C.H.; Laidlaw, P.P. A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS. The Lancet. 1933 1933/07/08/;222(5732):66-68.

Stewart, A.R.; Tollefson, A.E.; Krajcsi, P.; Yei, S.P.; Wold, W.S. The adenovirus E3 10.4K and 14.5K proteins, which function to prevent cytolysis by tumor necrosis factor and to down-regulate the epidermal growth factor receptor, are localized in the plasma membrane. Journal of Virology. 1995;69(1):172-181.

Strack, P.R.; Frey, M.W.; Rizzo, C.J.; Cordova, B.; George, H.J.; Meade, R.; Ho, S.P.; Corman, J.; Tritch, R.; Korant, B.D. Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of bcl-2. 1996;93(18):9571-9576.

Stroud, D.A.; Formosa, L.E.; Wijeyeratne, X.W.; Nguyen, T.N.; Ryan, M.T. Gene knockout using transcription activator-like effector nucleases (TALENs) reveals that

human NDUFA9 protein is essential for stabilizing the junction between membrane and matrix arms of complex I. The Journal of biological chemistry. 2013 Jan 18;288(3):1685-1690.

Stuckey, S.; Storici, F. Gene knockouts, in vivo site-directed mutagenesis and other modifications using the delitto perfetto system in Saccharomyces cerevisiae. Methods in enzymology. 2013;533:103-131.

Sun, S.C.; Cesarman, E. NF-κB as a target for oncogenic viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2011;349:197-244.

Suzuki, M.; Youle, R.J.; Tjandra, N. Structure of Bax: Coregulation of Dimer Formation and Intracellular Localization. Cell. 2000 2000/11/10/;103(4):645-654.

Şenbaş Akyazi, B.; Pirinçal, A.; Kawaguchi, A.; Nagata, K.; Turan, K. Interaction of influenza A virus NS2/NEP protein with the amino-terminal part of Nup214. Turkish journal of biology = Turk biyoloji dergisi. 2020;44(2):82-92.

Takeuchi, O.; Akira, S. Innate immunity to virus infection. 2009;227(1):75-86.

Tan, S.-L.; Katze, M.G. The Emerging Role of the Interferon-Induced PKR Protein Kinase as an Apoptotic Effector: A New Face of Death? Journal of Interferon & Cytokine Research. 1999 1999/06/01;19(6):543-554.

Tan, Y.X.; Tan, T.H.; Lee, M.J.; Tham, P.Y.; Gunalan, V.; Druce, J.; Birch, C.; Catton, M.; Fu, N.Y.; Yu, V.C.; Tan, Y.J. Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein. J Virol. 2007b Jun;81(12):6346-6355.

Tan, Y.X.; Tan, T.H.P.; Lee, M.J.R.; Tham, P.Y.; Gunalan, V.; Druce, J.; Birch, C.; Catton, M.; Nai, Y.F.; Yu, V.C.; Tan, Y.J. Induction of apoptosis by the severe acute

respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein. 2007a;81(12):6346-6355.

Taubenberger, J.K.; Reid, A.H.; Krafft, A.E.; Bijwaard, K.E.; Fanning, T.G. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. Science (New York, NY). 1997 Mar 21;275(5307):1793-1796.

Tollefson, A.E.; Hermiston, T.W.; Lichtenstein, D.L.; Colle, C.F.; Tripp, R.A.; Dimitrov, T.; Toth, K.; Wells, C.E.; Doherty, P.C.; Wold, W.S.M. Forced degradation of Fas inhibits apoptosis in adenovirus-infected cells. Nature. 1998 1998/04/01;392(6677):726-730.

Tong, S.; Li, Y.; Rivailler, P.; Conrardy, C.; Castillo, D.A.A.; Chen, L.-M.; Recuenco, S.; Ellison, J.A.; Davis, C.T.; York, I.A.; Turmelle, A.S.; Moran, D.; Rogers, S.; Shi, M.; Tao, Y.; Weil, M.R.; Tang, K.; Rowe, L.A.; Sammons, S.; Xu, X.; Frace, M.; Lindblade, K.A.; Cox, N.J.; Anderson, L.J.; Rupprecht, C.E.; Donis, R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2012;109(11):4269-4274.

Tong, S.; Zhu, X.; Li, Y.; Shi, M.; Zhang, J.; Bourgeois, M.; Yang, H.; Chen, X.; Recuenco, S.; Gomez, J.; Chen, L.-M.; Johnson, A.; Tao, Y.; Dreyfus, C.; Yu, W.; McBride, R.; Carney, P.J.; Gilbert, A.T.; Chang, J.; Guo, Z.; Davis, C.T.; Paulson, J.C.; Stevens, J.; Rupprecht, C.E.; Holmes, E.C.; Wilson, I.A.; Donis, R.O. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. PLOS Pathogens. 2013;9(10):e1003657.

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 research. 2004;32(2):643-652.

Turan, K.; Nagata, K.; Kuru, A. Antiviral effect of Sanicula europaea L. leaves extract on influenza virus-infected cells. Biochemical and biophysical research communications. 1996 Aug 5;225(1):22-26.

Turner, P.C.; Sancho, M.C.; Thoennes, S.R.; Caputo, A.; Bleackley, R.C.; Moyer, R.W. Myxoma Virus Serp2 Is a Weak Inhibitor of Granzyme B and Interleukin-1β-Converting Enzyme In Vitro and Unlike CrmA Cannot Block Apoptosis in Cowpox Virus-Infected Cells. Journal of Virology. 1999;73(8):6394-6404.

Uchida, J.; Yasui, T.; Takaoka-Shichijo, Y.; Muraoka, M.; Kulwichit, W.; Raab-Traub, N.; Kikutani, H. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. 1999;286(5438):300-303.

Uren , R.T.; Dewson , G.; Chen , L.; Coyne , S.C.; Huang , D.C.S.; Adams , J.M.; Kluck , R.M. Mitochondrial permeabilization relies on BH3 ligands engaging multiple prosurvival Bcl-2 relatives, not Bak. Journal of Cell Biology. 2007;177(2):277-287.

Uyeki, T.M. Influenza. Annals of internal medicine. 2017 Sep 5;167(5):Itc33-itc48.
Vanlangenakker, N.; Vanden Berghe, T.; Vandenabeele, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. Cell Death & Differentiation. 2012 2012/01/01;19(1):75-86.

Volkmann, N.; Marassi, F.M.; Newmeyer, D.D.; Hanein, D. The rheostat in the membrane: BCL-2 family proteins and apoptosis. Cell Death & Differentiation. 2014 2014/02/01;21(2):206-215.

Wang, G.-Q.; Gastman, B.R.; Wieckowski, E.; Goldstein, L.A.; Gambotto, A.; Kim, T.-H.; Fang, B.; Rabinovitz, A.; Yin, X.-M.; Rabinowich, H. A Role for Mitochondrial Bak in Apoptotic Response to Anticancer Drugs*. Journal of Biological Chemistry. 2001 2001/09/07/;276(36):34307-34317.

Webster, R.G.; Bean, W.J.; Gorman, O.T.; Chambers, T.M.; Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiological reviews. 1992 Mar;56(1):152-179.

Weis, K.; Mattaj, I.W.; Lamond, A.I. Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. Science (New York, NY). 1995 May 19;268(5213):1049-1053.

West, A.P.; Shadel, G.S.; Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. Nature reviews Immunology. 2011 Jun;11(6):389-402.

Wiedenheft, B.; Sternberg, S.H.; Doudna, J.A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature. 2012 Feb 15;482(7385):331-338.

Wilkinson, R.; Wiedenheft, B. A CRISPR method for genome engineering. F1000Prime Rep. 2014;6:3-3.

Willis, S.N.; Chen, L.; Dewson, G.; Wei, A.; Naik, E.; Fletcher, J.I.; Adams, J.M.; Huang, D.C. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes & development. 2005 Jun 1;19(11):1294-1305.

Wolff, T.; O'Neill, R.E.; Palese, P. NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells. Journal of virology. 1998 Sep;72(9):7170-7180.

Wood, E.J. Molecular Cloning. A Laboratory Manual: by T Maniatis, E F Fritsch and J Sambrook. pp 545. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1982. $48. Biochemical Education. 1983 1983/04/01/;11(2):82.

Yoon, S.-W.; Webby, R.J.; Webster, R.G. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. In: Compans, R.W.; Oldstone, M.B.A., editors, Influenza Pathogenesis and Control - Volume I. Cham: Springer International Publishing; 2014. p. 359-375.

Youle, R.J.; Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2008 2008/01/01;9(1):47-59.

Zaltsman, Y.; Shachnai, L.; Yivgi-Ohana, N.; Schwarz, M.; Maryanovich, M.; Houtkooper, R.; Vaz, F.; De Leonardis, F.; Fiermonte, G.; Palmieri, F.; Gillissen, B.; Daniel, P.; Jimenez, E.; Walsh, S.; Koehler, C.; Roy, S.; Walter, L.; Hajnoczky, G.; Gross, A. MTCH2/MIMP is a major facilitator of tBID recruitment to mitochondria. Nature cell biology. 2010 06/01;12:553-562.

Zhang, J.; Pekosz, A.; Lamb, R.A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. Journal of virology. 2000 May;74(10):4634-4644.

Zhirnov, O.P.; Konakova, T.E.; Wolff, T.; Klenk, H.D. NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. Journal of virology. 2002 Feb;76(4):1617-1625.

Zhu, H.; Wang, J.; Wang, P.; Song, W.; Zheng, Z.; Chen, R.; Guo, K.; Zhang, T.; Peiris, J.S.; 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 May 25;401(1):1-5.