TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNTERFERON YOLAĞI İLE İLİŞKİLİ HÜCRESEL PROTEİNLERİN İNFLUENZA A VİRÜSÜ KONAK ÖZGÜLLÜĞÜNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ELİF ÇAĞLAYAN

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. KADİR TURAN

2021 – İSTANBUL

BEYAN

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

Elif ÇAĞLAYAN

İmza

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamın planlanmasından sonuç alınmasına kadar her aşamada ilgi ve desteğini hiç eksik etmeyen, her sorunumu sabır ile dinleyen, zek*â*sı ve öngörüsü ile bana ve birçok insana ışık tutan bir hocanın öğrencisi olma şansına sahip olmaktan gurur duyduğum değerli danışman hocam Prof. Dr. Kadir TURAN' a,

Doktora eğitimim boyunca katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Azize ŞENER' e ve İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji Ve Genetik Ana Bilim Dalından Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a

Laboratuvar çalışmalarımdaki yardımlarından ve güler yüzlü tavırlarından dolayı Tuğba KOÇMAR ve Pınar ULUPINAR' a

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, benden desteklerini hiç esirgemeyen, benimle her zaman gurur duyan, eğitim hayatım boyunca bana anlayış ve fedakârlık gösteren sevgili anneme ve değerli babama, çok sevgili kardeşlerim Gökhan ÇAĞLAYAN, Emirhan ÇAĞLAYAN ve Eda ÇAĞLAYAN' a

Her daim yanımda olan ve varlıkları ile bana güç veren İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ailesine,

Ayrıca her zaman yanımda duran, bana her daim güvenen ve ellerinden gelen her türlü desteği benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren çok sevdiğim değerli dostlarım Gönül KABACA, Şerife SAYGILI ve Şeyda YILDIZ' a teşekkürlerimi sunarım.

Elif ÇAĞLAYAN

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından "İnterferon Yolağı İle İlişkili Hücresel Proteinlerin İnfluenza A Virüsü Konak Özgüllüğüne Etkilerinin Araştırılması" konulu ve "SAG-C-DRP-250919-0291" numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 6
4.1. İnfluenza Virüsleri 8
4.1.1. İnfluenza A Virüsü 10
4.1.2. İnfluenza A Moleküler Yapısı ve Genom Organizasyonu 12
4.1.3. İnfluenza A Viral Yaşam Döngüsü 15
4.1.4. İnfluenza A Antijenik Yapı Değişiklikleri 21
4.2. İnfluenza Virüsleri ve Konak Hücre İlişkisi 23
4.3. İnfluenza A Virüsü Enfeksiyonlarda İmmunite 25
4.4. İnterferonlar 26
4.4.1. İnterferonların Keşfi 26
4.4.2. İnterferonların Sınıflandırılması 28
4.4.3. İnterferonların Etki Mekanizması 30
4.4.4. İnterferon ile İlişkili Antiviral Aktivite Gösteren Proteinler 32
4.5. İnterferonlara Karşı Virüs Direnci 35
4.6. Viral RNA'sının Tanınması ve İnterferon Üretiminin İndüksiyonu 36
4.6.1. TLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyalleme Yolu 37
4.6.2. RLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyal Yolu 38
4.6.3. NLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyal Yolu 39
4.7. İnfluenza Virüsleri ve İnterferonlar 40
5. GEREÇ ve YÖNTEM 44
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 44
5.2. Enzimler 46
5.3. Ticari Kitler 46
5.4. Antikorlar 46
5.5. Cihaz ve Gereçler 47
5.6. Besiyerleri 48
5.6.1. Luria bertani (LB) besiyeri 48
5.6.2. Luria bertani agar (LBA) besiyeri 48
5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri 48

5.6.4. Muhafaza Besiyeri 48
5.7. Çözeltiler 49
5.7.1. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid – a/h) 49
5.7.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (% 10 – a/h) 49
5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu) 49
5.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml) 49
5.7.5. %70 Etil alkol 49
5.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0) 49
5.7.7. Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1) 49
5.7.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS) 50
5.7.9. Glikoz çözeltisi (1 M) 50
5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) 50
5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M) 50
5.7.12. Lamel kapatma çözeltisi 50
5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0.55M) 51
5.7.14. % 10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi 51
5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi 51
5.7.16. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M) 51
5.7.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 – a/h) 51
5.7.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M) 51
5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi 51
5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M) 52
5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M) 52
5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (% 7.5) 52
5.7.23. %10 Sodyum deoksikolat 52
5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h) 52
5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N) 52
5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M) 52
5.7.27. % 0.25 Tripsin çözeltisi 53
5.7.28. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h) 53
5.7.29. % 10 Tween-20 (w/v) 53
5.8. Tamponlar 53
5.8.1. 4x Konsantre ayırma jel tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8) . 53

5.8.2. Bakteri transformasyon tamponu 53
5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0) 53
5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS) 54
5.8.5. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat) 54
5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu 54
5.8.7. 10x Konsantre MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit] tamponu 54
5.8.8. 4x Konsantre paketleme jel tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8) 54
5.8.9. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3) 54
5.8.10. Protein transfer tamponu 55
5.8.11. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0.2 Bromophenol mavisi – a/h ; % 4 2-Merkaptoetanol - h/h; % 40 Gliserin– h/h, pH:6.8) 55
5.8.12. RIFA tamponu (50 mM Tris, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl; % 1 NP-40, % 0.5 Sodyum Deoksikolat; % 0.1 SDS) 55
5.8.13. 2x Konsantre RNA yükleme tamponu 55
5.8.14. Sodyum asetat tamponu (3 M) 55
5.8.15. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu 55
5.8.16. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0) 56
5.8.17. Tris/ EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0) 56
5.8.18. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M Tris,1.25 M Glisin, pH:8.3) 56
5.8.19. 5x Konsantre TBE tamponu 56
5.8.20. 20x Konsantre TBS tamponu 56
5.8.21. TBS ve TBS-T tamponu 56
5.9. Virüsler 57
5.10. Plazmit vektörler 57
5.11. Bakteriler 58
5.12. Memeli Hücre Hatları 58
5.13. DNA Analizleri İçin Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 58
5.14. RNA Analizleri İçin Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 59
5.15. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi 59

5.16. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 60
5.17. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması 60
5.18. Genlerin Kantitasyonu için RNA'ların Ekstre Edilmesi, cDNA'ların Hazırlanması ve Kontrolleri 60
5.18.1. HEK293 Hücrelerinin İnfluenza Virüsleri ile Enfekte Edilmesi 61
5.18.2. HEK293 Hücrelerinin Plazmit Vektörler ile Transfekte Edilmesi 61
5.18.3. Hücrelerden Total RNA Ekstraksiyıonu 61
5.18.4. RNA'ların Kontrol Edilmesi 62
5.18.5. cDNA'ların Elde Edilmesi (Revers Transkripsiyon) 62
5.18.6. cDNA'ların Aktin Beta (ACTB) ve Porfobilinojen Deaminaz (PBGD) Genleri Üzerinden Kontrol Edilmesi 63
5.19. PZR Dizin Analizi ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu 64
5.20. Kantitatif PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 64
5.21. İstatistiksel Analiz 65
5.22. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması 65
5.22.1. HEK293 Hücrelerinden Total RNA'nın İzole Edilmesi 65
5.22.2. cDNA'larının Hazırlanması ve Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Çoğaltılması 66
5.22.3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması 69
5.22.4. pCHA plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması 69
5.22.5. Doğrusal Hale Getirilen pCHA Plazmit Vektörünün cDNA'ları ile Ligasyonu ve Transformasyonu 70
5.22.6. Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması 71
5.22.7. Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu 71
5.22.8. Plazmit DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi 72
5.22.9. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri 73
5.23. Delesyonlu ve Kimerik PA Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması 73
5.24. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması 75
5.25. pCHA Plazmitine Klonlanan İnsan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Tekniği ile Analizi 75

5.25.1. HEK293 Hücrelerinin Plazmitler ile Transfeksiyonu ve Hücre Lizatlarının Hazırlanması 75
5.25.2. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması 76
5.25.3. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi 76
5.25.4. Membrana Transfer Edilen Proteinlerinin Görüntülenmesi 77
5.26. pCHA Plazmiti Üzerinden Kodlanan İnsan Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmünfloresans Yöntemle İncelenmesi 77
5.26.1. HeLa Hücrelerinin Plazmit DNA'lar ile Transfeksiyonu 77
5.26.2. Plazmitler ile Transfekte Edilen HeLa Hücrelerinde Proteinlerin İmmünfloresans Yöntem ile Görüntülenmesi 78
5.27. pCHA Plazmitine Klonlanan Genler Tarafından Kodlanan İnterferon Yolağı ile ilişkili İnsan Proteinlerin İnflueza A Virüs RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması 78
5.28. İnfluenza A virüsü PA Proteinlerinin Transkripsiyon ve/veya Translasyon Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi 81
5.29. Besiyerine Salınan Belirteç (Reropter) SEAP Enzimi Aktivitesi Ölçümü.. 82
6. BULGULAR 83
6.1. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte Edilen ya da Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinden Total RNA Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler 84
6.2. Reverz Transkripsiyon ile cDNA'ların Hazırlanması ve Kontrolü ile İlgili Veriler 85
6.3. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte ya da Viral RNA Polimeraz Enzimi Kodlayan Plazmitler ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler 87
6.3.1. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler 93
6.3.2. İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enziminin Üç Alt Birimini Kodlayan Plazmitler ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler 98
6.3.3. İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enziminin PA Alt Birimini Kodlayan Plazmit ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler 102
6.4. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması İle İlgili Veriler 105
6.4.1. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin cDNA'larının Elde Edilmesi ile İlgili Veriler 105

6.4.2. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin pCHA Vektörüne Klonlanması ile İlgili Veriler 112
6.5. pCHA Plazmit Vektörüne Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Belirlenmesine İlişkin Veriler 119
6.5.1. Western Melezleme Çalışmaları ile İlgili Veriler 119
6.5.2. İmmunfloresans Testler ile İlgili Sonuçlar 122
6.6. İnterferonlar ile İlişkili Seçilen Genler Tarafından Kodlanan Proteinlerin İnfluenza A virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkilerine İlişkin Veriler 125
6.7. İnfluenza A virüsü RNA Polimeraz Enzimi PA Alt Ünitesinin Transkripsiyon ve/veya Translasyon Üzerindeki Etkilerine İlişkin Veriler 128
6.7.1. İnfluenza A Virüsü PA Proteinlerinin Belirteç SEAP Ekspresyonuna Etkileri ile İlgili Veriler 128
6.7.2. İnfluenza A Virüsü PA Proteinlerinin HEK293 Hücrelerinde ACTB Proteini Sentezine Etkileri ile İlgili Veriler 132
7. TARTIŞMA ve SONUÇ 134
8. KAYNAKLAR 150
9. EKLER 193
9.1. Ek-1. Araştırma Makalesi 193
9.2. Ek-2. Poster Sunumu 193
10. ÖZGEÇMİŞ 194

Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

a/h	Ağırlık/hacim
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz çifti
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
FCS	Fetal buzağı serumu
FITC	Floresan izosiyanat
gr	Gram
g/L	Gram/Litre
h/h	Hacim/hacim
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri 293 (*İng. Human Embryonik Kidney 293*)
HeLa	İnsan servikal kanser hücreleri
IFN	İnterferon
IFNα	İnterferon alfa
IFNβ	İnterferon beta
IFNδ	İnterferon delta
IFNε	İnterferon epsilon
IFNγ	İnterferon gama
IFNλ	İnterferon lamda
IFNκ	İnterferon kappa
IFNω	İnterferon omega
IFNτ	İnterferon tau
IFNζ	İnterferon zeta
IgG HRP	İmmünoglobülin G yabanturpu peroksidaz

kDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
LUC	Lusiferaz
M	Molar
MDCK	Madin-Darby Köpek Böbrek Hücresi *(İng. Madin-Darby Canine Kidney)*
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonik asit
N	Normal
NP-40	Nonident P-40
OD	Optik dansite
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PBGD	Porfobilinojen deaminaz
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PIPES	1,4-piperazindietansülfonik asit
PVDF	Poliviniliden diflorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIFA	Radyoimmünopresipitasyon
RNP	Ribonükleoprotein kompleksi
SARS CoV2	Ağır akut solunum yolu sendromu-koronavirüs 2
SEAP	Salgılanan embriyonik alkalin fosfataz (*İng. Secreted Alkaline Phosphatase*)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TAE	Tris-asetat-EDTA
TBE	Tris-Borik asit-EDTA

TBS	Tris tamponlu salin
TBS-T	Tris tamponlu salin- Tween20
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
T-FTS	Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su
U	Ünite
UV	Ultraviyole
vRNP	Viral ribonükleoprotein
w/w	Ağırlık/ağırlık

Şekil Listesi

Şekil 4-1 1895-2010 Yılları arasında görülen İnfluenza A virüsü salgınları 11

Şekil 4-2 İnfluenza A virüsü moleküler yapısı (A) (https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm: erişim tarihi 18.12.2020) ve genom organizasyonu (B) 13

Şekil 4-3 İnfluenza A virüslerinin konak hücre membranında bulunan sialik asit reseptörlerine tutunması 15

Şekil 4-4 İnfluenza A Viral Yaşam Döngüsü. 17

Şekil 4-5 İnfluenza A virüslerinde, viral RNA polimeraz enzimi kaynaklı nokta mutasyonlarının neden olduğu antijenik değişmeler (antijenik kaymalar). 22

Şekil 4-6 İnfluenza A virüslerinde birlikte enfeksiyon sonucunda viral genlerin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi ve pandemilere neden olan yeni virüs tiplerinin ortaya çıkması 23

Şekil 4-7 Tip I, Tip II ve Tip III interferonların hücrelerde gen ekspresyonunu aktive etme mekanizmaları 32

Şekil 4-8 İnfluenza virüs enfeksiyonu ve interferonların rolü. 41

Şekil 6-1. İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen ya da plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile analizi..... 84

Şekil 6-2. Reverz transkripsiyon ile elde edilen cDNA'ların ACTB (A) ve PBGD (B) cDNA'ları üzerinden PZR ile kontrol edilmesi 86

Şekil 6-3. *RT² Profiler PCR Array* 96 kuyulu plakada kantitasyon için genler ve genlerin konumları. 87

Şekil 6-4. Virüsler ile enfekte olmamış HEK293 hücreleri ve iki farklı influenza A virüs tipi (WSN veya DkPen) ile enfekte hücrelerinde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri. 95

Şekil 6-5. Virüsler ile enfekte olmamış HEK293 hücreleri ve iki farklı influenza A virüs tipi (WSN veya DkPen) ile enfekte hücrelerde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları. 96

Şekil 6-6. İnfluenza A virüsleri (WSN veya DkPen) ile enfekte HEK293 hücrelerinde ve enfekte olmayan HEK293 hücrelerde interferon ile ilgili genlerin ekspresyon profilleri ve ısı haritaları. 97

Şekil 6-7. İnfluenza A virüsü WSN (W-3P) ve DkPen (D-3P) RNA polimeraz alt birimlerini (PB2, PB1, PA) kodlayan plazmitler ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerin interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri.. 100

Şekil 6-8. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini (3P) eksprese eden plazmit DNA'ları ile geçici olarak transfekte edilmiş HEK293 hücrelerindeki interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları. 101

Şekil 6-9. İnfluenza A virüsü WSN (W-PA) ya da DkPen (D-PA) virüsü RNA polimeraz enzimi PA alt birimini kodlayan plazmit ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerinde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyonu. 103

Şekil 6-10. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini PA alt birimini eksprese eden plazmit DNA'sı ile geçici olarak transfekte edilmiş HEK293 hücrelerindeki interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları.. 104

Şekil 6-11. İnsan HEK-293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan CDKN1B(1), IFNE(2), IFIT3(3), HLA-B(4), IFNA5(5), IFI27(6), IFITM3(7), IFIT1(8), CCL5(9) ve OAS1(10) DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi 112

Şekil 6-12. İnsan CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 genlerinin pCHA plazmitine klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri.. 113

Şekil 6-13. Restriksiyon endonükleazları ile kesilen plazmit vektörlerinin agaroz jel elektroforezi profilleri 115

Şekil 6-14 . pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin dizi analizi kromatogramları 116

Şekil 6-15. Plazmit vektörlerle transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentezlenen IFIT1, IFIT3, CDKN1B, IFNA5, IFNE ve IFITM3 proteinlerinin Western melezleme yöntemi ile görüntülenmesi. 121

Şekil 6-16. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı proteinlerin hücre içi loklalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile incelenmesi. 123

Şekil 6-17. HEK-293 hücrelerinde artan miktarlarda CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 proteinlerinin insan tipi influenza A(WSN) virüsü üzerine etkileri. 126

Şekil 6-18. HEK-293 hücrelerinde artan miktarlarda CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 proteinlerinin kuş tipi influenza A(DkPen) virüsü üzerine etkileri. 127

Şekil 6-19. HEK293 hücrelerinde artan miktarlarda sentez edilen İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri 129

Şekil 6-20. WSN ve DkPen tipi İnfluenza A virüsü PA proteinlerinden oluşan kimerik PA proteinlerinin şekilsel görünümü. 130

Şekil 6-21. WSN ve DkPen tip İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin karışımı olan kimerik PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri..... 130

Şekil 6-22. HEK293 hücrelerinde İnfluenza A virüsü WSN (A) ya da DkPen (B) RNA polimeraz enzimi alt üniteleri PB2, PB1 ve PA ile birlikte sentez edilen PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri 131

Şekil 6-23. HA uzantılı ACTB proteini kodlayan plazmit (pCHA-ACTB) ve delesyonlu PA proteini kodlayan bir plazmit (pCAGGS-cPA/D, pCAGGS-nPA/WSN, pCAGGS-cPA/DkP ya da pCAGGS-nPA/(WSN) ile birlikte transfekte edilen HEK293 hücrelerinde, doğal ACTB ve HA uzantılı ACTB protein ekspresyonunun Western melezleme ile analizi.. 133

Tablo Listesi

Tablo 4-1 ICTV tarafından yapılan Orthomyxoviridae Sınıflandırması (ICTV 2019) 9

Tablo 4-2 İnterferonlar ve Reseptörleri 29

Tablo 5-1 İnsan CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 genlerinin PZR ile çoğaltılmasında ve bu genlerin DNA dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotid primerler. 67

Tablo 5-2. Plazmit DNA'ları ve bu DNA'ların kontrolünde kullanılan restriksiyon enzimleri. 73

Tablo 5-3 Delesyonlu ve kimerik PA proteini kodlayan plazmmit vektörlerin oluşturulmasında kullanılan oligonukleotid primerler. 74

Tablo 5-4 İnfluenza virüsü minireplikon testlerinde kullanılan, WSN ve DkPen minireplikonunu oluşturan plazmitler, insan proteinlerini (CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3 , IFNE ve OAS1) kodlayan plazmitler ve 24-well plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda her bir kuyucuk için kullanılan plazmit miktarları. 79

Tablo 6-1 Çalışmada kullanılan *RT² Profiler PCR Array* kitinin içerdiği interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin açık isimleri, kısaltılmış isimleri (sembol) ve veri bankası (GenBank) numaraları. 89

Tablo 6-2 Kontrol hücreleri ve influenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerinde housekeeping gen transkript seviyelerindeki farklılıklar. 98

Tablo 6-3. PZR ile çoğaltılan genler ve elde edilen DNA fragmentlerinin baz çifti (bç) olarak büyüklükleri. 111

Tablo 6-4 Plazmit vektörlerin kesilerek kontrol edilmesinde kullanılan restriksiyon endonukleaz enzimleri ve kesim sonrasında oluşması beklenen DNA fragment boyutları (bç). 115

Tablo 6-5 pCHA plazmitine klonlanan genler tarafından kodlanan proteinlerin amino asit sayıları ve amino asit kompozisyonuna göre belirlenmiş moloekül ağırlıkları (Dalton) 120

1. ÖZET

İnterferon Yolağı İle İlişkili Hücresel Proteinlerin İnfluenza A Virüsü Konak Özgüllüğüne Etkilerinin Araştırılması

Öğrenci Adı : Elif ÇAĞLAYAN
Danışman Adı : Prof. Dr. Kadir TURAN

Amaç: Bu çalışmada İnfluenza A virüsleriyle enfekte ya da viral RNA polimeraz enzimini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde interferonlarla ilişkili genlerin transkript düzeylerinin saptanması ve virüsler ile konak interferon savunma mekanizmaları arasındaki ilişkinin ve viral patogenezin aydınlatılmasına ışık tutacak verilerin elde edilmesi amaçlandı.

Gereç ve yöntem: Çalışmada HEK293 hücreleri kullanıldı. Hücreler İnfluenza A/WSN/33/H1N1 (WSN) veya A/Duck/Pennsylvania/10,218/84/H5N2 (DkPen) virüsleriyle enfekte edildi ya da viral protein kodlayan plazmitlerle transfekte edildi. Hücrelerde interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile saptandı. Deneylerde 89 farklı gen için tasarlanan plakalar (PAHS-016ZD-6/Qiagen) kullanıldı. Genler için belirlenen rölatif transkript değerleri STAT3 geni değerleriyle normalize edildi ve farklı gruplarda transkript düzeyleri karşılaştırdı. Belirlenen bazı genler tarafından kodlanan proteinlerinin viral RNA polimeraz enzimine etkileri araştırıldı.

Bulgular: Virüs enfeksiyonunun HEK293 hücrelerinde interferonlarla ilişkili genlerin transkript düzeylerinde büyük değişime neden olduğu görüldü. DkPen virüsleriyle enfekte hücrelerde WSN virüslerine göre daha fazla sayıda genin down-regüle olduğu saptandı (DkPen: 32 gen down-regüle, 18 gen up-regüle / WSN: 19 gen down-regüle, 32 genin up-regüle). Transfekte HEK293 hücrelerinde sentez edilen viral RNA polimeraz enzimi PA alt ünitesinin farklı yönlerde de olsa transkript düzeylerinde dramatik değişmelere neden olduğu görüldü. İnterferonlarla ilişkili seçilen proteinlerin çoğunun viral RNA polimeraz enzimini inhibe ettiği saptandı.

Sonuç: İnsanlarda enfeksiyon yapan WSN virüsleri ile karşılaştırıldığında, kuş tipi DkPen virüslerinin HEK293 hücrelerinde daha fazla sayıda geni down-regüle ettiği saptandı. Özellikle viral polimeraz enzimi PA alt biriminin, hücrelerdeki genlerinin ekspresyonunu etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu belirlendi. İnterferonlar ile ilişkili proteinlerin de virüs-konak spesifikliğini belirleyen etkenler arasında olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: İnfluenza A Virüsü, İnterferonlar, Viral RNA polimeraz, PA proteini, Gen Ekspresyonu

2. SUMMARY

Investigation of the Effects of Interferon Pathway-Related Cellular Proteins on Influenza A Virus Host Specificity

Student Name : Elif ÇAĞLAYAN
Name of Supervisor : Prof. Dr. Kadir TURAN

Objective: In this study, it was aimed to determine the transcript levels of genes related with interferons in HEK293 cells infected with influenza A viruses or transfected with plasmids encoding the viral RNA polymerase enzyme, and to obtain data for elucidation the relationship between viruses and host interferon defense mechanisms and viral pathogenesis.

Material and methods: The HEK293 cells were used in the study. The cells were infected with Influenza A/WSN/33/H1N1 (WSN) or A/Duck/Pennsylvania/10,218/ 84/H5N2 (DkPen) viruses or transfected with plasmids encoding the viral proteins. Transcript levels of the genes related with interferons in the cells were quantified by real-time PCR. Plates designed for 89 different genes (PAHS-016ZD-6/Qiagen) were used in experiments. The relative transcript values of the genes were normalized with STAT3 gene values and transcript levels were compared in different groups. The effects of proteins encoded by defined genes on theviral RNA polymerase enzyme were investigated.

Results: It was observed that the virus infection caused significant changes in transcript levels of the genes related with interferons in HEK293 cells. More genes were down-regulated in the cells infected with DkPen viruses than that of the WSN viruses (DkPen: 32 genes down-regulated, 18 genes up-regulated / WSN: 19 genes down-regulated, 32 genes up-regulated). The PA subunit of viral RNA polymerase enzyme expressed in transfected HEK293 cells, was shown to cause a dramatic change in transcript level, though in different ways. It was determined that most of the selected proteins related with interferons inhibit the viral RNA polymerase enzyme.

Conclusion: A higher number of interferon-related genes were found to be down-regulated in the cells infected with avian type influenza A/DkPen viruses compared to the human type A/WSN. It was determined that especially the viral polymerase enzyme PA subunit is one of the important factors affecting the expression of genes in cells. It was concluded that proteins associated with interferons are also among the factors determining virus-host specificity.

Key words: Influenza A Virus, Interferons, Viral RNA polymerase, PA protein, Gene Expression

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfluenza virüsleri, insanlarda solunum yolu hastalıklarına neden olan viral patojenlerin başında gelmektedir. Bu virüslerin yol açtığı hastalıklar, dünya genelinde çok büyük ekonomik kayıplara neden olmakta ve özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan yaşlılarda, bebeklerde ve kronik hastalığı olan kişilerde yüksek mortalite ile seyretmektedir. İnfluenza virüsleri sadece insanlarda değil başta kanatlılar olmak üzere domuzlar, atlar ve çeşitli deniz memelilerinde de enfeksiyon yapmakta, epidemilere ve pandemilere neden olmaktadır. Dolayısıyla influenza virüsleri çok geniş bir konak yelpazesine sahiptirler.

İnfluenza virüsleri *Orthomixovirus* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu virüsler, sahip oldukları martiks proteini (M1) ve nükleoproteinlerin (NP) antijenik özelliklerine göre İnfluenza A, İnfluenza B ve İnfluenza C tipi olmak üzere üç ana grup içerisinde sınıflandırılmıştır (Couch, 1996). Yakın bir tarihte sığırlardan izole edilen ve antijenik özellikleri bakımından farklılık gösteren yeni bir influenza virüsü tipi belirlenmiş ve bu virüs İnfluenza D grubu içerinde değerlendirilmiştir (Flynn ve ark., 2018). Bu virüsler arasında insan sağlığı açısından önemli risk oluşturan virüs grubu influenza A tipi virüslerdir. İnfluenza A virüsleri, özellikle glikoprotein yapıda hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) yüzey antijenlerinde meydana gelen değişmelere bağlı olarak sıklıkla tekrarlayan epidemilere ve zaman zaman tüm dünyayı etkileyen pandemilere neden olurlar. Bu salgınlar sonucunda çok sayıda insan yaşamını yitirmekte ve milyarlarca dolar değerinde ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, dünyanın farklı ülkelerinde çok sayıda araştırma grubu influenza A virüslerinin yol açtığı hastalıkları tedavi etmek ve bu hastalıklardan korunmak için etkili olabilecek yeni yollar aramaktadır.

İnfluenza A virüsleri HA ve NA yüzey antijenlerinin özelliklerine göre çok sayıda alt tipe ayrılırlar. Özellikle kanatlılarda bu virüslerin hemen hemen tüm alt tiplerine rastlanır. İnfluenza A virüslerinin yüzey antijenlerinden HA proteininin yapısı (Green ve ark., 1982; Skehel ve Wiley, 2000; Zhang ve ark., 2012), bu proteinin konak hücrelerde bağlandığı reseptörlerin tipi (Skehel ve Wiley, 2000; Bouvier ve Palese, 2008; Takahashi ve ark., 2009) ve hücre içi savunma mekanizmaları (Berton ve ark., 1984; Hovanec ve Air, 1984; Sriwilaijaroen ve Suzuki, 2012) konak spesifikliğini

belirleyen temel faktörlerdir (Leser ve Lamb, 2005). Yapılan bazı çalışmalar virüsün RNA polimeraz enzimini oluşturan protein alt ünitelerinin de viral patogenez açısından büyük önem taşıdığını ortaya koymuştur (Karaaslan ve Turan, 2018). Diğer taraftan, konak organizmalar da influenza virüsü enfeksiyonlarına karşı önemli korunma mekanizmaları geliştirmiştir. Virüslere karşı koruma sağlayan konak savunma mekanizmalarının başında interferonlar gelmektedir. İnterferonlar otokrin, parakrin ve endokrin yolla etki ederek konak hücrelerinde viral replikasyonu zorlaştıracak çok sayıda proteinin sentezlenmesine neden olurlar. Hücrelerde içerisinde interferonların etkisi ile sentez edilen 2'-5' oligoadenilat sentetaz, protein kinaz (PKR) ve Mx (Turan ve ark., 2004) gibi çok sayıda protein değişik mekanizmalarla viral replikasyon için bariyer oluştururlar. Bu proteinler influenza A virüslerinin yanı sıra *Bunyaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* ve *Togaviridae* gibi virüs aileleri içerisinde yer alan diğer birçok RNA virüsü replikasyonunun da seyrini belirleyen çok önemli faktörlerdir (Haller ve Kochs, 2002). Buna karşın virüslerin çoğu konak hücrelerin savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirmek için interferon antagonisti olarak işlev gören proteinler sentez ederler.

İnfluenza virüsü patogenezinde etkili olan çok sayıda viral ve hücresel faktörler bilinmekle birlikte, bu proteinler arasındaki etkileşimler ve etki mekanizmaları hakkında mevcut bilgiler yetersizdir. Enfekte hücrelerde viral proteinler ve hücresel proteinler arasındaki ilişki ve moleküler düzeyde etkileşim mekanizmaları açıklık kazandıkça, virüsler ile mücadelede de başarılı sonuçlar alınmaktadır. Bunun en somut örnekleri içerisinde bulunduğumuz dönemde SARS CoV2 virüsünün neden olduğu Covid-19 pandemisi ile mücadelede görülmektedir. SARS CoV2 virüsünün replikasyon staratejileri ve konak hücre ile ilişkisi hakkında birçok bilinmeyen nokta olmasına rağmen, gerek aşı geliştirme çalışmalarında gerekse antiviral ilaçlar ile tedavide başarılı sonuçlar alınmıştır (Riva ve ark., 2020; V'Kovski ve ark., 2020). Dolayısıyla konak hücre-virüs ilişkisinin iyi anlaşılması viral enfeksiyonlara karşı korunma sağlayan etkili araçların geliştirilmesinde anahtar role sahiptir.

Günümüzde geçmişle kıyaslandığında influenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı korunmada çok daha iyi durumda olduğumuz bir gerçektir. Bununla birlikte bu durum, her yıl milyonlarca insanın gribe yakalanması, çok sayıda insanın grip salgınları

nedeniyle yaşamını yitirmesi ve dünya ekonomisini milyarlarca dolar zarara uğratması gerçeğini de değiştirmemektedir. Bu nedenle dünyanın önde gelen viroloji laboratuvarlarında, influenza A virüsleri ile konak hücre arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamaya yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmaların temel amacı, influenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı başta insanlar olmak üzere, özellikle kanatlılar ve diğer çiftlik hayvanlarını korumaktır. İnfluenza A virüsleri tarafından kodlanan 11 farklı protein, çok sayıda konak protein ile etkileşim halindedir. İnsan tipi influenza A virüsleri memeli hücrelerinde kolayca replike olabilmekte buna karşın kuş tipi virüsler genellikle replikasyonda büyük bir direnç ile karşılaşmaktadır. Bu direnci sağlayan hücresel faktörlerin etki mekanizmaları iyi bilinmemektedir. Bu durumun ortaya çıkmasında önemli viral faktörlerden birinin viral RNA polimeraz enzimi ve özellikle de enzimin PA alt ünitesi olduğu bilinmektedir (Pham ve ark., 2018). Bu doktora tez çalışmasında da influenza A virüsü patogenezinde ve konak özgüllüğünde etkili olabilecek, dolayısıyla viral replikasyonun kontrolünde hedef olarak kullanılabilecek olası hücresel proteinlerin saptanması amaçlanmıştır. Bu hedef doğrultusunda viral enfeksiyon sonucu hücrelerde sentez edilen proteinlerin ya da plazmit vektörler üzerinden kodlanan ve viral patogenez açısından önemi bilinen RNA polimeraz enziminin alt ünitelerinin hücre savunma mekanizmalarından interferon yolağı ile ilişki genlerin ekpresyonlarına etkileri PZR dizin analizi tekniği ile araştırılmıştır. Elde edilen verilerin ışığında viral patogenez açısından önemli olabileceği düşünülen belirli konak hücre proteinlerinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri saptanmıştır. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden özellikle PA proteininin viral patogenez açısından önemi irdelenmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

İnfluenza virüsleri insandan insana çok kolay bulaşabilen üst solunum yolu enfeksiyonlarına yol açar. Dolayısıyla bu virüsler insan sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. İnfluenza virüslerin yol açtığı salgınlarla ilgili kayıtlar oldukça eski tarihlere dayanır (Hsieh ve ark., 2006). Tarihte ilk defa M.Ö. 412 yılında grip salgını bildirilmiştir (Kuszewski ve Brydak, 2000; Potter, 2001). İnfluenza A virüsleri geçen yüzyıl içerisinde tüm dünyayı etkileyen üç büyük salgına neden olmuştur (Hsieh ve ark., 2006). Bunlardan en büyüğü 1918–1919 yıllarında görülen ve farklı kaynaklara göre 20-50 milyon arasında değişen sayıda insanın ölümü ile sonuçlanan salgındır (Couch, 1996; Taubenberger, 2005). İspanyol gribi olarak da adlandırılan bu salgında etkili olan influenza A virüsü tipinin H1N1 tipi olduğu anlaşılmıştır (Sabbatani ve Fiorino, 2007). Bu pandemi dışında influenza A virüsleri, 1957–1958 yıllarında Asya gribi (H2N2) ve 1968-1970'te Hong Kong gribi (H3N2) olarak adlandırılan önemli salgınlara neden olmuştur (Cox ve Subbarao, 2000).

İnfluenza virüsü enfeksiyonlarının en belirgin semptomları; ateş, kas ağrıları, halsizlik, burun akıntısı ve hapşırmadır. Enfeksiyonla ilişkili ateş ve akut semptomlar 7 ila 10 gün sürebilir ve buna sürekli yorgunluk eşlik eder. Mevsimsel influenza enfeksiyonlarının çoğu hafif ve orta şiddette semptomlar ile seyreder, ancak şiddetli seyreden durumlarda, immün yanıtın düzensizliği nedeniyle akciğer inflamasyonu ve ilişkili dokuların hasarı ile sonuçlanabilir (Sun ve ark., 2009). İnfluenza virüsü enfeksiyonunda ölüm riski taşıyan bireyler arasında hamile kadınlar, HIV virüsünün neden olduğu immün yetmezlik enfeksiyonu (AIDS) gibi immün sistemi baskılanmış kişiler, bebekler, yaşlılar ve kronik hastalıkları olan bireyler (örn. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, böbrek ve hematolojik hastalıklar gibi) yer alırlar (Plans-Rubio, 2007; Taubenberger ve Morens, 2008). Bu gruplarda artan influenza enfeksiyon riski, kısmen viral patojenleri etkisiz hale getirecek olan bağışıklık sisteminin zayıflamış olmasıyla açıklanabilir. Bağışıklık sistemi zayıf olan kişilerde bronşit ve pnömoni gelişme olasılığı çok daha yüksektir.

Tam bir koruma sağlamamakla birlikte influenza virüs enfeksiyonlarına karşı korunmanın en etkili yolu aşılanmadır. Hasta bireylerin tedavisinde ise anti-influenza virüs aktivitesine sahip bazı ilaçlardan yararlanılır. Aşılamada daha çok influenza

virüsü komplikasyonlarının risk oluşturduğu bireyler ya da bu bireylere virüs bulaştırabilecek olanlar üzerinde odaklanılmıştır. İnfluenza virüsü aşıları, bir önceki mevsimde insan popülasyonunda dolaşımda olan virüs suşları temel alınarak üretilmektedir. Bu aşılar genellikle üç (trivalen) ya da dört (kuadrivalen) farklı virüs tipinin karışımından oluşmaktadır (https://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/summary/summary-recommendations.htm#composition: erişim tarihi 18.12.2020). Bu aşılar iki farklı influenza A suşu (H3N2 ve H1N1) ve bir ya da iki farklı influenza B suşu antijenlerinden oluşur. İnfluenza virüs membranında yer alan glikoprotein yapıda antijenler, konak bağışıklık sistemi açısından büyük önem taşımaktadır. İnaktif halde virüsler ya da saflaştırılmış HA ve NA yüzey glikoproteinleri aşı olarak kullanılmaktadır. Çok yakın geçmişte Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (*İng. Food ve Drug Administration; FDA*) tarafından onaylanan rekombinant influenza aşısı, *Flublok* böcek hücrelerinde üretilen ve saflaştırılan HA proteinlerinden oluşmaktadır (King ve ark., 2009; Baxter ve ark., 2011; Loeffen ve ark., 2011; Treanor ve ark., 2011). Dolayısıyla rekombinant DNA teknolojileri ile üretilecek influenza A virüsü yüzey antijen proteinleri aşı olarak kullanılabilmektedir (Mendelman ve ark., 2001). Yukarıda değinildiği gibi influenza A virüslerinin genetik yapılarında sıklıkla meydana gelen değişmeler bu virüslere karşı geliştirilen aşıların tam koruma sağlamamasına neden olmakta ve aşıların her yıl yenilenmesini zorunlu hale getirmektedir.

İnfluenza A virüslerine karşı kullanılan araçlardan bir diğeri de antiviral ilaçlardır. Günümüzde influenza enfeksiyonlarının tedavisi ya da profilaksisinde; nöraminidaz inhibitörleri (zanamivir, oseltamivir vb.) ve M2 blokörü adamantan türevleri (amantadin ve rimantadin) olmak üzere iki grup antiviral ilaç mevcuttur. Nöraminidaz inhibitörleri hem influenza A hem de influenza B virüslerine karşı etkili olan ilaçlardır. Buna karşın adamantan türevleri ilaçlar sadece influenza A'ya karşı etkilidirler (Fiore A.E. FA, 2011). Adamantan türevi antiviral ilaçlar influenza A virüsü membranında yer alan M2 proteininin işlevlerini bozarak antiviral etki gösterirler. M2 proteinleri iyon kanalı olarak işlev görür. Adamantan türevi bileşiklerin M2 proteinine bağlanması konformasyonel bir değişmeye neden olur. M2 proteininin işlev görmesini engelleyen bu durum virüslerin hücrelerde serbest kalmasını ve replikasyonun sonraki evrelere geçişini bloke eder (Davies ve ark., 1964). Buna karşın, Amerikan

hastalık önleme ve kontrol merkezi (*İng.* Center *for Disease Control and Prevention: CDC*) raporlarına göre yapılan çalışmalar, insan popülasyonunda dolaşımda olan influenza A virüsü tiplerinin büyük bir çoğunluğunun adamantan türevi ilaçlara karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Centers for Disease ve Prevention, 2009). Dolayısıyla bu grup ilaçların influenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı kullanımları çok sınırlıdır. Diğer taraftan amantadin ve rimantadin influenza B virüslerine karşı korunmada etkili değildir. Yeni nesil antiviral ilaçlar olan zanamivir ve oseltamivir benzeri ilaçlar konak hücre reseptörlerine bağlı sialik asit bakiyeleri analoglarıdır. Bu ilaçlar, konak hücre membranlarında bulunan sialik asit bakiyelerini keserek virüsün serbest kalmasını sağlayan virüse ait NA enzimini inhibe ederek, virüslerinin tomurcuklanma şeklinde enfekte hücrelerden kopup ayrılmasını engellerler. Bununla birlikte NA proteininde özelikle, sialik asiti bağlama bölgesinde yer alan amino asitlerin değişmesine neden olan mutasyonlar, virüslerin NA inhibitörlerine karşı direnç kazanmasına neden olur (Samson ve ark., 2013). Örneğin, NA proteininde Q136K, E119D ve H275Y poziyonlarında amino asitlerin değişmesine neden olan mutasyonların, virüsleri bu ilaçlara karşı dirençli hale getirdiği belirlenmiştir (L'Huillier ve ark., 2015; Kurebayashi ve ark., 2016). İnfluenza virüslerinin yüksek frekansta mutasyona uğrayabilmeleri ve farklı virüs suşlarına ait genom segmentlerinin karışabilmesi, mevcut aşıların ve antiviral ilaçların sürekli güncellenmesini ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir (Chao ve ark., 2012). Bu bağlamda influenza virüsü-konak hücre ilişkisinde önemli olan viral ve hücresel faktörler ön plana çıkmaktadır.

4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan zarflı (membranlı) virüslerdir. Bu aile içerisinde yer alan virüsler tek iplikli RNA genomu taşırlar ve ortalama 80-120 nm çapında küresel veya pleomorfik özellik gösterirler. Virüs genomları cinse bağlı olarak altı, yedi ya da sekiz segmentten oluşur. İnfluenza virüsü RNA genomları negatif polarite gösterir. Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi (*İng. International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV*) *Orthomyxoviridae* ailesi içerisindeki üyeleri gözden geçirerek yeni sınıflandırılmasını yayınlamıştır. Bu sınıflandırmaya göre *Orthomyxoviridae* ailesi 7 virüs cinsi ve 9 türden oluşmaktadır

(Tablo 4-1) (https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae : erişim tarihi 18.12.2020).

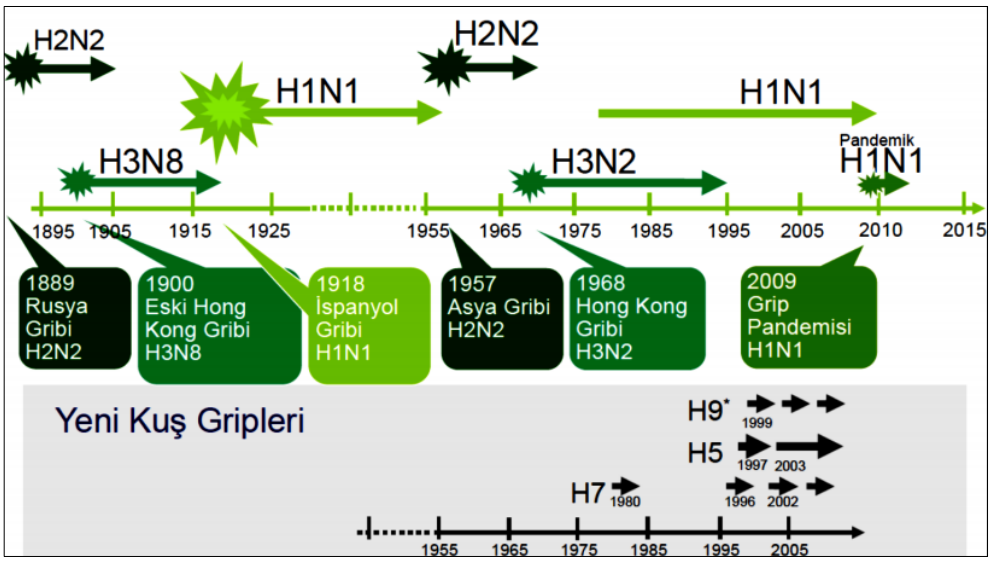
Tablo 4-1 ICTV tarafından yapılan Orthomyxoviridae Sınıflandırması (ICTV 2019).

Cins	Tür	Genom Segment Sayısı
Alfa influenza virus	Influenza A virus	8
Beta influenza virus	Influenza B virus	8
Gama influenza virus	Influenza C virus	7
Delta influenza virus	Influenza D virus	7
Isavirus	Salmon isavirus Johnston	8
Quaranjavirus	Atoll quaranjavirus Quaranfil quaranjavirus	6
Thogotovirus	Dhori thogotovirus Thogoto thogotovirus	6

İnfluenza virüslerin sınıflandırılması nükleokapsid (NP) ve matriks (M1) proteinlerinin antijenik farklılıklarına göre yapılmaktadır. Bu virüsler arasında insan sağlığı açısından ön plana çıkan influenza tipi, İnfluenza A virüsleridir. İnfluenza A virüsleri membranlarında taşıdıkları glikoproteinlerin antijenik özelliklerine, yani HA ve NA'a bağlı olarak alt tiplere ayrılmıştır. İnfluenza virüslerinin alt tipleri farklı patojenite ve konakçı aralığına sahiptir (Nelson ve Holmes, 2007; Taubenberger ve Kash, 2010; Muller ve ark., 2012). İnfluenza A virüsleri, insanlar, atlar, domuzlar, vizonlar, foklar, balinalar ve kümes hayvanlarında hastalık yapabilmektedir. İnfluenza B virüsleri ise yalnızca insanlar için patojendir. İnfluenza A virüsleri ve İnfluenza B virüsleri insanlarda ağır seyreden üst solunum yolu hastalığına neden olabilir. İnfluenza C virüsleri ise insanları ve domuzları enfekte etmesine rağmen, çoğunlukla ağır seyreden bir hastalık tablosuna neden olmazlar (Crescenzo-Chaigne ve ark., 2008). İnfluenza B ve İnfluenza C virüsleri, İnfluenza A virüsleri ile karşılaştırıldığında dar bir konak aralığına sahiptirler. İnfluenza D virüsü ilk olarak 2011 yılında ABD, Oklahoma'da solunum hastalığı olan domuzlardan influenza C benzeri bir virüs olarak izole edilmiştir (Hause ve ark., 2013; Hause ve ark., 2014). Virüs daha sonra İnfluenza D virüsü olarak sınıflandırılmıştır. Sığır ve domuzlardan izole edilen İnfluenza D virüslerinin insanlarda patojenitesi hakkında çok az şey bilinmektedir (Ducatez ve ark., 2015; Ferguson ve ark., 2015).

4.1.1. İnfluenza A Virüsü

İnfluenza virüsleri içerisinde özellikle A tip virüsler geçmişte olduğu gibi günümüzde de insan sağlığı için büyük bir potansiyel tehdit oluşturmaktadır. Yalnızca insanlarda bulunan İnfluenza B virüsünün aksine, İnfluenza A virüsleri, özellikle hayvan kaynaklı yeni bir alt tipin ortaya çıkmasıyla pandemik salgınlara neden olabilmektedir (Horimoto ve Kawaoka, 2005). Yukarıda da değinildiği gibi 20. yüzyılda İnfluenza A virüslerinin sebep olduğu dört büyük grip salgını kaydedilmiştir (Kilbourne, 2006) (Şekil 4-1). Bu salgınlar içerisinde en önemli olanı 1918-1919'da görülen İspanyol gribi salgınıdır. İspanyol gribi daha çok 20-40 yaş arası sağlıklı genç erişkinleri etkilemiştir. Ölümlerin yaklaşık % 50'si bu yaş grubunda görülmüştür. Grip salgını Birinci Dünya Savaşı sırasında 1918'in başında ABD'de görülmüş, ardından 1918'in sonunda İspanya'da ortaya çıkmıştır. Bu nedenle 1918-1919 İspanyol gribi olarak adlandırılmıştır (Taubenberger ve Morens, 2006). İspanyol gribini, 1956 yılının başlarında Çin'de ortaya çıkan ve 1957 yılında yayılan yeni tip H2N2 İnfluenza A virüsünün neden olduğu pandemi izlemiştir. İnfluenza A H2N2 virüsünün yol açtığı bu pandemi Asya pandemisi olarak bilinmektedir. İnsanlarda pandemiye neden olan bu virüs tipinin kuşlarda bulunan H2N2 suşu ile insanlarda dolaşımda olan 1918-H1N1 virüsü genomlarının karışması (*İng. Reassortment*) sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Pandemik H2N2 virüsünün HA (H2), NA (N2) ve PB1 proteinlerini kodlayan RNA segmentlerinin bir kuş tipi virüsten ve diğer viral proteinleri kodlayan beş RNA segmentinin ise insanlarda enfeksiyon yapan virüsten kaynaklandığı saptanmıştır. Asya influenza pandemik virüsünün dünya çapında tahmini 1-3 milyon insanı enfekte ettiği ve yaklaşık iki milyon insanın ölümüne neden olduğu belirtilmiştir (Jackson, 2009). Geçen yüzyılda İnfluenza A virüslerinin yol açtığı bir diğer önemli pandemi 1968 yılı Temmuz ayında ortaya çıkan Hong Kong pandemisidir. Bu pandemiye neden olan virüs tipi İnfluenza A/H3N2 tipidir. Bu virüs tipi, kuşlarda ve insanlarda enfeksiyon yapan iki farklı tipte İnfluenza A virüsünün birlikte enfeksiyonu ve genom segmentlerinin karışması sonucunda ortaya çıktığı saptanmıştır. İnfluenza A/H3N2 tipi virüsün; HA ve PB1proteinlerini kodlayan viral RNA segmentlerinin kuş tipi bir influenza A virüsünden, NA ve diğer viral proteinleri kodlayan RNA segmentlerinin ise 1957 pandemisine neden olan İnfluenza A/H2N2 virüsünden geldiği ileri sürülmektedir (Viboud ve ark., 2005).



Şekil 4-1 1895-2010 Yılları arasında görülen İnfluenza A virüsü salgınları https://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2013/10/G%C3%9CLAY-KORUKLUO%C4 %9ELU-30-Ekim-2013-1.pdf : erişim tarihi: 15.12.2010

İnfluenza A virüsü salgınları içerisinde bulunduğumuz yüzyılın başında domuz influenza A virüsü pandemisi olarak kendisini gösterdi. 2009 yılı Nisan ayında, Meksika'da domuz gribi olarak anılan yeni bir İnfluenza A/H1N1 alt tipinin yaygın bir salgını olarak rapor edildi. Haziran 2009'a gelindiğinde virüs tüm dünyaya yayılarak pandemiye dönüştü. Bununla birlikte pandemi olası kötü bir senaryoya dönüşmedi ve Ağustos 2010'da mevsimsel influenzada oldugu gibi normal bir düzeye döndü. 2009 pandemisine bağlı doğrulanmış en az 18.000 ölüm rapor edildi, ancak birçok kişinin virüs enfeksiyonu hastanede kalmaya gerek kalmadan hafif bir şekilde atlattığı bildirildi. Vakalardan izole edilen virüslerin genetik analizleri, bu yeni virüs tipinin kuş tipi influenza A virüsü (PB2 ve PA proteinlerini kodlayan segmentler), insan İnfluenza A/H3N2 virüsü (PB1 proteinini kodlayan segment) ve domuzlarda enfeksiyon yapan bir virüsün (HA/H1, NP ve NS proteinini kodlayan segmentler) genomlarının karışmasından oluştuğunu göstermiştir (Cummings ve ark., 2018).

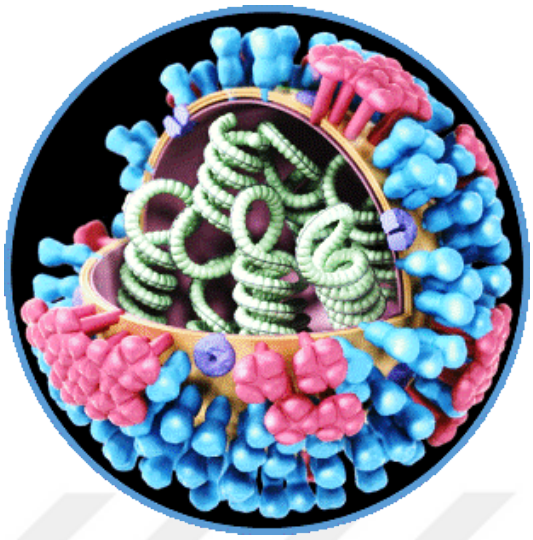
İnfluenza A virüsü kaynaklı mevsimsel salgınlar ve zaman zaman ortaya çıkan pandemiler bu virüslerin hem insanlar için hem de birçok hayvan türü için tekrarlayan ciddi bir küresel tehdit olduğunu göstermektedir. İnfluenza A virüsleri, hayvanlardan

insanlara bulaşan (zoonoz) virüslerin başında gelmektedir. Su kuşları, özellikle ördekler, kıyı kuşları ve martılar influenza virüslerinin doğal rezervuarlardır. Virüsler, kuşların bağırsak epitelinde çoğalır ve dışkılama ile yüksek titrede dışarı atılırlar. Bu da virüslerin farklı türler arasında yayılmasında etkili bir fekal-oral geçiş modeli oluşturur. Göç eden su kuşları, kıtalar arasında virüsü taşırlar ve bu nedenle devam eden virüs evrimi sürecinde önemli bir rol oynarlar. Dolayısıyla influenza kaynaklı salgınlar sürekli olarak yeniden ortaya çıkmaya devam edecektir. İnfluenza salgınlarının insan popülasyonunda neredeyse her yıl tekrarlamasının temel nedenleri, mutasyonlara bağlı olarak viral yüzey glikoproteinlerinin antijenik yapılarında meydana gelen değişmeler ve zaman zaman farklı virüs tiplerine ait genom segmentlerindeki karışmalardır.

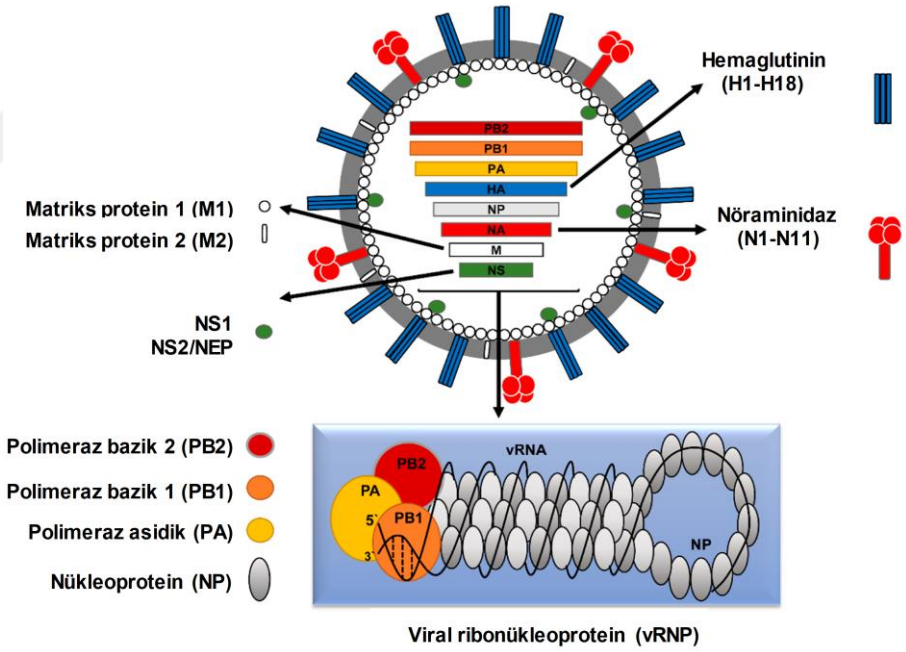
4.1.2. İnfluenza A Moleküler Yapısı ve Genom Organizasyonu

Orthomyxoviridae ailesi içerisinde yer alan İnfluenza A virüsü, negatif polarite gösteren, 8 adet tek iplikli RNA molekülünden oluşan bir genom yapısına sahiptirler. (Apostolov ve Flewett, 1969; Bouvier ve Palese, 2008). Virüs genomunu oluşturan RNA segmenti viral RNA (vRNA) olarak tanımlanır. Her bir vRNA segmenti en az bir protein kodlar. Viral genomu oluşturan en büyük ilk üç RNA segmenti, virüs replikasyonunu ve transkripsiyonunu kataliz eden RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlar (**Şekil 4-2**). Bu alt üniteler polimeraz bazik protein 2 (PB2, segment 1), polimeraz bazik protein 1 (PB1, segment 2) ve polimeraz asidik proteindir (PA, segment 3). İnfluenza A virüslerinin en önemli yüzey antijen proteini olan HA proteini dördüncü vRNA segmenti üzerinden sentez edilir. Viral RNA molekülleri ile kompleks oluşturan NP proteini vRNA segment 5 üzerinden kodlanırken, virüs membranında yer alan ikinci önemli yüzey antijen protein olan NA, segment 6 üzerinden kodlanmaktadır. İnfluenza A virüslerinin son iki küçük RNA segmentleri üzerinden alternatif kırpılma ile ikişer protein sentez edilmektedir. Virüsün 7. segmenti matriks proteinlerini (M1 ve M2), 8.segmenti ise yapısal olmayan proteinleri (NS1 ve NS2 / NEP) kodlamaktadır (Mostafa ve ark., 2018).

A



B



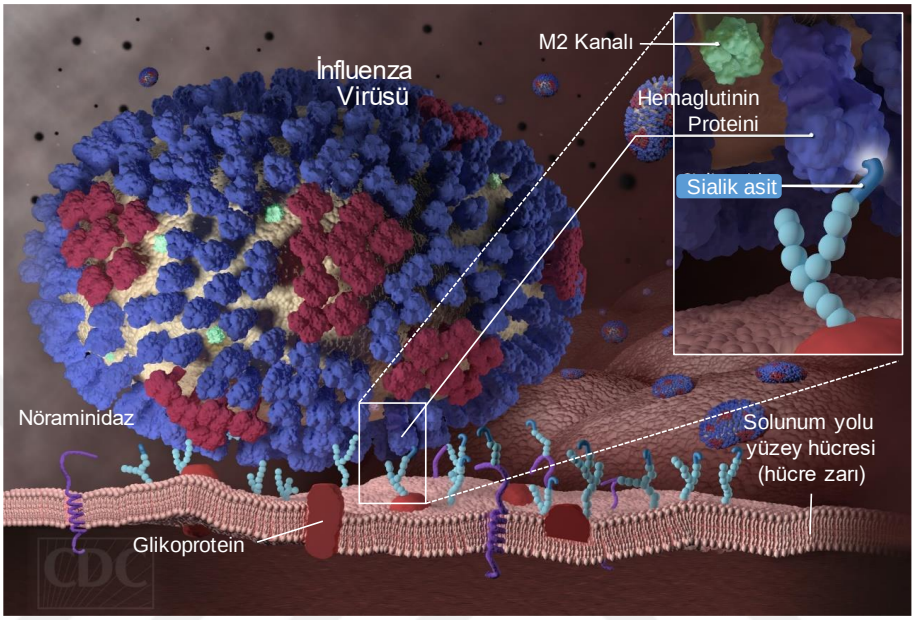
Şekil 4-2 İnfluenza A virüsü moleküler yapısı (A) (https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm: erişim tarihi 18.12.2020) ve genom organizasyonu (B) (Mostafa ve ark., 2018)'den değiştirilerek kullanılmıştır.

İnfluenza virüsleri membranlı virüs olmaları nedeniyle ısı, kuruluk, aşırı pH ve deterjanlar ile kolayca inaktive olurlar (Scholtissek, 1985). Virüs partikülünü çevreleyen dış lipid tabakası, çoğaldığı konak hücre plazma membranından

kaynaklanır (Nayak ve ark., 2009). Viral membranda HA (~% 80), NA (~% 17) ve matriks 2 (M2) proteinleri bulunur. HA ve NA yüzey glikoproteinleri virüs tipine göre oldukça değişkenlik gösterir. Şu ana kadar, HA proteini için 18 alt tipi (H1-H18), NA enzimi için ise 11 (N1-N11) alt tip belirlenmiştir (Tong ve ark., 2012; Short ve ark., 2015; Wille ve Holmes, 2020). HA proteini, viral yüzeyden yaklaşık 13.5 nm çıkıntı yapan ve çubuk benzeri şekle sahip olan bir trimer yapı oluşturur. Enzimatik aktiviteye sahip olan NA proteini ise mantar benzeri bir şekle sahiptir ve bir tetramer yapı oluşturur (Wilson ve ark., 1981; Skehel ve Wiley, 2000). Viral membranda yer alan M2 proteini iyon kanalı aktivitesine sahip olan bir proteindir (Pinto ve ark., 1992; Pielak ve Chou, 2011). Virionlarda en bol bulunan protein olan matriks proteini 1 (M1), lipid tabakasının altında yer alır ve viral ribonükleoproteinin (vRNP) bağlanmasında önemli bir rol oynar. Her bir vRNA segmenti, viral NP'nin çok sayıda kopyası ile kompleks oluştururak viral ribonükleoprotein (vRNP) olarak isimlendirilen yapıları oluşturur. vRNP'ler üzerinde PB2, PB1 ve PA'dan oluşan heterotrimerik viral polimerazın enziminin bir kopyası taşınır (Arranz ve ark., 2012; Moeller ve ark., 2012; Pflug ve ark., 2014). İnfluenza A virüsü RNA polimerazı PB1, PB2 ve PA proteinlerinden oluşan bir komplekstir (Noda ve ark., 2006; Boivin ve ark., 2010). Viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumlu olan RNA polimeraz enzimi, RNA moleküllerinde korunmuş tamamlayıcı 5' ve 3' arasındaki baz eşleşmesi sonucu oluşan sarmal saç tokası bölgesinde vRNA'ların uçları bağlanmış halde bulunur (Hsu ve ark., 1987; Fodor ve ark., 1993; Pflug ve ark., 2014). İnfluenza A virüsü NS1 proteini, enfekte hücrelerde bol miktarda sentez edilirken virüs partikülünde varlığı saptanamamış, yapısal olmayan bir proteindir (Basu ve ark., 2009). Yapısal olmayan bu proteinin faklı işlevleri saptanmış olmakla birlikte en önemli işlevi konak hücrelerin interferon savunma mekanizmasını zayıflatmaktır. NS1 proteini, interferon antagonisti olarak işlev görür (Hale ve ark., 2008; Krug, 2015). Virüs partikülünde az miktarda bulunan NS2 proteini ise M1 proteini ile birlikte vRNP'lerin nükleustan sitoplazmaya taşınmasında rol alır. Bu nedenle NEP (*İng. nuclear export protein*) olarak da adlandırılır (Neumann ve ark., 2000; Kawaoka ve Neumann, 2012; Senbas Akyazi ve ark., 2020).

4.1.3. İnfluenza A Viral Yaşam Döngüsü

İnfluenza A virüsü, hücrelerin yüzeyindeki sialik asitleri viral reseptörler olarak kullanır (Skehel ve Wiley, 2000) (**Şekil 4-3**). Farklı türlerde replike olan influenza virüslerinin hemaglutininleri, sialik asitlerin farklı glikosidik bağlarını tercih eder.



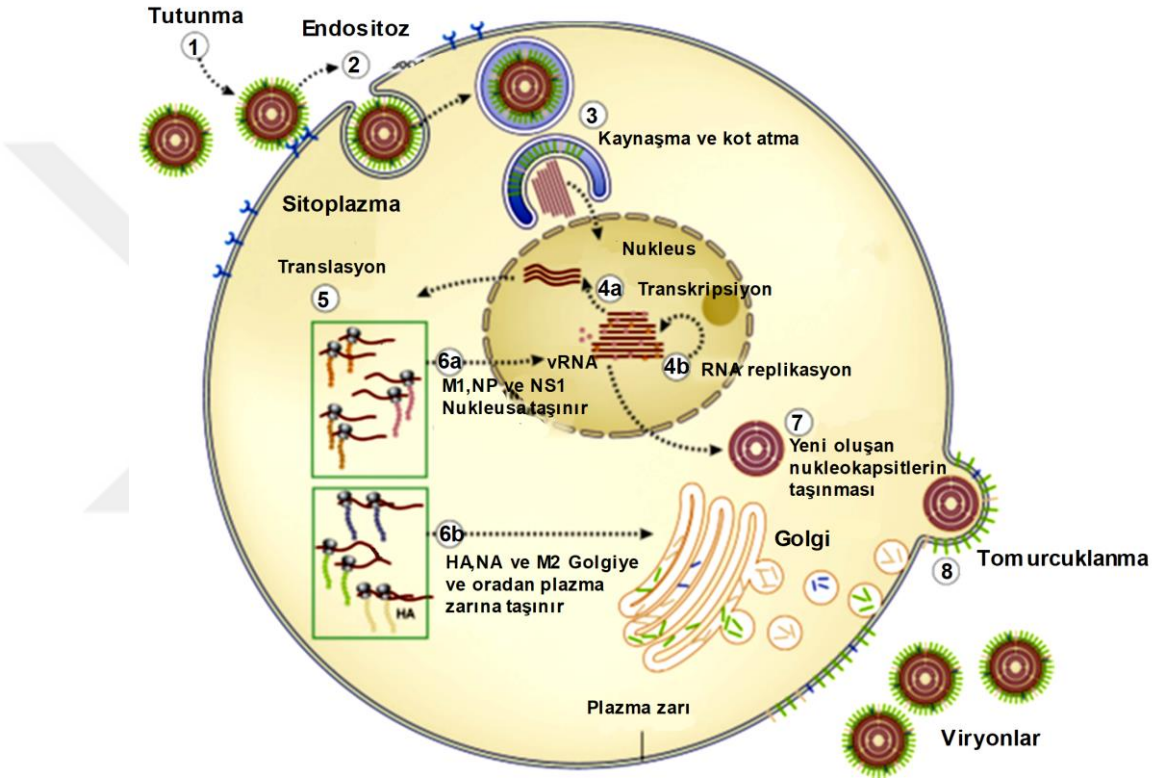
Şekil 4-3 İnfluenza A virüslerinin konak hücre membranında bulunan sialik asit reseptörlerine tutunması. (https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm: erişim tarihi 18.12.2020).

İnsan influenza A virüslerine ait HA proteinleri, α-2,6 glikosidik bağ ile galaktoza bağlanan sialik asit bakiyelerine çok iyi bağlanır. Buna karşın, kuşlarda enfeksiyon yapan virüsler tercihen α-2,3 glikosidik bağ ile galaktoza bağlı sialik asit bakiyelerine tutunur (Matrosovich ve ark., 1997; Wilks ve ark., 2012). İnsanlarda solunum yolu epitel hücrelerinde daha çok α-2,6 glikosidik bağ ile bağlı sialik asit bakiyeleri bulunur. Kuşlarda ise influenza virüslerine hedef olan bağırsak epiteli hücrelerinde α-2,3 glikosidik bağ ile bağlı sialik asit bakiyeleri bulunmaktadır. Bu durum, belirli konak türleri için farklı viral alt tiplerin tercihini açıklar, ancak bunun reseptör için bir tercih olduğu ve mutlak özgüllük olmadığı belirtilmelidir. Terminal α-2,3-bağlarına sahip sialik asitler, insan solunum yolu epitel hücrelerinde de bulunur, ancak α-2,6 bağlı olanlardan daha az miktardadır (Couceiro ve ark., 1993; Matrosovich ve ark., 2004). Sonuç olarak, insanlar ve diğer primatlar kuş tipi influenza virüsleri ile enfekte

olabilir, ancak genel olarak insan suşlarından daha az etkilidirler (Murphy ve ark., 1982; Tian ve ark., 1985; Beare ve Webster, 1991; Lipatov ve ark., 2004; Kumar ve ark., 2018). Memeli solunum yolu epitel hücrelerinde sialik asitlerin farklı ekspresyonu, kuş tipi influenza virüslerinin memelilerde düşük düzeyde bulaşabilir olması fakat yüksek patojenite göstermesini açıklamaya yardımcı olabilir. İnsanlarda, α-2,3'e bağlı sialik asit taşıyan glikoproteinler, genel olarak daha az bulunmakla birlikte, daha çok alt solunum yolunda (bronşioller ve alveoller) yaygındır. Akciğerler, üst solunum yolu (nazofarenks, paranazal sinüsler, trakea ve bronşlar) kadar havadaki virüs partikülleri için erişilebilir değildir. Bu nedenle insanlarda kuş tipi influenza virüsü enfeksiyonu nispeten nadirdir. Bununla birlikte, kuş tipi influenza virüs türleri insan akciğerini enfekte ettiğinde, şiddetli ve hızla ilerleyen bir pnömoni ortaya çıkabilir; bu da klinik ortamda % 60 oranında ölümle sonuçlanan olaylara sebep olmaktadır (Gambotto ve ark., 2008).

İnfluenza virüsü HA proteinleri ile sialik aside bağlandıktan sonra hücre içerisine alınır. Bu olayda ana mekanizma, klatrin aracılı endositozdur (Lakadamyali ve ark., 2004; Grove ve Marsh, 2011). Virüs partikülünü içinde bulunduran endozomal ortamın asiditesi, influenza virüsü vRNP'lerin endozomdan kurtulması için çok önemlidir. Düşük pH ortamı, HA proteininde konformasyonel bir değişikliği tetikler ve proteaz enzimlerinin etkinliğini arttırarak HA'nın yapısını önemli ölçüde değiştirir. Sonuç olarak, HA proteini disülfid bağları ile birbirine bağlanan HA1 ve HA2 alt birimlerine kesilir. Bu şekilde aktive olmuş HA proteinide, HA2 alt birimi virüs membranının endozom membranları ile kaynaşmasına aracılık eder (Steinhauer, 1999). Viral membranın endozomal membran ile kaynaşmasına aracılık eden HA2, vRNP'lerin konak hücre sitoplazmasına geçişini sağlayan bir gözenek açar (Stegmann, 2000; Sieczkarski ve Whittaker, 2005). HA proteini dışında virüs membranında yer alan M2 iyon kanalı proteini de genetik materyalin viriondan salınmasında önemli rol oynar. Endozomdaki hidrojen iyonları, M2 iyon kanalı aracılığıyla virüs partikülüne pompalanır. Sonuç olarak, ribonükleoprotein ile matriks M1 proteini arasındaki etkileşim büyük ölçüde zayıflar (Martin ve Helenius, 1991; Pinto ve Lamb, 2006; Wang ve ark., 2011b). Bu nedenle, M2 kanal proteinleri, iyon kanalı aktivitesini bloke eden adamantan türevi antiviral ilaçların hedefidir (Pinto ve ark., 1992; Wharton ve ark., 1994). Diğer taraftan, membrana bağlı bir protein olması nedeniyle M2

proteinlerinin aşı bileşeni olarak kullanılması da önerilmiştir (Slepushkin ve ark., 1995; Neirynck ve ark., 1999). İnfluenza virionunun M2 kanalı yoluyla asidifikasyonu, protein-protein etkileşimlerini bozarak vRNP'lerin viral matriksten hücresel sitoplazmaya salınmasına izin verir (Martin ve Helenius, 1991). Bu süreçlerin bir sonucu olarak, bir ribonükleoprotein kompleksi şeklindeki genetik materyali olan virion içeriği, hücrenin sitoplazmasına salınır (Stegmann, 2000; Sieczkarski ve Whittaker, 2005) (Şekil 4-4).



Şekil 4-4 İnfluenza A Viral Yaşam Döngüsü. (Payne, 2017)'den değiştirilerek kullanılmıştır.

İnfluenza virüslerinin RNA sentezi konak hücre nükleusunda gerçekleşir. Virüsün genomik segmentleri hiçbir zaman çıplak RNA olarak bulunmaz. Viral RNA, NP proteini ile birlikte kompleks halindedir. İnfluenza virüsü vRNP'leri, nükleer gözeneklerden pasif olarak geçemezler, bu nedenle nükleer taşınma olayında hücresel nükleo-sitoplazmik taşınma mekanizmaları kullanılır. Bu mekanizmanın bileşenleri olan α-importinler ailesine ait proteinler, NP proteini üzerindeki nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) tanır ve RNA komplekslerinin taşınmasında önemli bir rol üstlenirler (Cros ve Palese, 2003; Wu ve Pante, 2009; Senbas Akyazi ve ark., 2020).

Nükleusa girdikten sonra, negatif polariteye sahip tek iplikli genomik RNA (vRNA) molekülleri üzerinden pozitif polariteye sahip iki farklı tipte RNA molekülü sentez edilir. Bunlardan bir grup RNA molekülleri viral proteinlerin sentezinde kullanılacak olan haberci RNA'lardır (mRNA). Diğer RNA molekülleri ise vRNA'ların tam uzunlukta tamamlayıcı kopyalarıdır (cRNA'lar). Viral mRNA'lar, şablon olarak kullanılan vRNA'ların tam boyutta kopyaları değildir; hem 5′-ucundaki 7-metil guanozin şapka (m7G) (Cap) yapısı hem de 3′-ucunda poli-A yapısı eklenmiş haldedir. Viral genlerin transkripsiyon sırasında influenza virüsü RNA polimeraz enzimi, konak hücre RNA polimeraz II enzimi ile etkileşime girer (Engelhardt ve ark., 2005). Bu etkileşim, viral RNA polimeraz enzimi tarafından yeni sentez edilmekte olan hücresel mRNA'ların 5'-ucunda bulunan 7-metil guanozin şapka (CAP) yapısının kesilerek alınması (*İng. CAP snatching*) ile sonuçlanır (Bouloy ve ark., 1979; Plotch ve ark., 1979; Bouloy ve ark., 1980; Krug, 1981; Dias ve ark., 2009). Bu olayda viral polimeraz enzimi PB2 alt birimi, CAP yapısına bağlanmasından sorumludur. Uzun bir süre viral polimeraz enziminin PB1 alt birimi, transkripsiyonun başlatılması için bir primer görevi gören 5'-CAP yapısını taşıyan kısa oligonükleotidi (10-13 nükleotit uzunluğunda) kesen bir endonükleaz olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, yapılan deneysel çalışmalar, viral RNA polimeraz enziminin PA alt ünitesinin endonükleaz aktivitesine sahip olduğunu göstermiş ve 5'-CAP yapısının kesilmesinden bu alt birimin sorumlu olduğu fikri ağırlık kazanmıştır (Boivin ve ark., 2010). Viral mRNA sentezinden vRNA'nın tam uzunluktaki tamamlayıcı kopyasının (cRNA) sentezine geçiş, birçok laboratuvar tarafından yoğun bir şekilde çalışılmıştır. Tam uzunlukta cRNA sentezinin başlatılması için, primere gereksinim duyulmaz ve cRNA zincirlerine poli-A kuyrukları eklenmez. Viral RNA'ların replikasyonunda RNA sentezinin birinden diğerine geçiş mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Bunun için bazı teoriler önerilmiştir (Gonzalez ve Ortin, 1999). Viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinin replikasyon olayında transkripsiyon olayından farklı davrandıkları açıktır. Bununla birlikte yeni sentez edilen çözünür forma NP proteininin ve bazı konak proteinlerin de bu süreçte önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür (Momose ve ark., 2002). İnfluenza virüsü genom segmentlerinin replikasyonunun bir sonraki adımı, cRNA'ların şablon olarak kullanılması ve bunun üzerinden vRNA'ların sentez edilmesidir. Bu süreç sonucunda, NP ve RNA polimeraz alt birimleri ile birleşmiş

halde tam uzunlukta RNP kompleksleri ortaya çıkar. Oluşan yeni vRNP'lerin tekrar sitoplazmaya taşınmasında, bazı konak hücre proteinleri ile birlikte virüse ait M1 ve NEP/NS2 proteinleri işlev görürler. M1 proteinin hem vRNA hem de NP ile etkileşim gösterdiği bilinmektedir ve bu nedenle bu iki bileşeni vRNP kompleksi içinde bir araya getirdiği düşünülmektedir. Buna ek olarak M1 proteini, nükleoporinler aracılığıyla sitoplazmaya M1-RNP taşınmasına aracılık eden nükleer eksport proteini NEP ile de ilişkilidir (Cros ve Palese, 2003; Senbas Akyazi ve ark., 2020).

İnfluenza virüsü replikasyonunun en önemli aşamalarından biri de kurulma aşamasıdır. Viral bileşenlerin bir araya gelmesinin tercihen konak hücre membranında lipid sallarında (raft) gerçekleştiği varsayılmaktadır (Zhang ve ark., 2000; Takeda ve ark., 2003; Leser ve Lamb, 2005). Lipid salları, plazma membranlarında bulunan, sfingolipidler açısından zengin, iyonik olmayan lipid yapılardır. İnfluenza virüsünün konak hücre membranındaki bu birleşme bölgesi, saflaştırılmış viral partiküllerin lipit içeriğinin incelenmesinin sonuçlarıyla desteklenmektedir. Ek olarak, HA ve NA glikoproteinleri, lipit sallarına dahil edilir (Kundu ve ark., 1996; Scheiffele ve ark., 1997; Nayak ve ark., 2004). Lipid sallarına yönlendirilmeden önce, bu iki protein translasyon sonrası glikozillenerek modifiye edilir. Glikozilasyon endoplazmik retikulumda ve Golgi komplekslerinde gerçekleştirilir. endoplazmik retikulumda bu proteinlerin doğru şekilde katlanması ve glikozile olması sağlanır. Buna ek olarak HA ve NA proteinlerinin oligomerler halinde bir araya gelmesi endoplazmik retikulumda gerçekleşir. HA proteinleri, trimerik formda bir araya gelirken, NA proteinleri ise tetramerler halinde bir araya gelirler. Bu proteinlerin glikan zincirlerinin modifikasyonları ve bunların yağ asitleri ile esterleştirilmesi Golgi aygıtında meydana gelir (Veit ve ark., 1991). Bu glikoproteinlerin lipid salları ile ilişkisine yönelik işaretler, transmembran bölgelerinde bulunur (Barman ve ark., 2001). vRNP'ler muhtemelen apikal plazma membranında diğer yapısal proteinlerden bağımsız olarak birleşme bölgesine taşınır. Chou ve arkadaşları (Chou ve ark., 2013), FISH analizine dayanarak verilerden yola çıkarak, endozomal protein Rab11 tarafından kolaylaştırılan, sitoplazmada sekiz viral segmentin bir araya geldiği sonucuna varmışlardır. Sekiz segmentin tümü, plazma membran bağlanma bölgelerine ulaşmadan önce muhtemelen bir süper kompleks oluşturur. vRNP'lerin sekiz farklı RNA segmentinin virion halinde paketlenmesi, pek çok model önerilmesine rağmen,

tam olarak anlaşılabilmiş değildir (Smith ve Hay, 1982; Enami ve ark., 1991; Bancroft ve Parslow, 2002). Bazı araştırmacılar genomik segmentlerin her iki ucunda da paketleme sinyallerinin varlığına işaret etmektedir, ancak spesifik paketlemeden sorumlu kesin diziler veya yapılar hala iyi tanımlanmamıştır.

İnfluenza virüsü NA ve HA yüzey antijen proteinlerinin her ikisi de hücre membranlarında yer alan sialik asitlere afiniteye sahiptir. Buna karşın bu iki protein virüsün hücrelerden serbestleşmesinde ters etkiye sahiptirler. HA proteini sialik asit içeren reseptörlerle etkileşiminden dolayı virüsü hücre membranına tutturur. Bu nedenle yeni oluşan virüsünlerin konak hücrelerinden ayrılabilmesi için NA enziminin sialik asit bakiyelerinde kesme yapması gerekir. Dolayısıyla influenza virüslerinin etkin bir şekilde çoğalabilmeleri için bu iki glikoproteinin aktiviteleri arasında bir denge olmalıdır.

Bir influenza A virüs partikülünün enfeksiyon yapabilir olabilmesi için virüsün sekiz RNA segmentinin tümünün yapıda bulunması gerekir (Bouvier ve Palese, 2008). Viral RNA segmentlerinin virionlar halinde paketlenme mekanizmalarını açıklamak için iki model önerilmiştir. Bunlar; rastgele birleştirme modeli ve spesifik birleştirme modelidir (Fujii ve ark., 2003; Samji, 2009). Rastgele birleştirme modelinde viral segmentlerin paketlenmesinin rastgele gerçekleştiğini ve yalnızca sekiz segmentin hepsinin mevcut olduğu virionların enfeksiyon yapabilen partiküller haline gelebileceğini ileri sürmektedir (Bancroft ve Parslow, 2002). Öte yandan, spesifik birleştirme modelinde ise sekiz bileşenin hepsinin tek bir virionda paketlenmesini sağlayan viral RNA segmentlerinin her birinde farklı sinyallerin varlığı ileri sürülmektedir (Fujii ve ark., 2003).

İnfluenza A virüsünün artık hücre yüzeyine taşınması veya konakçı hücreden salınması veya tomurcuklanması gerekir. Tomurcuklanma oluşması için, trans-golgi ağı (TGN), kaplama proteini I (COPI) kompleksi ve GTPaz Rab8 ile birlikte, yeni sentezlenmiş HA, NA ve M2 proteinlerini apikal plazma membranına aktarır (Konig ve ark., 2010; Amorim ve ark., 2011). Plazma membranında, membrana gömülü NA, HA ve M2 proteinleri bir virion oluşturmak için viral RNA segmentleri ile birleşir ve M1 ve M2 proteinleri son kapanmaya ve tomurcuklanmaya aracılık eder (Pornillos ve ark., 2002; Nayak ve ark., 2004; Rossman ve Lamb, 2011). Ek olarak NA enzimi

konak hücre membranında bulunan ve virüsün konak hücreden ayrılmasını zorlaştıran sialik asit bakiyelerini keserek virüs partiküllerinin serbest kalmasını sağlar (Payne, 2017).

4.1.4. İnfluenza A Antijenik Yapı Değişiklikleri

RNA genomu taşıyan virüsler, DNA virüslerine oranla genetik özelliklerini çok daha hızlı değiştirirler. Bunun en önemli nedenlerinden biri RNA virüslerinde, replikasyon olayını kataliz eden RNA bağımlı RNA polimeraz enzimlerinin sentez sırasında ortaya çıkan hataları düzeltme yeteneklerinin olmamasıdır (Crotty ve ark., 2001; Elena ve Sanjuan, 2005). Buna ek olarak influenza gibi çok parçalı genom yaşıyan RNA virüslerinde konak hücrelerin aynı anda farklı virüs tipleri ile enfekte olmaları durumunda genom segmentlerinde görülen karışmalar genetik değişkenliği arttırmaktadır (Shao ve ark., 2017). Bu yönüyle ele alındığında parçalı genom yapısına sahip olan influenza virüslerinde görülen genetik çeşitlilik iki farklı mekanizma ile açıklanabilir. Bunlar; viral RNA polimeraz enziminin hatalı sentez yapması ve hataları düzeltme yeteneğinin olmamasından kaynaklanan değişikliklerdir. Bu değişikler antijenik kayma olarak tanımlanır. İkincisi ise aynı anda enfeksiyon yapan iki farklı virüs tipine ait genomların karışması ve farklı kombinasyonlarda genom segmentleri taşıyan yeni virüs tiplerinin ortaya çıkmasıdır (*İng. reassortment*). Bu tip genetik değişmeler antijenik sapma olarak isimlendirilir (Reid ve Taubenberger, 2003; Suarez ve ark., 2004; Taubenberger ve Kash, 2010; Wille ve Holmes, 2020).

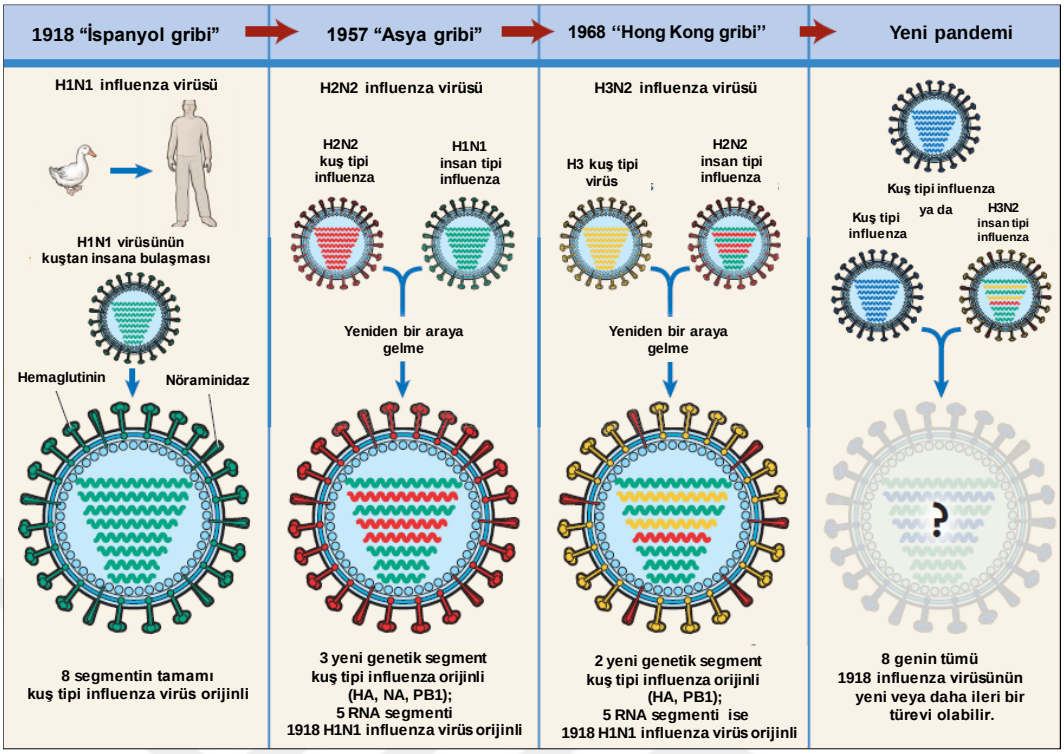
RNA polimeraz enzimlerinin DNA polimerazlara göre hatalı sentez yapma frekansları yüksektir. Buna bir de oluşan hataların düzeltilememesi durumu eklendiğinde RNA virüslerinde genetik çeşitlilik daha da artmaktadır. Her replikasyon döngüsünde, kopyalanan genom başına birden fazla nükleotid değişikliğe uğrayabilir. Nokta mutasyonu olarak tanımlanabilecek bu değişmeler virüsün aktivitesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmayacağı gibi, virüsün tamamen inaktif olmasında ya da daha agresif davranmasına neden olabilir. İnfluenza A virüslerinde meydana gelen bu değişmeler pozitif seleksiyona bağlı olarak özellikle virüsü membranında lokalize olan HA ve NA glikoproteinlerinde birikmesine ve antijenik yapıda kaymaya neden olabilir (**Şekil 4.5**). Antijenik kayma, yani bu iki proteinin antijenik özelliklerinde meydana gelen kademeli değişiklikler sonucu ortaya çıkan yeni virüs varyantlarına karşı daha

önce vücudumuz tarafından geliştirilen bağışıklığın etkisiz kalmasına neden olur ve bu da gribal enfeksiyonların tekrarlaması ile sonuçlanır. Ortaya çıkan bu varyantlar genellikle birkaç yıl boyunca insan veya hayvan popülasyonlarında salgınlara neden olur ve daha sonra yeni antijenik varyantlara dönüşürler. Bu tip genetik farklılaşmalar daha çok hemaglutinin ve nöraminidaz için belirgin olsa da, açıkçası viral RNA polimeraz enzimi kaynaklı olduğu için diğer genler de aynı oranda değişiklikler meydana gelir.



Şekil 4-5 İnfluenza A virüslerinde, viral RNA polimeraz enzimi kaynaklı nokta mutasyonlarının neden olduğu antijenik değişmeler (antijenik kaymalar).

Farklı virüs tipleri ile aynı zamanda gerçekleşen enfeksiyonlar İnfluenza A virüsü genomu içeriğindeki çok daha ani değişikliklere, genlerin farklı kombinasyonlarda yeniden bir araya gelmelerine neden olur. Antijenik sapma olarak tanımlanan bu olaylar geçmişte ortaya çıkan İnfluenza A virüsü pandemilerinin de temel nedenini oluşturmaktadır (**Şekil 4.6**).



Şekil 4-6 İnfluenza A virüslerinde birlikte enfeksiyon sonucunda viral genlerin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi ve pandemilere neden olan yeni virüs tiplerinin ortaya çıkması (antijenik sapmalar)(Belshe, 2005)'den değiştirilerek kullanılmıştır.

Bu olay, bir hücrenin influenza A virüsünün iki farklı genomik varyantı ile enfekte olduğunda viral gen segmentlerinin karışması ile yeni bir gen kombinasyonun oluşması olarak tanımlanabilir. Pandemiye neden olan yeni virüs tiplerinin ortaya çıkması genellikle farklı kökenlerden virüs tipleri ile enfekte olabilen hayvan türlerinde gerçekleşir. Örneğin kuş ve insan virüs tipleri ile enfekte olan konak organizmalarda genetik yapısı büyük oranda değişmiş insanlar için patojenitesi yüksek yeni virüs tiplerinin ortaya çıkma olasılığı çok yüksektir. Bu gibi durumlarda çoğu zaman domuzlar ara konak işlevi görürler.

4.2. İnfluenza Virüsleri ve Konak Hücre İlişkisi

Genel olarak virüslerin tüm metabolik olaylar bakımından konak hücre mekanizmalarına bağımlı olmaları, virüs ile konak organizma arasında zaman zaman örtüşen ama çoğunlukla birbirini negatif yönde etkileyen sıkı bir etkileşim içerinde olmalarını zorunlu hale getir. Virüsler var olabilmek için konak hücrenin tüm zayıf noktalarından yararlanırken, konak organizmalar da virüslere karşı çeşitli savunma

mekanizmalarını harekete geçirirler. İnfluenza A virüsleri, yukarıda da değinildiği gibi antijenik kayma ve antijenik sapmalar sonucunda genetik yapısında meydana gelen mutasyonlar ve buna bağlı olarak ortaya çıkan antijenik özelliklerdeki değişmeler sonucunda gerek insan gerekse diğer konak türlerinde varlıklarını sürdürmektedirler. İnfluenza A enfeksiyonlarında vücudumuzda adaptif immün yanıt enfeksiyondan yaklaşık 5 gün sonra harekete geçer. Bu nedenle, yeni influenza A virüs suşları ile enfeksiyondan sonraki ilk 5 gün viral replikasyonu kontrolu bakımından doğal bağışıklık sistemimiz büyük önem taşırmaktadır. İnfluenza A virüsleri, bağışıklık sistemi zayıflamış ya da virüse karşı bağışık olmayan bireylerden oluşan popülasyonlarda önemli morbidite ve mortaliteye neden olurlar (Plans-Rubio, 2007; Taubenberger ve Morens, 2008).

İnfluenza A virüsülerine karşı doğuştan gelen bağışıklık mekanizmalarını anlamak, bazı viral suşların neden daha ağır seyreden enfeksiyonlara neden olduğunu ve bazı insanların bu virüslere karşı neden daha savunmasız olduğunu anlamamıza yardımcı olur. Doğuştan gelen bağışıklık, etkili olması için belirli bir patojene önceden maruz kalmayı gerektirmeksizin, genetik yapıdan kaynaklanan korunma mekanizmalarını ifade eder. Bu, doğuştan gelen ve sonradan kazanılan (edinsel) bağışıklık mekanizmalarını birbirinden ayırır. Doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları çoğunlukla yeni patojenlere karşı konak savunmasının ilk hattı olarak işlev görür. Doğuştan gelen bağışıklık, patojenleri sağlıklı hücrelerden veya kommensal organizmalardan geniş ölçüde ayıran patojenle ilişkili modellerin tanınmasına dayanır. Doğuştan gelen bağışıklık mekanizmaları ilk konak savunma hattını oluşturmanın yanı sıra, etkili edinsel bağışıklık mekanizmalarının gelişmesinin de yolunu açar. Yaşam için çok önemli olan doğuştan gelen bağışıklık sisteminin işlevleri, mikroorganizmaların veya doku hasarının varlığını özel reseptörler aracılığıyla tespit etme kabiliyetine dayanır. Doğuştan gelen korunma mekanizmaları, konağın enfeksiyon sırasında erken dönemde viral replikasyonu önlemek veya yavaşlatmak için kullanabileceği en önemli silahtır, çünkü influenza (enfekte eden viral suşun mutasyonlarının bir sonucu olarak) koruyucu antikorlardan yoksun kişileri seçici olarak etkiler (Krammer ve ark., 2018). Özel T lenfositleri ve antikorları üreterek adaptatif bağışıklık oluşturmak için, virüse maruz kaldıktan sonra en az 5 gün geçmesi gereklidir (Hermans ve ark., 2018). Bu ilk birkaç gün, hastalığın ilerlemesinde kritik

öneme sahiptir ve patojenin varlığını hemen tespit edebilen bir sistem olmadan, virüs üst solunum yolundaki ilk odak noktasından alt solunum yollarına ve daha derin dokulara yayılır ve böylece solunum fonksiyonlarına doğrudan zarar vererek konağın hayatını tehdit eder. Sadece ani savunma tepkileri oluşturmak için değil, aynı zamanda antikorların ve T hücrelerinin sonraki üretimini tetiklemek için güçlü bir doğuştan gelen bağışıklık yanıtına ihtiyaç vardır. Hipervirülans suşlar, üst solunum yollarında konak savunmasının üstesinden gelebilir ve alveolar boşluğa ulaşabilir, burada inflamatuar reaksiyonlar alveolar yüzey gerilimini bozarak sıvı birikimine ve solunum yetmezliğine neden olabilir. Birincil influenza virüsü pnömonisi olarak ortaya çıkan klinik durum, akut solunum yolu yetersizlik sendromunun klinik, radyolojik ve patolojik özelliklerini gösterebilir (Short ve ark., 2014).

4.3. İnfluenza A Virüsü Enfeksiyonlarda İmmunite

İnfluenza A virüsü enfeksiyonları sırasında ortaya çıkan doğal immün yanıt, sırayla virionlar ve mukozal sekresyonlar arasındaki etkileşimleri, epitel hücrelerin enfeksiyonunu ve epitelyal veya alt epitel katmanlarında bulunan diğer yerleşik hücre tiplerinin aktivasyonunu içerdiği şeklinde tanımlanabilir. Bunlar "doğuştan" lenfoid hücreleri, yerleşik makrofajları (alveolar makrofajlar dahil) ve dendritik hücreleri içerir. Daha sonraki aşamalarda, polimorfonükleer lökositler ve monositler gibi diğer hücre tipleri, enfeksiyon bölgelerine kanalize olarak devreye girerler. Bu hücre tiplerinin her biri, virüsün varlığını algılayabilen ve spesifik savunma işlevlerini etkinleştirebilen farklı bir reseptör seti içerir. Ayrıca reseptörler, stratejik olarak hücre zarı, endozomal sistem, sitozol ve mitokondri gibi çeşitli hücre organellerinde bulunur. Bu nedenle, influenza ya da diğer mikroorganizaların sebep olduğu enfeksiyon durumlarında, doğuştan gelen yanıtlar uygun şekilde her biri farklı hücre tipleri, reseptörler, efektör moleküller ve hücre içi organelleri içeren kısımlara bölünebilir (Medzhitov, 2007).

İnfluenza enfeksiyonu ile ilgili doğuştan gelen bağışıklık yanıtının bileşenleri şunları içerir: 1) çözünebilir hücre dışı proteinler ve mevcut vücut sıvıları; 2) interferon sistemi; 3) doğuştan gelen yanıtı düzenleyebilen farklı sitokinler ve kemokinler; 4) makrofajlar ve nötrofiller tarafından fagositoz; 5) dendritik hücreler tarafından antijen sunumu. İnfluenza A virüslerinin etkin enfeksiyon yapabilmeleri ve varlıklarının

sürdürebilmeleri içi konak organizmanın bu korunma mekanizmalarını aşmaları gerekmektedir. Bunun için influenza virüsleri enfeksiyon sırasında konak organizmalar ile gerek hücre dışında gerekse hücre içerisinde sıkı bir etkileşim içerisine girer. Özellikle hücre içerisinde, viral enfeksiyon ile devreye giren interferon ile ilişkili savunma mekanizmaları virüslerin aşmaları gereken çok önemli bir bariyerdir.

Bu tez çalışmasında da influenza A virüsleri ile konak hücre interferon savunma mekanizmaları arasındaki ilişkiye ışık tutacak verilerin elde edilmesi amaçlanmıştır.

4.4. İnterferonlar

İnterferonlar, viral ya da bakteriyel patojenleri ortadan kaldırmaya yardımcı olan, bağışıklık sisteminin koruyucu mekanizmalarını tetikleyen ve hücreler arasında iletişimi sağlayan sitokinlerin bir grubu olan sinyal proteinleridir (Stark, 2007; Pitini ve ark., 2010). Sitokinler doğal ve adaptif immunitede rol alan ve hücrelerin immun fonksiyonlarını düzenleyen küçük molekül ağırlıklı proteinlerdir. Antiviral özellikleriyle öne çıkan interferonlar, sitokinlerin doğal immuniteye aracılık eden grubunda yer alır. Virüs ile enfekte bir hücre, interferonları salgılayarak yakınındaki hücrelerin antiviral savunmalarını artırmasına neden olur. İnterferonların ayrıca çeşitli başka işlevleri vardır: doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerini de aktive ederler; majör doku uygunluk kompleksi (*İng. Major histocompatibility complex :* MHC) ekspresyonunu artırarak antijen sunumunu düzenler ve konak savunmasını güçlendirir.

Hücresel düzeyde interferon çalışırken cevaplanması gereken birçok soru vardır. İnterferonlar hücre reseptörüne bağlandıktan ve bir antiviral yanıtı tetikledikten sonra neler olur? Bu yanıt virüs üretimini nasıl engeller? İnterferonlar arasında farklılıklar var mıdır? Virüs, interferon tepkisinin üstesinden gelmek için yöntemler geliştirir mi? gibi sorular bilim insanlarını meşgul eden önemli sorulardır.

4.4.1. İnterferonların Keşfi

Bilim dünyasındaki diğer birçok önemli keşifte olduğu gibi, interferonlar da farklı bir hipotezi kanıtlamaya yönelik yapılan çalışmalar sırasında tesadüfen keşfedilmiştir. 1957'de Alick Isaacs ve Jean Lindenmann, bir virüsün başka bir virüsün

replikasyonunu engelleme yeteneği olan "viral engelleme" (*İng. interference*) olgusunu aydınlatmak için çalışmalar yapmıştır (Isaacs ve Lindenmann, 1957). İnterferens (engelleme) basit olarak, organizmaya giren aynı veya farklı tür virüslerin bağışıklık sisteminden ayrı olarak birbirlerini tamamen veya kısmen engellemesi şeklinde açıklanmaktadır. Bu araştırmacılar deneylerinde sıcaklık veya UV ile inaktive edilmiş influenza virüsleri ve 10 günlük tavuk yumurtasından kesilmiş koryoallantoik zar parçalarından yararlanmışlardır. On günlük tavuk embriyolarından alınan koryoallantoik membranları, ısı veya UV ile inaktive edilmiş influenza virüsü ile enfekte ettiklerinde, sonraki viral replikasyonu engelleyen moleküllerin varlığını saptamışlardır. Standart biyokimyasal teknikler kullanılarak yaptıkları analizler sonucunda bu moleküllerin protein yapıda olduklarını tespit edilmişlerdir. Araştırmacılar tarafından influenza virüsü replikasyonunu engelleyen bu madde "interferon" olarak adlandırılmıştır (Isaacs ve Lindenmann, 1957; Isaacs ve ark., 1957). Aslında interferonlar 1954 yılında, Alick Isaacs ve Jean Lindenmann'ın araştırmalarından bağımsız çalışmalar yürüten Japonya'daki bir grup araştırmacı tarafından "virüs inhibe edici faktör" olarak keşfedilmiştir (Nagano ve Kojima, 1954). Bu çalışmada tavşanlara, UV ile inaktive edilen virüsler enjekte edilmiş ve ardından da tavşanlara farklı zamanlarda canlı virüs enjekte edilmiştir. Daha sonra "Engelleyici Faktör" (IF) adını veridikleri maddeyi izole etmişleridir. Yapılan bu çalışmalar, Japonya Viral Araştırma Derneği'nin 1956 Yıllık Toplantısında ve daha sonra 1957'de yapılan Japonya-Fransa Biyoloji Topluluğu toplantısında sunulmuştur (Ozato ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar, şaşırtıcı bir şekilde, interferonların sadece influenza virüslerine özgü olmadığını, diğer virüslerin de interferonlar ile inhibe olduğunu göstermiştir (Nagano ve ark., 1954). İnterferonun çok geniş bir inhibisyon aralığına sahip ajan olması, interferonun, tıpkı yeni keşfedilen antibiyotikler gibi genel bir antiviral ajan olarak kullanılabileceği düşüncesini doğurmuştur. Buna karşın daha sonra yapılan çalışmalar sonunda interferonların, bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler gibi rutin olarak kullanılamayacak kadar toksik olduğu saptanmıştır.

İnterferonların hücre üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanması, hücre içerinde çok sayıda biyokimyasal reaksiyonu tetikler ve virüs replikasyonunu veya olgunlaşmasını zorlaştırır. İnterferonlar aynı zamanda hücrelerden daha fazla interferon ve diğer

sitokinlerin sentezlenmesine neden olurlar. İnterferon etki mekanizmaları oldukça karmaşıktır. İnterferon sisteminin karmaşıklığı, DNA mikrodizi analizleri ile yeniden teyit edilmiştir. DNA mikrodizi analizleri, hücrelerde veya bir organizmanın farklı dokularında ilaç ve benzeri uygulamalardan sonra genlerin transkript (mRNA) düzeylerinde meydana gelen değişiklikleri belirlemede kullanılan tekniklerdir. Örneğin kontrol hücrelerine göre farmasötik bir ajanla işlem gören hücrelerin veya normal bir hücreler ile kanserli hücrelerin gen ekspresyon düzeylerini karşılaştırılma olanağı sunar. Hücrelerin interferon ile tedavisini takiben, her interferon tipi için örtüşen spektrumlar oluşturarak yüzlerce genin indüklendiği görülmüştür (de Veer ve ark., 2001; Taylor ve ark., 2004). Buna karşın uygulamada birçok gen de baskılanmıştır. Gen ekspresyonundaki değişikliklerin çoğu insanlarda geçicidir. Bu genlerin çoğu, interferon aktivitesinin markörleri olarak iyi tanınmaktadır, ancak bunların virüse tepkiyi düzenlemedeki işlevlerini ayırt etmek zordur.

Tüm bu çalışmaların ışığında, interferonların aslında bir hücre tarafından üretilerek yakınındaki hücrelere yayılan ve etki eden, böylece bağışıklık tepkisinin mekanizmasını yönlendiren sitokin ailesinin parçası olduğu anlaşılmıştır. İnterferonlar birçok sitokini indükler ve bu da diğer birçok genin karmaşık etkileşimler dizisi oluşturmasına neden olur.

4.4.2. İnterferonların Sınıflandırılması

İnterferonlar viral enfeksiyonu inhibe etme yetenekleriyle karakterize edilen, yapısal ve işlevsel olarak birbirleri ile ilişkili geniş bir protein ailesidir (Lengyel, 1982; Tyring, 1995). İnsanda fibroblastlar ve lökositler tarafından üretilen interferonların antijenik olarak farklılıklar göstermesi, bunların bir protein ailesi olduğu fikrini doğurmuştur (Havell ve ark., 1975). Günümüzde, interferonların fonksiyonları oldukça iyi bilinmektedir. İnterferonlar, antiviral aktivite, anti-proliferatif aktivite, sitotoksik T hücrelerinin uyarılması ve immün yanıtın modülasyonu gibi işlevlere sahiptirler (Pestka, 2007). İnterferonlar sinyal iletiminde kullandıkları reseptör türüne bağlı olarak, üç ana grup altında toplanmıştır (Tablo 4-2). Bunlar Tip I interferonlar (IFNα, IFNβ, IFNω, IFNε, IFNδ, IFNκ, IFNτ, IFNζ), Tip II interferonlar (IFNγ) ve Tip III interferonlardır (IFNλ), IL28 ve 29 olarak da bilinir (Pestka ve ark., 2004a; Pestka ve ark., 2004b; Uze ve ark., 2007).

Tablo 4-2 İnterferonlar ve Reseptörleri

Tip	Alt tipler	Reseptörler
Tip I	IFN-α (13 alt tip) IFN-β, IFN-ε, IFN-κ ve IFN-ω IFN-δ , IFN-τ ve IFN-ζ	IFNAR1 ve IFNAR2
Tip II	IFN-γ	IFNGR1 ve IFNGR2
Tip III	IFN-λ (1-4)	IFRL1 ve IL-10R2

Tüm Tip I interferonlar, IFNα reseptörü 1 (IFNAR1) ve IFNα reseptörü (IFNAR2) alt birimlerinden oluşan birçok hücrede sentez edilen heterodimerik bir reseptör kompleksine bağlanırlar. Bununla birlikte, bazı Tip I interferonlar, farklı reseptör komplekslerine de bağlanabilir ve antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör aktiviteleri açısından farklı sonuçlara neden olurlar (Theofilopoulos ve ark., 2005; Kalie ve ark., 2008; Moraga ve ark., 2009). Tip I interferonlar genel olarak fibroblastlar ve monositler tarafından üretilirler. Bununla birlikte, IFN-α üretimi, İnterlökin-10 olarak bilinen başka bir sitokin tarafından inhibe edilir. Tip I interferonlar serbest bırakıldıktan sonra hedef hücreler üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanır ve bu da virüsün RNA ve DNA'sını üretmesini ve kopyalamasını engelleyecek proteinlerin ekspresyonuna yol açar (Uze ve ark., 2007). Esasen tüm hücreler Tip I interferonları üretebilir, ancak baskın olarak sentezlendikleri alt tiplere göre farklılık gösterebilirler (Levy ve ark., 2003). IFNα, plazmasitoid hücreler (dendritik hücre özel bir alt kümesi) ve dendritik hücreler tarafından yüksek seviyelerde üretilir (Colonna ve ark., 2002). Fibroblastlar enfeksiyona ilk yanıt olarak IFNβ üretirler ancak IFN yanıtının sonraki aşamalarında IFNα üretmeye başlarlar (Marie ve ark., 1998).

Tip II interferon grubu yalnızca IFNγ'yi içerir (Fensterl ve Sen, 2009). Tip I IFN'lerden farklı olarak, IFNγ üretimi aktive edilmiş T hücreleri, doğal öldürücü hücreler ve makrofajlar ile sınırlıdır (Valente ve ark., 1992). IFNγ proetinleri, sinyal iletiminde IFNγ reseptör kompleksi 1 (IFNGR1) ve IFNγ reseptör kompleksi 2 (IFNGR2) proteinlerin oluşturduğu reseptörleri (IFNGR) kullanır. IFNGR hemen hemen tüm hücrelerde sentez edilen ki bu da tüm hücre tiplerinin IFNγ'ye yanıt verebildiği

anlamına gelir (Valente ve ark., 1992). IFNγ aynı zamanda immün interferon olarak da bilinir ve İnterlökin-12 tarafından aktive edilir (Parkin ve Cohen, 2001).

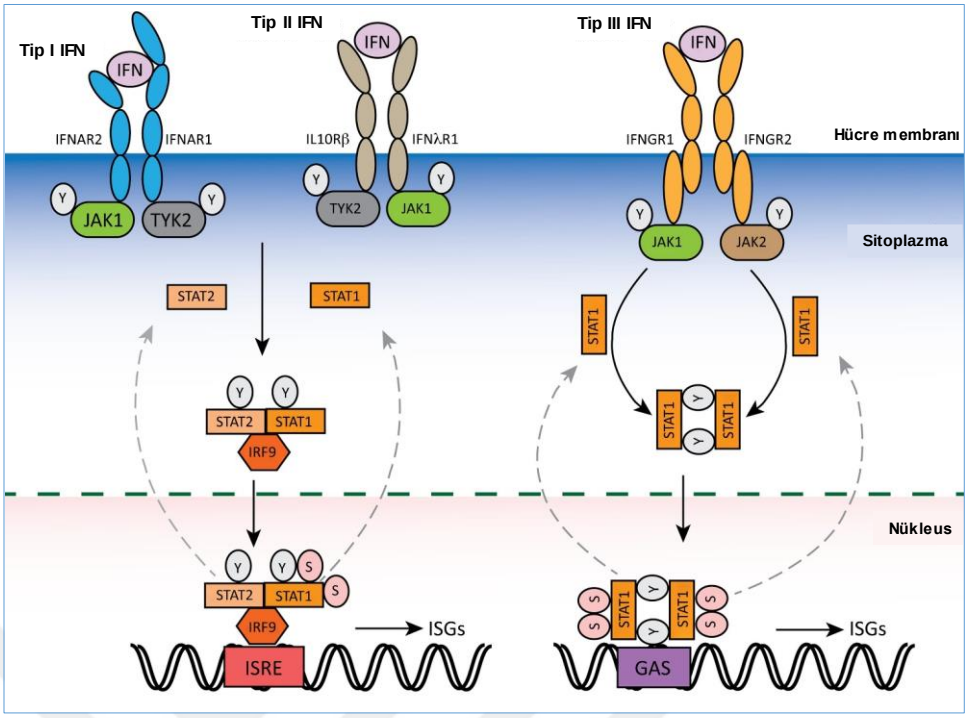
Tip III interferonlar, IFNλ1, IFNλ2, IFNλ3 (sırasıyla interlökin IL-29, IL-28A ve IL-28B olarak da bilinir) içeren yeni keşfedilen bir interferon ailesidir (Fensterl ve Sen, 2009). Başlangıçta, IFNλ'lar fonksiyonel olarak Tip I interferonlara benzer olmaları nedeniyle "interferon benzeri sitokinler" olarak adlandırılmıştır. Bununla birlikte farklı bir gen dizisine ve kromozomal konuma sahiptirler (Theofilopoulos ve ark., 2005). IFNλ proteinleri sinyal iletiminde Tip I IFN reseptörlerinden farklı olan IFRL1 (veya IL-28R) ve IL-10R2'den oluşan heterodimerik bir reseptör kullanırlar (Pestka ve ark., 2004a; Pestka ve ark., 2004b; Fensterl ve Sen, 2009). Bununla birlikte, IFNλ, Tip I interferonlar ile aynı yolu ve benzer gen ekspresyonunu aktive eder. Son zamanlarda, IFNλ4, Tip III IFN'ların dördüncü üyesi olarak tanımlanmıştır (Prokunina-Olsson ve ark., 2013) .

4.4.3. İnterferonların Etki Mekanizması

Tüm interferonların ortak işlevlerinden en önemlileri viral replikasyonu durdurucu etki yapmaları ve bağışıklık sisteminin işlevlerini düzenlemeleridir. Hem IFNα hem de IFNβ sinyal iletiminde farklı hücre tiplerinde sentez edilen ortak bir reseptörü, IFNα/β reseptörünü (IFNAR) kullanırlar (Stark ve ark., 1998; Samuel, 2001; Theofilopoulos ve ark., 2005). Tip I IFN'ların reseptörlerin IFNAR1 ve IFNAR2 alt ünitelerinin eksternal bölgeleri ile birleşerek üçlü bir kompleks oluşturması, sitoplazmada reseptörlerin hücre içi uzantıları ile ilişkili diğer sinyal proteinlerinin de birbirine yakınlaşmasını ve aktive olmalarını sağlar. Bu aktivasyon sinyal kaskadının başlamasına neden olur. İnterferon Tip I reseptörlerinin sitoplazmik bölgeleri ile etkileşim içerisinde olan ve en iyi karakterize edilen sinyal proteinleri tirozin kinaz 2 (TYK2) ve Janus kinaz 1 (JAK1)'dir. TYK2, reseptörün IFNAR1 alt ünitesi ile JAK1 ise IFNAR2 alt birimi ile etkileşim halindedir (Yan ve ark., 1996; Domanski ve ark., 1997; Pestka ve ark., 2004b). IFNα/IFNβ moleküllerinin IFNAR'a bağlanması, JAK1 ve TYK2'nin fosforillenerek aktif forma dönüşmesine neden olur. Aktive olmuş kinaz enzimleri transkripsiyon faktörleri olarak iş gören ve sitoplazmada inaktif formda bulunan sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon aktivatörü 1 ve (*İng. signal transducer and activator of transcription 1: STAT1*) ve sinyal dönüştürücüsü ve transkripsiyon

aktivatörü 2 (*İng. signal transducer and activator of transcription 2: STAT2*) proteinlerini fosforilleyerek aktif formlara dönüştürürler (Malmgaard, 2004) (Şekil 4.6).

STAT proteinlerinin aktivasyonu, tüm interferonlar için en iyi tanımlanmış hücre sinyal yolunu, klasik Janus kinaz-STAT (JAK-STAT) sinyal yolunu başlatır (Aaronson ve Horvath, 2002). Fosforillenerek aktive olan STAT proteinleri, interferon ile uyarılan gen faktör 3 (*İng. Interferon Stimulated Gene Factor: ISGF3*) kompleksini oluşturmak üzere interferon yanıt faktörü 9 (*Interferon Response Factor 9: IRF-9*) ile birleşir ve sitoplazmadan hücre çekirdeğine taşınırlar. Nükleusa taşınan bu kompleks DNA üzerinde bulunan ve belirli genlerin kontrolünü sağlayan "interferon uyarı yanıt elementlerine (*İng. Interferon-Stimulated Response Element: ISRE*) bağlanır. İnterferon uyarısına yanıt oluşturacak ISRE kontrol dizilerine sahip olan çok sayıda gen, Janus kinaz-STAT (JAK-STAT) sinyal mekanizması ile transkripsiyon düzeyinde aktive edilir (Taniguchi ve Takaoka, 2002; Malmgaard, 2004; Ivashkiv ve Donlin, 2014) (David, 2002). Bu genler üzerinden kodlanan proteinlerin bir kısmı viral replikasyonu inhibe edici işlevler üstlenirken, diğer bir kısmı interferon mekanizmasının bileşenleri olarak işlev görürler.



Şekil 4-7 Tip I, Tip II ve Tip III interferonların hücrelerde gen ekspresyonunu aktive etme mekanizmaları. (Wang ve ark., 2017) 'den değiştirilerek kullanılmıştır.

4.4.4. İnterferon ile İlişkili Antiviral Aktivite Gösteren Proteinler

Tip I interferonların hücrelerde reseptörlere bağlanması ile antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör işlevlere sahip 300'den fazla genin ekspresyonu aktive edilir (Der ve ark., 1998; de Veer ve ark., 2001). İnterferonlar ile indüklenen bu proteinler arasında enzimler, transkripsiyon faktörleri, hücre yüzeyi glikoproteinleri, sitokinler, kemokinler ve ayrıca karakterize edilmesi gereken çok sayıda faktör bulunmaktadır. Şimdiye kadar, sınırlı sayıda antiviral işleve sahip protein ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. En iyi çalışılmış interferon ile indüklenen antiviral proteinler arasında Mx proteinleri (Horisberger ve ark., 1983; Staeheli ve ark., 1986; Haller ve Kochs, 2002; Turan ve ark., 2004), 2′-5′oligoadenilat sentetaz/RNaseL enzimleri (Silverman, 1994; Zhou ve ark., 1997; Silverman, 2003) protein kinaz R (PKR) (Yang ve ark., 1995; Williams, 1999; Samuel, 2001) ve interferon ile indüklenen transmembran proteinler (İng. interferon-induced transmembrane protein: IFITM) ve çift iplikli RNA-spesifik bir enzim olan adenozin deaminaz (ADAR)'dır.

Mx proteinleri çeşitli RNA virüslerinin çoğalmasını inhibe eden, dinamin benzeri büyük GTPazlardır (Haller ve ark., 1998; Haller ve Kochs, 2002). Konak canlının hayatta kalması için önemi kanıtlanmış olmakla birlikte, etki biçimleri hala tam olarak anlaşılamamıştır (Pavlovic ve ark., 1995; Arnheiter ve ark., 1996; Hefti ve ark., 1999). İnsan MxA proteini, interferon ile muamele edilmiş hücrelerin sitoplazmasında birikir ve viral nükleokapsidleri hedefler (Kochs ve Haller, 1999; Weber ve ark., 2000; Kochs ve ark., 2002; Reichelt ve ark., 2004). Diğer interferon ile sentezi uyarılan proteinlerin aksine, Mx proteinleri hücrelerde yapısal olarak mevcut değildir ve ekspresyonları doğrudan virüsler ile ya da çift iplikli RNA tarafından indüklenmez (Simon ve ark., 1991; Bazzigher ve ark., 1992). Mx ekspresyonu, yalnızca IFNα/β tarafından JAK-STAT sinyal yoluyla uyarılır (Dupuis ve ark., 2003). Bu nedenle, Mx, klinik ortamlarda interferon etkisi için mükemmel bir belirteç olarak kabul edilir (Roers ve ark., 1994; Antonelli ve ark., 1999; Deisenhammer ve ark., 2004). MxA ve MxB, viral giriş sırasında kritik bir rol oynar; MxA, virüs plazma membranından geçtikten sonra enfeksiyonun erken aşamalarında etki ederken, MxB nükleer aşamada hareket ederek nükleer girişi engeller (Haller ve Kochs, 2011; Chang ve ark., 2013).

İnterferonlar ile sentezi uyarılan 2'-5'-oligoadenilat sentaz (*İng. 2'-5'-oligoadenylate synthetase: 2'-5'OAS*) ve protein kinaz R (*İng. protein kinase R: PKR*) enzimleri hücrelerde inaktif formda eksprese edilir. Bazal seviyeler IFNα/β veya IFN γ tarafından regüle edilir ve her iki enzim de viral çift iplikli RNA tarafından kritik olarak aktive edilir. 2′-5′oligoadenilat sentetaz, ribonükleaz L (İng. Ribonuclease L: RNase L) enzimini aktive eden kısa 2′-5′ oligoadenilatların sentezini katalize eder. RNaseL, daha sonra hem viral hem de hücresel RNA'ları yıkarak viral inhibisyona yol açar (Zhou ve ark., 1997). RNaz L, en iyi karakterize edilmiş interferon kaynaklı antiviral yollardan biri olan OAS / RNase L sisteminin etkili bir enzimidir (Ezelle ve ark., 2016; Gusho ve ark., 2020). Viral enfeksiyona yanıt olarak salgılanan interferonlar, oligoadenilat sentetaz enzim ailesinin ekspresyonunu indükler. OAS enzimleri inaktif enzimler olarak üretilir ve viral replikasyon sırasında oluşan çift iplikli RNA varlığında aktive olurlar. Aktif OAS enzimleri, ATP'nin 2’-5’oligoadenilatlara dönüşümünü katalize eder (Sen ve ark., 1976; Hovanessian ve ark., 1977; Kerr ve Brown, 1978; Nilsen ve ark., 1981). 2’-5’oligoadenilatlar daha sonra ikinci haberci olarak işlev görür ve monomerik inaktif RNaz L'ye bağlanarak aktif

formda dimerizasyonunu sağlar (Dong ve Silverman, 1995). Enzimatik olarak aktif hale gelen bu enzim, viral ve hücresel tek iplikli RNA moleküllerini kanser ve buna bağlı olarak protein sentezini inhibe eder. Bu durum viral replikasyon yavaşlamasına ve konak hücrenin apoptoza gitmesine yol açar (Nilsen ve ark., 1981; Castelli ve ark., 1997; Zhou ve ark., 1997). Kısa RNA fragmanlarının üretilmesi ile RNase L, IFN sinyal yolağını daha da güçlendirebilir (Malathi ve ark., 2007). RNase L ürünlerinin ayrıca otofajiyi tetiklediği ve inflamasyonu aktive ettiği bildirilmiştir (Chakrabarti ve ark., 2012; Siddiqui ve Malathi, 2012).

Protein kinaz R (PKR), ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 (İng. Eukaryotic Initiation Factor 2: eIF2) (Williams, 1999) proteininin bir alt birimini fosforile eden bir serin-treonin kinaz enzimidir. Fosforile edilmiş eIF-2 faktörü, hücre içerisinde ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2B (*İng. eukaryotic translation initiation factor 2B: eIF2B*) ile inaktif bir kompleks oluşturur. Dolayısıyla, eIF2 faktörünün fosforillenmesi hücresel ve viral mRNA'ların translasyonunu engeller. Viral enfeksiyona karşı konak hücrelerin IFN yanıtında OAS/RNaseL ve PKR sistemlerinin önemi, hem doku kültürü çalışmalarında hem de hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Stark ve ark., 1998; Williams, 1999; Sen, 2001). Bu yolaklarda iş gören faktörlerden bazılarına sahip olmayan farelerin viral enfeksiyonlara duyarlılığı artmaktadır (Zhou ve ark., 1997; Zhou ve ark., 1999). Yine de, PKR, RNaseL ve Mx proteinlerinden yoksun üçlü *knock out* farelerden alınan hücrelerin sınırlı bir IFN ile indüklenen antiviral durum sergilemeleri, hücrelerde alternatif antiviral yolların var olduğunu göstermektedir (Zhou ve ark., 1999).

İnterferonlar ile sentezi uyarılan IFITM protein ailesi dört üyeden (IFITM-1, IFITM-2, IFITM-3 ve IFITM-5) oluşur. Bu proteinler endozomlarda ve lizozomlarda bulunur ve etkili enfeksiyon için veziküllere gereksinim duyan virüslerin inhibisyonunda kritik bir role sahiptir (Huang ve ark., 2011; Bailey ve ark., 2014).

ADAR, baz eşleşmesini bozan bir nükleik asit düzenleme enzimidir. ADAR, çift iplikli RNA moleküllerinde, adenozin (A) bazlarının deaminasyonunu ile inozin (I) oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucunda RNA molekülünde AU baz çifti IU baz çiftine dönüşür ki bu da çift iplikli RNA moleküllerini destabilize eder (Murphy ve ark., 1991).

İnterferonlar yukarıda verilen proteinlere ek olarak, virüslere karşı etkili olan ya da farklı işlevlere sahip yüzlerce proteinin sentezini uyarırlar. Bu proteinleri kodlayan genler interferon uyarısı için önemli olan ISRE kontrol dizileri taşırlar (Schneider ve ark., 2014). Ayrıca, interferonlar apoptozu teşvik ederek, virüsle enfekte olmuş hücrelerin ölümüne neden olan p53 aktivitesini arttırırlar. Bu da virüslerin hücreler arası yayılmasını sınırlandırır (Lazo ve Santos, 2011). İnterferonların p53 üzerindeki etkisi aynı zamanda bazı kanserlere karşı koruyucu rolü ile de bağlantılıdır (Munoz-Fontela ve ark., 2016).

4.5. İnterferonlara Karşı Virüs Direnci

Virüslerin saldırısına uğrayan organizmalar, viral enfeksiyonlardan korunmak için bir çok savunma mekanizmasına sahiptirler. Buna karşın bu mekanizmalar hücreleri viral enfeksiyonlara karşı tam olarak koruyamaz. Virüsler, IFN savunma sisteminden kaçmak için birden fazla mekanizma geliştirmiştir (Goodbourn ve ark., 2000; Garcia-Sastre, 2001; Basler ve Garcia-Sastre, 2002; Weber ve ark., 2003). Hepsi olmasa da çoğu virüsün çeşitli yollarla IFN yanıtını bozmak için etkili mekanizmalar geliştirdiği bilinmektedir. IFN sentezini inhibe etmek, salgılanan IFN moleküllerini bağlayarak inaktif hale getirmek, IFN ile aktive olan sinyalleri bloke etmek veya IFN ile indüklenen antiviral proteinleri etkisizleştirmek, virüslerin interferon savunma mekanizmalarından kurtulmak için kullandığı yollar arasındadır. İnterferon sinyal yolağının önemli bileşenleri olan STAT proteinlerinin yıkılması, STAT proteinlerinin fosforilasyonunun inhibisyonu ve IRF-3 inhibisyonu hücresel savunmayı zayıflatan eylemlerdir (Navratil ve ark., 2010). IFN sinyal sistemini inhibe eden virüsler arasında Japon Ensefalit Virüsü (JEV)(Lin ve ark., 2004), dang tip 2 virüsü (DEN-2), SARS-CoV2 ve herpes virüs ailesinden insan sitomegalovirüs (HCMV) veya Kaposi sarcoma ile ilişkili herpesvirus (KSHV veya HHV8) gibi virüsler bulunur (Sen, 2001; Lei ve ark., 2020; Xia ve ark., 2020). IFN sinyallemesini etkilediği kanıtlanmış viral proteinler arasında Epstein-Barr virüsünden EBV nükleer antijen 1 (EBNA1) ve EBV nükleer antijen 2 (EBNA-2), insan papilloma virüsünün (HPV) E7 proteini ve vaksinya virüsünün B18R proteini sayılabilir (Alcami ve ark., 2000; Sen, 2001). Bazı poksvirüsler, IFN'nin hücresel reseptörüne bağlanan ve etkileşimini önleyen, bu sitokin ile hedef hücreler arasındaki iletişimi engelleyen, IFN reseptör homologlarını

kodlar. Bazı virüsler, RNA'ya bağlı protein kinazların aktivitesini önlemek için çift iplikli RNA'ya bağlanan proteinleri kodlarlar (Chang ve ark., 1992; Miller ve Samuel, 1992; Haller ve ark., 2006). Bazı virüsler, gen (ve dolayısıyla protein) mutasyonu yoluyla interferonların antiviral aktivitelerinden kaçarlar. Kuş gribi olarak da bilinen İnfluenza A H5N1 virüsüne ait yapısal olmayan proteininde (NS1) tek bir amino asit değişikliğinin interferon ve diğer antiviral sitokinlere karşı direnç sağladığı ileri sürülmüştür (Seo ve ark., 2002). Ancak bunun virüsü nasıl daha dirençli hale getirdiğinin kesin mekanizması bilinmemektedir.

4.6. Viral RNA'sının Tanınması ve İnterferon Üretiminin İndüksiyonu

IFN'ların keşfedilmesinden sonra viral RNA'nın potansiyel interferon indükleyicisi olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle erken dönemlerde yapılan çalışmalarda, olası nükleik asit indükleyicilerin tanımlanmasına odaklanılmış ve bu amaçla çok sayıda sentetik ve biyolojik RNA test edilmiştir. Tek iplikli RNA, DNA veya RNA:DNA hibritlerinin aksine, çift iplikli RNA'nın interferon tepkisinin güçlü bir tetikleyicisi olduğu bulunmuştur (Baum ve Garcia-Sastre, 2010). Ayrıca, bakteri veya yapay olarak sentezlenmiş poliinosinik: polisitidilik asit (poliIC) gibi DNA virüsünden ve diğer mikroorganizmalardan üretilen çift iplikli RNA'nın, IFN üretiminin güçlü aktivatörleri olduğu gösterilmiştir (Baum ve Garcia-Sastre, 2010).

Bir konağın patojenlere karşı bağışıklık tepkisi için esas olan, kendinden olmayan moleküllerin kendi moleküllerinden ayırt edilmesidir. Enfeksiyona karşı konak savunmasının ilk hattında çok önemli bir rol oynayan doğuştan gelen bağışıklık sistemi, konakta bulunmayan patojenle ilişkili moleküler modelleri (PAMP'ler) tanıyan ve ardından konakçının bağışıklığını etkinleştiren örüntü tanıma reseptörleri (PRR'ler) ile donatılmıştır.

İnterferon üretimi esas olarak hücre yüzeyinde veya hemen hemen tüm hücre tiplerinin sitozolik bölmesinde bulunan örüntü tanıma reseptörlerinin patojenle ilişkili moleküler modeller ile uyarıldığında meydana gelir (Janeway ve Medzhitov, 2002; Mogensen, 2009).

Viral enfeksiyonlar sırasında vRNA molekülleri, Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler) ve nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi

(NOD) benzeri reseptörler (NLR'ler) gibi doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarını tetikleyen örüntü tanıma reseptörleri tarafından tanınır (Kawai ve Akira, 2009; Jensen ve Thomsen, 2012).

4.6.1. TLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyalleme Yolu

PRR'ler içerisinde yer alan TLR'ler en kapsamlı çalışılan reseptörlerdir. TLR'ler, plazma membranı ile endozomal veziküller arasında dolaşan tip 1 transmembran proteinlerdir. Bu proteinler hücre dışı ortamda bulunan PAMP'ları tespit etmekten birincil olarak sorumludurlar. Plazma zarında bulunanlar genellikle hidrofobik lipidler ve proteinler için spesifiktir; endozomlarda bulunanlar ise nükleik asitleri tespit eder.

İnsanlarda, hücre yüzeyinde, endozomlar veya lizozomlar gibi hücre içi veziküllerin lümeninde PAMP'ları saptayan ve belirli bir PAMP tipinin tanınmasında rol alan 10 farklı TLR tanımlanmıştır (Kawai ve Akira, 2010). TLR'lerinden TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9, endozomda lokalize membran proteinleriyken, diğer TLR'ler esas olarak hücre yüzeyinde bulunurlar (Kawai ve Akira, 2010). TLR'ler, çift sarmallı RNA (TLR-3)(Alexopoulou ve ark., 2001), tek sarmallı RNA (TLR-7) (Lee ve Barton, 2014) veya CpG DNA (Kawai ve Akira, 2011) gibi farklı patojen bileşenlerini tanırlar.

Her TLR, dış alan aracılığıyla tanınan kendi özel ligandı tarafından uyarılır. TLR ligandlarının tanınması, miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 (MyD88), adaptör protein içeren Toll / IL-1 reseptör alanı (TIRAP), TICAM1(*İng. Toll like receptor adaptor molecule 1*) ve TRAM (*İng.Translocation Associated Membrane Protein*) gibi adaptör proteinlerinin TIR aracılığıyla toplanmasına yol açar. IL-1R ile ilişkili protein (IRAK) ve tümör nekroz faktörü (TNF) reseptörü ile ilişkili faktör 6 (TRAF6) daha sonra sinyal yoluna katılır. TRAF6, bir ubiquitin ligaz E olarak davranır ve TAK1 kompleksini ve NF-kappa-B (NF-κB) temel modülatörü (*İng. NF-κB essential modifier*: EMO)'dan sorumlu olan TAB1 (*İng. TAK1-binding protein 1*) ve TAB2/3 alt birimlerini aktive eder. Bu da IκB kinaz ve IκK kinaz aktivasyonuna ve fosforile edilmiş IκB6'nın degradasyonu ile sonuçlanır. Son olarak, NF-κB, AP-1 ve IRF gibi interferon nükleer transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu destekleyen moleküler kademelerin aktivasyonuna yol açar.

PRR tanıma dizisi Tip I interferon üretimi için önemli olan bir veya daha fazla Interferon Düzenleyici Faktör (IRF) ailesinin transkripsiyon faktörlerinin sinyal transdüksiyon yolunu başlatır. IRF1, IRF3, IRF5 ve IRF7, IFNα gen ekspresyonunun indüksiyonunda özellikle önemlidir (Yanai ve ark., 2012).

4.6.2. RLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyal Yolu

Sitoplazmada, viral RNA'lar RLR'ler tarafından algılanır. RLR'ler, retinoik asitle indüklenebilir gen-I (RIG-I), melanom farklılaşmasıyla ilişkili protein 5 (MDA5) ve LGP2 (*DHX58* geni tarafından kodlanan ve "genetik ve fizyoloji laboratuvarı 2" olarak isimlendirilen bir protein) içerir. Sitoplazmik RNA helikazları olan RIG-I ve MDA5, viral çift iplikli RNA'yı bağlar ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisini indüklemek için sinyali tetikler (Onoguchi ve ark., 2011; Yoneyama ve ark., 2015).

Viral genomik RNA'nın replikasyonu sırasında, çift iplikli RNA, viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz tarafından üretilir (Ahlquist, 2002; Jia ve Gong, 2019). Bu sitoplazmik viral RNA'lar, RLR'ler tarafından tanınır (Jensen ve Thomsen, 2012; Okamoto ve ark., 2017). RIG-I proteini nispeten kısa çift iplikli RNA'lara (<1 kbp) bağlanırken, MDA5 daha uzun çift iplikli RNA'lara (> 1 kbp) bağlanır. Viral RNA'nın tanınmasından sonra, RIG-I ve MDA5 viral çift iplikli RNA molekülü boyunca birleşerek bir nükleoprotein filamanı oluşturur ve proteinlerin bir araya gelmesi, dört RIG-I veya MDA5 molekülünden oluşan bir 2CARD tetramer yapısının oluşmasıyla sonuçlanır (Zeng ve ark., 2010). RIG-I 2CARD tetramer yapısı, TRIM25(*İng.Tripartite motif-containing protein 25)* aracılı K63 bağlantılı bir poliubiquitin zinciri ile stabilize edilir (Gack ve ark., 2007). TRIM25, RIG-I aracılı Tip I IFN üretimi için gerekli olan bir E3 ubiquitin ligazdır (Reymond ve ark., 2001).

RIG-I ve MDA5 proteinleri, adaptör molekülü MAVS ile ilişkileri için gerekli olan kaspaz aktivasyonu ve görevlendirme alanlarını (CARD'lar) içerir ve bu da sinyal aktivasyonu ile sonuçlanır (Kawai ve ark., 2005; Seth ve ark., 2005). LGP2 de yapısal olarak RIG-I ve MDA5'e benzeyen ancak amino-terminalinde CARD alanlarından yoksun ATP'ye bağlı DExD / H motifi RNA helikazlarına aittir (Cui ve ark., 2008; Sarkar ve ark., 2008). LGP2, RIG-I ve MDA5'in etkinleştirilmesi sırasında düzenleyici rol oynar (Satoh ve ark., 2010; Sanchez David ve ark., 2019). Ek olarak, RIGI, MDA5 ve LGP2, bir helikaz alanı ve viral RNA'ya bağlanan bir karboksil-terminal alanı

(CTD) içerir (Cui ve ark., 2008). MDA5'in protein fosfataz 1 (PP1) ile defosforilasyonu, viral enfeksiyondan sonra indüklenir ve bu da sinyal aktivasyonu ile sonuçlanır. RIG-I ve MDA5, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının indüksiyonu için mitokondrinin dış zarında bulunan MAVS adaptör molekülüne ihtiyaç duyar. 2CARD tetramer yapısı, tip I IFN ve proinflamatuar sitokinlerin üretimine yol açan MAVS'nin mitokondrinin dış zarı üzerindeki prion benzeri agregasyonu için bir çekirdek görevi görür. Bu da IRF3, IRF7 ve NF-κB'nin aktivasyonu ve translokasyonu nedeniyle Tip-I IFN'nın ekspresyonuyla sonuçlanır (Chen ve ark., 2017; Said ve ark., 2018).

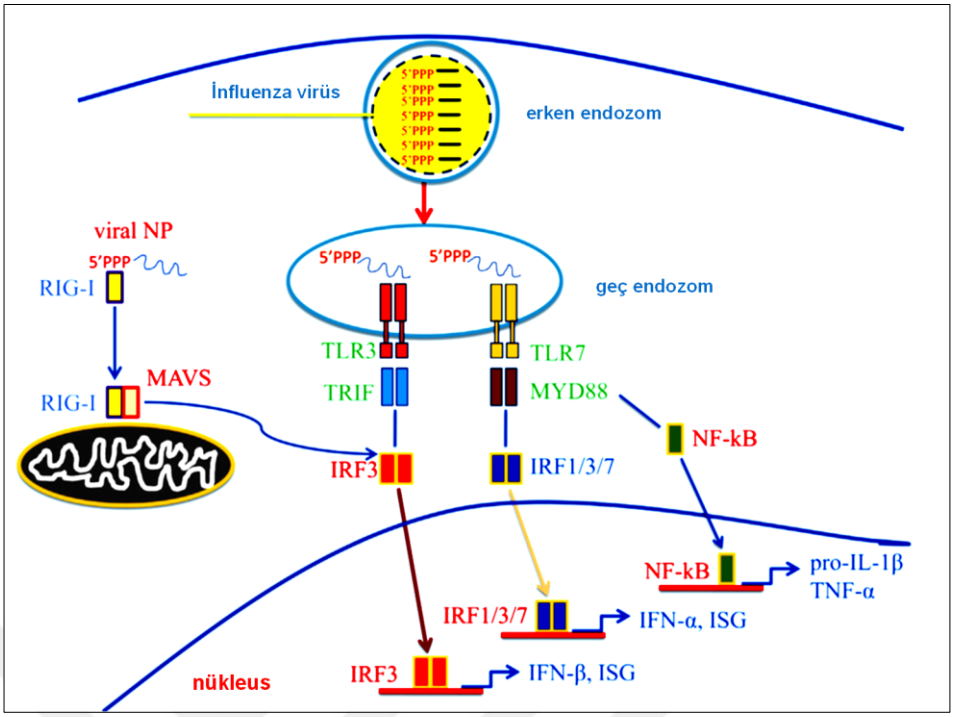
4.6.3. NLR'ler Tarafından İndüklenen Sinyal Yolu

NLR'lerin, PAMP'ları ve mikrobiyal yapılardan veya ortamdan türetilmiş moleküllerden gelen hasara bağlı moleküler modeller (DAMP'ler) tarafından tanınması, doğuştan gelen bağışıklık yanıtının indüksiyonuna yol açar (Inohara ve ark., 2005; Fritz ve ark., 2006; Meylan ve ark., 2006; Kanneganti ve ark., 2007; Jeong ve Lee, 2011). İnsanlarda, bilinen 22 NLR bulunmaktadır. NLR proteinleri, merkezi bir NOD, amino-terminal efektör alanı ve karboksi-terminal lösin açısından zengin tekrarlar (LRR'ler) ile ortak bir alan organizasyonuna sahiptir (Ting ve ark., 2008). NLR ailesinin üyeleri, amino-terminal yapıları ile ayırt edilen en az beş alt aileye ayrılmıştır. Bunlar arasında NLRA (asidik bir transaktivasyon alanı içerir), NLRB (apoptoz protein tekrarının bir bakulovirüs inhibitörü [BIR] içerir), NLRC (bir CARD içerir), NLRP (bir Pyrin alanı içerir) ve NLRX (bilinmeyen bir alan içerir) bulunur. NLR'ler 5 alt gruba ayrılır. NLRA alt ailesi, yalnızca bir üye, MHC-II transaktivatör (CIITA) içerir. Benzer şekilde, insan NLRB alt ailesinin sadece bir üyesi vardır, NAIP. NLRC ailesi beş üyeden oluşur: NLRC1 (NOD1), NLRC2 (NOD2), NLRC3, NLRC4, ve NLRC5. NLRP alt ailesi, NLRP1–14 olmak üzere 14 üyeden oluşur. NLRX yalnızca bir üye NLRX1 içerir (Ting ve ark., 2008). NF-kB yolunu aktive etmeye ek olarak, NOD1 / NOD2, proinflamatuar sitokin salgılanmasına neden olan mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolunu etkinleştirir (Girardin ve ark., 2001; Inohara ve ark., 2003). NOD2 ayrıca viral tek iplikli RNA'yı da algılayabilir. İnterferon üretimini ve antiviral savunma sistemini harekete geçirir (Sabbah ve ark., 2009).

4.7. İnfluenza Virüsleri ve İnterferonlar

İnterferonlar influenza virüsleri ile yapılan çalışmalar sırasında keşfedilmiştir. Daha sonraları yapılan çalışmalarda, influenza virüsü ile enfekte çocuklarda nazal yıkamalarda artmış IFN üretiminin, virüsün azalması ile ilişkili olduğunu saptamıştır (Hall ve ark., 1978). Klein ve ark. influenza virüsü ile enfekte, emzirilen çocuklarda yüksek IFN-I seviyelerini tespit ederek, emzirmenin solunum yolu viral enfeksiyonuna karşı koruduğu hipotezine destek sağlamıştır (Klein ve ark., 2008; Melendi ve ark., 2010). Ek olarak, yaşlı deneklerde yapılan çalışmalarda, influenza virüsü enfeksiyonu sırasında IFN α üretiminin azaldığı gösterildi ve bu azalmanın, onların doğuştan gelen ve adaptif immün yanıtlarında hastalığın seyrinde artmaya yol açabilecek kusurların oluşturabileceğini gösterdi (Canaday ve ark., 2010). Benzer şekilde, diğer çalışmalarda da gebe kadınların influenza virüsüne karşı zayıflamış bir IFN-α yanıtı gösterdiği bildirilmiştir (Forbes ve ark., 2012).

İnfluenza virüsleri başlıca iki farklı PRR türü tarafından tanınır. Bunlar RLR'ler ve TLR'lerdir. RLR ailesiyle ilgili olarak, RIGI, LGP2 ve MDA5, sitoplazmada viral replikasyon sırasında viral RNA'yı algılar (Saito ve Gale, 2008; Loo ve Gale, 2011). Aktive edildikten sonra, RIGI ve MDA5, mitokondriyal antiviral sinyal veren protein (MAVS) ile etkileşime girerek IFN üretimini uyarmak için NF-κB ve IRF3'ün aktivasyonuna yol açar (Şekil 4-8) (Barral ve ark., 2009; Refolo ve ark., 2020). İnfluenza virüsü, TLR3 ve TLR7 tarafından iki farklı TLR aktive edilir. DC'lerde ve makrofajlarda TLR3'ün uyarılması TRIF aracılığıyla sinyal verir, IRF3 / NFκB'yi aktive ederek IFNβ salgılanmasına yol açar. Öte yandan, DC'lerdeki TLR7, IRF7'yi etkinleştiren ve hem IFNα hem de IFNβ'nin salgılanmasını sağlayan MyD88'i etkinleştirir (Lund ve ark., 2004; Asselin-Paturel ve Trinchieri, 2005; Dietrich ve ark., 2010).



Şekil 4-8 İnfluenza virüs enfeksiyonu ve interferonların rolü. (Biondo ve ark., 2019)'den değiştirilerek kullanılmıştır.

İnfluenza A virüslerinde viral genomun en küçük 8. segmenti üzerinden kodlanan NS1 proteini konak hücre interferon savunma makanizmalarından korunmak için önemli bir rol üstlenir. Bu protein interferon antagonisti olarak davranır. NS1 proteini, IFN sentezini birkaç farklı mekanizma ile baskılar (Hale ve ark., 2008; Hale ve ark., 2010; Krug, 2015; Nogales ve ark., 2018). Birincisi, RIG-I ile bir kompleks oluşturarak ve sinyallemesini sınırlayarak IFN'nin transkripsiyonel indüksiyonunu engeller (Pichlmair ve ark., 2006; Bloom ve ark., 2010). İkincisi, çift iplikli RNA molekülünü ayırarak PKR'nin aktivasyonu engeller ya da PKR ile bir kompleks oluşturur. Her iki durumda da antiviral mekanizma zayıflatılır (Bergmann ve ark., 2000; Li ve ark., 2006; Kochs ve ark., 2007; Schierhorn ve ark., 2017). Üçüncüsü, transkriplerin işlenmesi sırasında RNA moleküllerinin 3′-uçlarına etki ederek ederek mRNA olgunlaşmasını inhibe eder (Chen ve ark., 1999). Son olarak NS1, enfekte hücrelerin apoptozunu geciktirebilen fosfatidil-inositol-3 kinazları (PI3K) aktive eder (Ehrhardt ve Ludwig, 2009).

Daha önce bahsedildiği gibi IFITM proteinleri, IFN-I tarafından indüklendiği bilinen farklı hücre tiplerinde konstitütif ekspresyonlara sahip interferon kaynaklı antiviral

kısıtlama faktörlerinin bir ailesidir. Son kanıtlar, IFITM3'ün influenza virüsü enfeksiyonunu kısıtlamada güçlü bir antiviral faktör olduğunu ve ekspresyonundaki bir azalmanın daha yüksek hastaneye yatış riski ile sonuçlandığını göstermiştir (Everitt ve ark., 2012).

Yukarıda irdelenen literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi, herhangi bir virüs saldırısına karşı konak organizmalar, virüslerin çoğalması ve yayılmasını engellemeye yönelik birçok savunma mekanizması geliştirmiştir. Bu mekanizmalar arasında hücresel düzeyde koruma sağlayan interferon savunma mekanziması, konağın viral enfeksiyonlar ile baş etmesinde çok büyük öneme sahiptir. Dolayısıyla interferonlar, interferonla ile ilişkili konak proteinleri ve enfeksiyon yapan viral bileşenler arasında karmaşık bir ilişki vardır. Viral enfeksiyonlar hücrelerde interferonların sentez edilmesine neden olurlar. Enfekte olan hücreler tarafından sentez edilen ve salgılanan interferonlar hem otokrin hem parakrin hem de endokrin yolla diğer hücrelere sinyal ileterek, ISRE kontrol dizisi taşıyan çok sayıda genin transkripsiyonunu uyarırlar. Transkripsiyon sonrası sentez edilen proteinler değişik mekanizmalar ile hücrelerde viral çoğalmanın önlenmesi için bariyer görevi görürler. Konak hücre ve virüsler arasındaki bu karmaşık ilişkiler ağı viral patogenezin de seyrini belirler. Bazı virüsler konak hücrelerde çok kolay replikasyon/transkripsiyon yaparak ağır seyreden hastalıklara neden olurken bazı virüsler savunma bariyerlerini aşamazlar. Bu tez çalışmasında enfekte ettikleri hücrelerde interferon mekanizmasını tetikleyen viral patojenlerden, İnfluenza A virüslerinin, konak hücrelerde interferon yolakları ile ilişkili genlerin ekpresyonlarına etkileri PZR dizin analizi tekniği ile incelendi. Bunun için HEK293 hücreleri iki farklı influenza A tipi virüs (A/WSN/33/H1N1 ya da A/Duck/Pennsylvania/10,218/84/ H5N2) ile enfekte edilmiş ya da viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilmiş; daha sonra bu hücrelerde interferon yolakları ile ilişkili belirli genlerin transkript düzeyleri saptanmıştır. Elde edilen veriler, virüs ile enfekte ya da viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte olan hücrelerde ele alınan gen ekspresyonu profillerinde virüs tipine göre önemli farklılıkların ortaya çıktığı saptanmıştır. Enfeksiyon ve/veya transfeksiyon koşullarında ekspresyon düzeylerinde belirgin farklılıklar gösteren bazı hücresel genlerin ve viral RNA polimeraz enzimi alt

ünitelerinden özellikle PA proteinin viral patogenez için belirleyici önemli faktörler arasında olduğu sonucuna varılmıştır.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Borik asit	Merck, Almanya
DAPI(4',6-diamidino-2-fenilindol)	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Fenilindiamin	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glikoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
Higromisin	Multicell, ABD
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
L-Glutamin	Sigma Aldrich, ABD
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD

(N-morpholino)propanesülfonikasit	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Paraformaldehit	Santa cruz, ABD
Polietilenglikol-6000	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma Aldrich, ABD
PIPES	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum fosfat	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Proteinaz-K	Roche, Almanya
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum deoksikolat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletilendiamin	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	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:

BglII, BsmI, DraIII, EcoO109I, EcoRV, PstI (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları genlerin klonlanması çalışmalarında ve elde edilen plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri:

Alkalen Fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase), RNaz, T4 DNA Ligaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs).

Termostabil DNA polimerazlar:

Taq DNA polimeraz (Biotechrabbit, Episozyme veya New England Biolabs) ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 arkea suşundan elde edilen, yüksek doğrulukta sentez özelliğine sahip KOD-plus (ToYoBo) enzimi kullanıldı

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), QPCR *Power SYBR™ Green PCR* (Thermo Fisher) ve *EvaGreen qPCR Master* karışımı (Episozyme), orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Western melezleme ve immünfloresan deneylerinde birincil antikor olarak, fare anti-HA (Millipore: 05-904; Santa Cruz: sc-7392), tavşan poliklonal anti-PA (MyBioSource),fare anti-Aktin (Millipore: MAB-1501) antikorları; ikincil antikor olarak, anti-fare IgG-HRP (Invitrogen/Thermo 31420), anti-tavşan IgG HRP (Invitrogen/Thermo 31423), anti-fare IgG-Alexa 488 (Abcam:ab150117), anti-tavşan IgG-Alexa 568 (Abcam: ab175471) antikorları kullanıldı.

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
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 Santrifüj	Sigma, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Ters/Inverted Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazı	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 Banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
PZR Cihazı	ABI : ABD / Techne : ABD
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
CO_2 etüv	Sanyo, Japonya
QPCR cihazı(CFX PZR)	Bio-Rad, ABD
DP72 Peltier Soğutmalı Kamera Bağlı Floresan Mikroskop	Olimpus, Japonya

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Luria bertani (LB) besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlandı.

5.6.2. Luria bertani agar (LBA) besiyeri

LB sıvı besiyerine % 1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı. LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Gerektiğinde besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonu verecek şekilde 100 mg/ml konsantrasyonda stok ampisilin çözeltisinden eklendi.

5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde besiyeri olarak glikoz konsantrasyonu 1 g/L veya 4.5 g/L olan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (Gibco, ABD) kullanıldı. Önce 4x konsantre stok besiyerleri hazırlandı. 0.2 µm filtre ile steril edildi. Hücre üretme besiyerleri, 50 ml 4x konsantre DMEM üzerine 126 ml steril deiyonize distile su, 20 ml FCS (fetal calf serum), 2 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin (Gibco) ve 1-2 ml % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.6.4. Muhafaza Besiyeri

10 ml 4x konsantre DMEM stok besiyerleri, 0.4 ml % 10 BSA, 0.4 ml x100 vitamin çözeltisi (Gibco), 0.4 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin, 25 µl % 0.25 TCPK tripsin (kimotripsini inaktive etmek için TPCK "*N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone*" ile işlem görmüş tripsin) çözeltisi steril distile su ile 40 ml'ye tamamlandı ve % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi ile pH'si ayarlandı.

5.7. Çözeltiler

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

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

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

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

5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu)

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

5.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml)

0.1 g etidyum bromür, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

5.7.5. %70 Etil alkol

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

5.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)

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

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

Kristal halde fenol, 65 °C'da çözündürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH:8) eklendi ve 30-60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, emülsiyon 4 °C'da bekletildi ve üst

faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve 4 °C'da saklandı. Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanıldı.

5.7.8. 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 deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan T-FTS otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. Kullanılacağı zaman steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında sulandırıldı.

5.7.9. Glikoz çözeltisi (1 M)

90 g glikoz, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Glikoz Mw=180.16)

5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

75 ml deiyonize distile suya 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)

100 g kalsiyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 300 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi. (Kalsiyum klorür Mw = 110.98)

5.7.12. Lamel kapatma çözeltisi

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

5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0.55M)

54.4 g $MnCl_2$.4H2O, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. ($MnCl_2$.4H2O. Mw = 197.9)

5.7.14. % 10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi

5 g (4.72 ml) NP-40, deyonize distile içerisinde çözündürülerek hacmi 50 ml'ye tamamlandı. (NP-40. d = 1.06 g/ml)

5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi

3 g paraformaldehit, 10 ml 0.1 N NaOH içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH'sı 1M HCl ile yaklaşık 7-7.5 olarak ayarlandı (pH kağıdı ile kontrol edildi) ve hacim deiyonize distile suyla 80 ml'ye tamamlandı. Üzerine 20 ml 5x konsantre T-FTS eklendi.

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

30.2 g PIPES, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7.5'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı. (PIPES. Mw = 302.37)

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

40 g PEG-6000, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtre ile filtre edildi.

5.7.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)

% 40 PEG-6000 çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi

0.2 g polietilenimin, deiyonize distile su ile seyreltilerek 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtre ile steril edildi.

5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

29.44 g potasyum asetat, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (Potasyum asetat. Mw= 98.14)

5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)

93,2 g potasyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. (Potasyum klorür. Mw= 74.55)

5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (% 7.5)

7.5 g $NaHCO_3$, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

5.7.23. %10 Sodyum deoksikolat

5 g sodyum deoksikolat, deyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 50 ml'ye tamamlandı.

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

10 g SDS, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 g sodyum hidroksit, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (Sodyum hidroksit. Mw=39.99)

5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M)

36.6 g sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı. (Sodyum klorür. Mw=58.5)

5.7.27. % 0.25 Tripsin çözeltisi

0.25 g tripsin, 100 ml T-FTS içerisinde çözündürüldü ve 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Çözelti 10 ml'lik hacimler halinde -20 °C'da saklandı.

5.7.28. 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 karıştırılarak hazırlandı.

5.7.29. % 10 Tween-20 (w/v)

10 g (9 ml) Tween-20, deiyonize distile su ile karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (Tween-20. d = 1.11 g/ml).

5.8. Tamponlar

5.8.1. 4x Konsantre ayırma jel tamponu (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8)

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

5.8.2. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M PİPES, 2 ml 2.5 M $CaCl_2$, 20 ml 2.5 M KCl ve 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M $MnCl_2$ eklendi, hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.2 µm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0)

5 ml 1 M Tris-Cl, 10 ml 1 M glikoz ve 4 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS)

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

5.8.5. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11.5 ml glasiyal asetik asit, deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. (Potasyum asetat. Mw = 98.14)

5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 3.45 ml % 87'lik gliserin eklenerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.8.7. 10x Konsantre MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit] tamponu

41.8 g MOPS, 700 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı NaOH ile 7.0'ye ayarlandı. Üzerine 20 ml 1 M sodyum asetat, 20 ml 0.5 M EDTA (pH: 8) eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 1litreye tamamlandı. Tampon 0.45 μm fitreden geçirildi.

5.8.8. 4x Konsantre paketleme jel tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8)

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

5.8.9. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)

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

5.8.10. Protein transfer tamponu

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

5.8.11. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0.2 Bromophenol 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 deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 2 ml 2-Merkaptoetanol ile 23 ml % 87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.12. RIFA tamponu (50 mM Tris, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl; % 1 NP-40, % 0.5 Sodyum Deoksikolat; % 0.1 SDS)

5 ml 1 M Tris-Cl (pH:8), 1 ml 0.5 M EDTA (pH:8), 6 ml 2.5 M NaCl, 10 ml % 10 NP-40, 5 ml % 10 Sodyum Deoksikolat ve 1 ml % 10 Sodyum Dodesil Sülfat, deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.13. 2x Konsantre RNA yükleme tamponu

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

5.8.14. Sodyum asetat tamponu (3 M)

12.3 g sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$), 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 5.2 ye ayarlandıktan sonra 50 ml'ye tamamlandı. (Soydum asetat. Mw: 82.03)

5.8.15. 50x Konsantre Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu

242 g Tris, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi

(pH:8.0) eklendi. Elektroforez işleminde 1:50 oranında sulandırıldıktan sonra kullanıldı.

5.8.16. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8.0)

121.1 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Tris. Mw = 121.1)

5.8.17. Tris/ EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)

10 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH: 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0), deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.18. 5x Konsantre Tris-Glisin tamponu (0.125 M Tris,1.25 M Glisin, pH:8.3)

15.15 g Tris ve 93.84 g glisin, deiyonize su içinde çözündürüldü, pH'sı 8.3'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. (Glisin. Mw = 75.07)

5.8.19. 5x Konsantre TBE tamponu

54 g Tris ve 27.5 g borik asit, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 980 ml'ye tamamlandı.Tampon üzerine 20 ml 0.5 M EDTA (pH:8.0) eklendi. Elektroforez çalışmalarında 1:5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

5.8.20. 20x Konsantre TBS tamponu

160 g NaCl, 4 g KCl ve 60 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

5.8.21. TBS ve TBS-T tamponu

50 ml 20x TBS tamponu, deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. TBS-T tamponu için ortama 10 ml % 10 Tween-20 eklendi.

5.9. Virüsler

Çalışmanın belirli aşamalarında insan tipi influenza A/WSN/33/H1N1 (WSN) ve düşük patojenik kuş influenza A/Duck/Pennsylvania / 10,218/ 84 / H5N2 (DkPen) virüsleri kullanıldı. Virüsler, Tsukuba Üniversitesi (Japonya) Enfeksiyon Biyolojisi (Viroloji) laboratuvarından temin edildi. Virüsler spesifik patojen içermeyen (SPF) embriyonlu tavuk yumurtaları veya MDCK *(ing. Madin Darby Canine Kidney)* hücrelerinde çoğaltıldı. Virüs titresi, standart plak testleri ve/veya hemaglütinasyon testleri (Turan ve ark., 1996) ile saptandı.

5.10. Plazmit vektörler

Bu çalışmada bir kısım plazmitler tez kapsamında oluşturulurken, bazı testlerde ticari plazmitler ya da daha önce farklı amaçlarla oluşturulan plazmitler kullanıldı. Çalışmaya konu olan CCL5 (Chemokine (C-C motif) ligand 5), CDKN1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), HLA-B (Major histocompatibility complex, class I, B), IFNA5 (Interferon, alpha 5), IFI27 (Interferon, alpha-inducible protein 27), IFIT1 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1) IFIT3 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3), IFITM3 (Interferon induced transmembrane protein 3), IFNE (Interferon, epsilon) ve OAS1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1) proteinlerini kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulmasında, pCAGGS'den (Niwa ve ark., 1991) türetilen pCHA plazmitinden (Nagata ve ark., 1998) yararlanıldı. 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) ve (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), pCAGGS-PB2(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) *Renilla reniformis* lusiferaz enzimi kodlayan pRL(Promega) ve/veya salgı formunda embriyonik alkalen fosfataz (*İng*.

secreted embryonic *alkaline* phosphatase: SEAP) enzimi kodlayan pSEAP (Clontech) plazmit vektörlerinden yararlanıldı. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz alt birimi PA proteininin HEK293 hücrelerinde transkripsiyon ve/veya translasyondaki etkilerini belirlemek için HA etiketli insan beta-aktin proteinini kodlayan pCHA-ACTB plazmiti (Gelmez, 2019) kullanıldı.

5.11. Bakteriler

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında *Escherichia coli* DH5α ve Mach1 bakteri ırkları kullanıldı.

5.12. Memeli Hücre Hatları

Çalışmada HeLa (insan servikal kanser hücreleri) ve HEK293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. HeLa hücreleri ilk kez 1951 yılında Henrietta Lacks isimli serviks kanseri hastasının kanserli dokusundan George Gey (Jones ve ark., 1971) tarafından izole edilmiş ve üretilmiştir. Hastanın ad ve soyadının ilk harfleri hücre hattının ismi olmuştur. HEK293 hücreleri ise, 1970'li yılların başlarında Graham ve Alex Van der Eb (Graham ve van der Eb, 1973; Graham ve ark., 1977) tarafından kültüre edilmiştir. Hızlı çoğalmaları ve transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattı olmuştur.

5.13. DNA Analizleri İçin Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1-1.5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Analiz edilecek DNA moleküllerinin boyutuna göre 1 ya da 1.5 g agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C'a düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel, donduktan sonra 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. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.14. RNA Analizleri İçin Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

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

5.15. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

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

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

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

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

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

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

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *Escherichia coli* DH5α veya Mach1 ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C'da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürden tek bir koloni alındı ve 5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Kültür 37 °C'da 150 dev./dk çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23 °C'da 150 dev./dk çalkalanma hızında üremeye bırakıldı. Kültür, OD_{600} = 0.25 - 0.3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 4000 dev./dk hızda santrifüj edilerek bakteriler çökeltildi. Çökelti, 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4000 dev./dk hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere – 80 °C'da saklandı (Inoue ve ark., 1990).

5.17. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması

Hücreler 10 ml besiyeri içeren 10 cm'lik petri kutularında standart kültür koşullarında (37 °C, % 5 CO_2, % 95 nispi nem) üretildi ve 3-4 gün aralıklarla pasajları yapıldı. Doygun kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve 37 °C'da 5-10 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler 5 ml besiyerinde süspanse edildi. 0.25-0.5 ml hücre süspansiyonu 10 ml taze besiyeri içeren petrilere aktarıldı ve üremeye bırakıldı.

5.18. Genlerin Kantitasyonu için RNA'ların Ekstre Edilmesi, cDNA'ların Hazırlanması ve Kontrolleri

İnfluenza A virüsüleri ile enfekte edilen ya da viral RNA polimeraz alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde HEK293 hücrelerinden total RNA'lar ekstre edildi. RNA'lar agaroz jel elektroforezi tekniği ile kontrol edildikten sonra oligo-dT primerler kullanılarak cDNA'ların hazırlanmasında kullanıldı. Farklı

koşullarda hazırlanan cDNA'lardan interferon yolağı ile ilişkili genlerin miktarları gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kantitatif-PZR) ile saptandı.

5.18.1. HEK293 Hücrelerinin İnfluenza Virüsleri ile Enfekte Edilmesi

HEK293 hücreleri 12 kuyulu plaklara 5-6 x10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 20-24 saat standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen tamponlanmış DMEM besiyeri ile iki kez yıkandı. Tek tabaka halinde üreyen hücrelere %1 BSA içeresinde ortalama 1 moi/hücre (*İng. Moi:multiplicity of infection*) olacak şekilde seyreltilen İnfluenza A virüsü (WSN veya DkPen) örneklerinden 200 µl eklendi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da virüslerin tutunması için 30 dakika bekletildi. Daha sonra virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve hücrelere 1 ml muhafaza besiyeri eklendi. Enfekte kültürler 8 saat inkübe edildi ve sonra hücrelerden total RNA ekstraksiyonu yapıldı.

5.18.2. HEK293 Hücrelerinin Plazmit Vektörler ile Transfekte Edilmesi

Plazmit DNA'larının HEK293 hücrelerine transfeksiyonunda polietilenimin (PEI) (Longo ve ark., 2013) kullanıldı. Hücreler 12-kuyulu kültür plaklarına 1x10^5 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 20-24 saat boyunca standart kültür koşullarına üremeye bırakıldı. Plaklarda üretilen hücrelere 1-2 µg DNA transfekte edildi. Transfeksiyonda pCAGGS-PA(D), pCAGGS-PB1(D), pCAGGS-PB2(D), pCAGGS-PA(WSN), pCAGGS-PB1(WSN), pCAGGS-PB2(WSN) plazmit vektörleri kullanıldı. Plazmit DNA'ları Opti-MEM (Gibco) içerisinde 20 ng/µl konsantrasyona seyreltildi. Aynı şekilde 40-60 ng/µl konsantrasyonda Opti-MEM içerisinde hazırlanan polietilenimin çözeltisi ile DNA örnekleri eşit hacimlerde karıştırıldı. DNA/PEI komplekslerinin oluşması için örnekler oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi. Kültürlerin besiyerleri 1 ml taze besiyerleri ile değiştirildi ve DNA/PEI kompleksleri besiyerlerine eklendi. Transfeksiyondan sonra kültürler 36-40 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi ve sonrasında hücrelerden total RNA ekstraksiyonu yapıldı.

5.18.3. Hücrelerden Total RNA Ekstraksiyonu

Virüsler ile enfekte edilen ya da plazmit vektörler ile transfekte edilen hücrelerden total RNA izolasyonunda ticari RNA ekstraksiyon kiti (Qiagen Cat No./ID: 74104)

kullanıldı. RNA izolasyonunda üretici şirketin önerdiği yöntem izlendi. Kısaca, 12 kuyulu plaklarda her bir kuyuda üretilen hücreleri parçalamak için 350 µl *RLT Plus* çözeltisi eklendi ve parçalanan hücreler 1,5 ml'lik tüplere alındı. Toplanan örnekler 5 defa insülin iğnesinden geçirildi ve DNA ayrıştırma spin kolonlarına aktarıldı. Spin kolonları 8000g hızda 1 dakika santrifüj edildi. Toplanan sıvı örneklerine 350 µl %70 etanol eklendi ve RNA spin kolonlarına aktarıldı. Spin kolonları 8000g hızda hızda 1 dakika santrifüj edildi. Kolona bağlanan RNA örnekleri yıkama çözeltileri ile yıkandıktan sonra elüsyon tamponu ile geri kazanıldı. Ekstre edilen RNA örnekleri reverz (ters) transkripsiyonda kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

5.18.4. 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 gr agaroz 94 ml distile su içerisinde, mikrodalga fırınında 3 dakika süre ile kaynatıldı ve sonrasında 2 ml TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 ºC'a kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 4 ml ticari sodyum hipoklorit eklendi ve jel kasetlerine döküldü. Katılaşan agaroz jel 1x TAE tamponuna alındı. RNA örnekleri 2x RNA yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı, 65 ºC'da 5 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 45-50 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrasında jeller 0,5 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.

5.18.5. cDNA'ların Elde Edilmesi (Revers Transkripsiyon)

Hücrelerden ekstre edilen total RNA'lardan reverz transkripsiyon ile cDNA'lar elde edildi. Revers transkripsiyon reaksiyonu 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 0.2 ml'lik PZR tüplerine yaklaşık 1µg total RNA ve 100 pmol oligo dT primer eklendi ve hacim 20 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 °C'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra ortama aşağda verildiği şekilde hazırlanan

reaksiyon karışımından 20 µl eklendi ve reaksiyon 45 °C'da 60 dakikada tamamlandı. Sonrasında enzimler 10 dakika 80°C'da inaktive edildi ve elde edilen cDNA'lar, 1/5 oranında TE tamponunda seyreltilerek kantitatif-PZR deneylerinde kalıp olarak kullanıldı.

Reaksiyon Karışımı		x1	xN
Reaksiyon tamponu (x10)	:	4.0 µl	Nx 4.0 µl
dNTP karışımı (10 mM)	:	4.0 µl	Nx 4.0 µl
RNaz inhibitörü (40U/ µl)	:	1.0 µl	Nx 1.0 µl
Reverz Transkriptaz (100 U/ µl)	:	2.0 µl	Nx 2.0 µl
Deiyonize distile su	:	9.0 µl	Nx 9.0 µl
Toplam hacim	:	20.0 µl	Nx 20.0 µl

5.18.6. cDNA'ların Aktin Beta (ACTB) ve Porfobilinojen Deaminaz (PBGD) Genleri Üzerinden Kontrol Edilmesi

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

Reaksiyon Karışımı		
cDNA	:	2,0 µl
İleri primer (10 pMol/µl)	:	1,0 µl
Geri Primer (10 pMol/µl)	:	1,0 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	1,0 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	:	2,0 µl
Tampon (x10)	:	2,0 µl
Deiyoize distile su	:	10,9 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	:	0,1 µl
Toplam hacim	:	**20,0 µl**

PZR, 95 °C sıcaklıkta 3 dakikalık ön denatürasyon sonrasında, 95 °C'da 15 saniye, 53 °C'da 20 saniye ve 72 °C'da 30 saniye şeklinde 35 döngü halinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek sonuçlar değerlendirildi.

5.19. PZR Dizin Analizi ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İnterfeon bağışıklık yanıtında yer alan genlerin ekspresyonunu belirlemek için Qiagen şirketi (Qiagen, Hilden, Almanya) tarafından geliştirilen ve "Bio-Rad CFX96" cihazı ile uyumlu 96 kuyucuklu "*RT² Profiler PCR Array* " (PAHS-016ZD-6) plakaları kullanıldı. Bu qPZR dizin analizi (PCR Array) kiti interferon α ,interferon β, interferon reseptörleri ve interferon sinyal yolağı ile ilişkili proteinleri kodlayan genler için tasarlanmıştır. Plakalarda interferon/interferon reseptörleri genleri ve interferon ile ilişkili 84 farklı gen, 5 housekeeping gen, 3 pozitif kontrol, 3 revers transkripsiyon kontrolü ve 1 genomik DNA kontaminasyon kontrolü için uygun primerleri içeren alanlar bulunmaktadır.

Virüsler ile enfekte edilen veya viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde interferonlar ile ilişkili genlerin ve housekeeping genlerin transkript düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile analiz edildi. qPZR testlerinde *Power SYBR Green PCR Master* karışımı (Thermo Fisher) ve *EvaGreen qPCR Master* karışımı (Episozyme, İstanbul, Türkiye) kullanıldı. Her bir PZR tüpünde bulunan 5 µl primer karışımına 2.5 µl cDNA ve 7.5 µl x2 SYBR Green Master karışımı eklendi. Kantitatif PZR koşulları; bir döngü "94 °C'da 10 dakika", 45 döngü "95 °C'da 10 saniye, 58 °C'da -30 saniye 72 °C'da 15 saniye" ve sonrasında erime eğrisi analizi şeklinde uygulandı. Transkriptlerin miktarları, STAT3 geninin transkript miktarı ile normalleştirildi.

5.20. Kantitatif PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kantitatif PZR testlerinde Bio-Rad marka CFX96 model cihaz kullanıldı ve verilerin analizinde de Bio-Rad gerçek zamanlı PZR analiz programından yararlanıldı. Sonuçlar konsantrasyonları bilinen insan beta aktin geni cDNA'sı ile oluşturulan standart eğri üzerinden değerlendirildi. Elde edilen transkript değerleri, STAT3 geninin transkript değerleri ile normalize edilerek, her bir gen için rölatif ekspresyon değerleri ortaya

kondu ve rölatif ekspresyon değerleri üzerinden bar grafikleri hazırlandı. Rölatif ekspresyonu değerleri ısı haritaları (heat map) şeklinde de verildi. Farklı gruplar arasında transkript düzeyi bakımından benzerlik ya da farklılık gösteren genler için Venn diyagramları oluşturuldu. Isı haritaları ve Venn diyagamlarının oluşturulmasında çevrimiçi harita oluşturucu yazılımlardan yararlanıldı (https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HEATMAP/heatmap.html : erişim tarihi 01.06.2020).

5.21. İstatistiksel Analiz

Deney grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak saptanmasında SPSS'de varyans analizi (Tek yönlü ANOVA ile Newman-Keuls post testi) kullanılarak değerlendirildi. $P \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.22. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin Memeli Ekspresyon Vektörüne Klonlanması

RT² Profiler PCR Array kiti ile gerçekleştirilen qPZR testleri sonucunda İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen ya da viral PB2, PB1 ve PA (WSN veya DkPen) proteinleri ile transfekte edilen hücrelerde farklı ekspresyon düzeyleri saptanan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genleri için, HEK293 hücrelerinden hazırlanan bu genlere ait cDNA'ların pCHA plazmitine klonlanması ile ekspresyon vektörleri elde edildi. Bunun için aşağıda verilen yöntem izlendi.

5.22.1. HEK293 Hücrelerinden Total RNA'nın İzole Edilmesi

HEK293 hücreleri D'MEM besiyeri içeren 6 cm'lik petri kutusuna ortalama $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler standart kültür koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 5-10 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler 3 ml besiyerinde süspanse edildi.1000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek çökeltildi. Hücrelerden total RNA ekstraksiyonunda **5.18.3**'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. 5.18.4) 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.

5.22.2. cDNA'larının Hazırlanması ve Genlerin 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. 1.5 ml'lik plastik tüpe yaklaşık 500 ng total RNA ve 50 pmol oligo dT primer eklendi ve hacim 12.5 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 °C'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandı ve sonrasında buz üzerine alındı. Daha sonra reaksiyon ortamına sırasıyla 4 µl 5x konsantre reaksiyon tamponu, 0.5 µl (40U/µl) RNaz inhibitörü (Biotechrabbit), 2 µl (10 mM) dNTP karışımı 1 µl (200U µl) reverz transkriptaz enzimi (Biotechrabbit) eklendi. Reaksiyon 45°C'da 60 dakikada tamamlandı. Reverz transkriptaz enzimini inaktive etmek için ortam 80 °C'da 10 dakika bekletildi. Elde edilen cDNA insan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı. İnsan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında ve dizi analizlerinde kullanılan primerlerin oluşturulmasında, NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerden yararlanıldı. (CCL5 / NCBI Reference Sequence: NM_002985.3, CDKN1B / NCBI Reference Sequence: NM_004064.4, HLA-B / NCBI Reference Sequence: NM_005514.8, IFNA5/ NCBI Reference Sequence: NM_002169.3, IFI27-v.1 / NCBI Reference Sequence: NM_001130080.3, IFIT-v.1 / NCBI Reference Sequence: NM_001548.5, IFIT3/ NCBI Reference Sequence: NM_001549.6, IFITM3-v.1 / NCBI Reference Sequence: NM_021034.3, IFNE / NCBI Reference Sequence: NM_176891.4 ve OAS1 / NCBI Reference Sequence: NM_016816.4). Bu gen dizileri üzerinden oluşturulan primerler Tablo 5.1'de verildi.

Tablo 5-1 İnsan CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 genlerinin PZR ile çoğaltılmasında ve bu genlerin DNA dizi analizlerinde kullanılan oligonükleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
ACTB 280-For	5′-CCACACCTTCTACAATGAGC-3′
ACTB 552-Rev	5′-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3′
CCL5 For	5’-ATCATGAAGGTCTCCGCGGCAGC- 3’
CCL5 Rev	5’- ATCTAGCTCATCTCCAAAGAGTTG- 3’
CDKN1B For	5’-ATCATGTCAAACGTGCGAGTGTCT-3’
CDKN1B Rev	5’-ATCACGTTTGACGTCTTCTGAGGC-3’
HLA-B For	5’-ATCATGCTGGTCATGGCGCCCCG-3’
HLA-B Rev	5’-ATCAAGCTGTGAGAGACACATC-3’
IFNA5 For	5’-ATCATGGCCTCGCCCTTTGCTTTACT-3’
IFNA5 Rev	5’-ATCATTCCTTCCTCCTTAATC-3’
IFI27 For	5’-ATCATGGAGGCCTCTGCTCTCAC-3’
IFI27 Rev	5’- ATCTAGTAGAACCTCGCAATGAC-3’
IFIT1 For	5’- ATCATGAGTACAAATGGTGATGA-3’
IFIT1 Rev	5’- ATCATAAGGACCTTGTCTCACAG -3’
IFIT3 For	5’-ATCATGAGTGAGGTCACCAAGAATTC-3’
IFIT3 Rev	5'-ATCAGTTCAGTTGCTCTGAGTTAGAG-3'
IFITM3 For	5’-ATC ATGAATCACACTGTCCAAAC-3’
IFITM3 Rev	5’-ATCTATCCATAGGCCTGGAAGAT-3’
IFNE For	5’-ATCATGATTATCAAGCACTTCTTTG-3’
IFNE Rev	5’-ATCACCTCGGGCTTCTAAACTCTG-3’
OAS1 For	5’-ATCATGATGGATCTCAGAAATACCCC-3’
OAS1 Rev	5’-ATCAGAGGATGGTGCAGGTCCAGT-3’

cDNA’larının çoğaltılmasında kullanılan sentetik oligonukleotid primerler PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendikten sonra deneylerde kullanıldı. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C’da 1 saat bekletildi. Sonrasında 85 °C’da 5 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı.

Reaksiyon Karışımı	
İleri primer :	2 µl (200 pMol)
Geri Primer :	2 µl (200 pMol)
rATP karışımı (10 mM) :	8 µl
Reaksiyon tamponu (x10) :	2 µl
Deiyonize distile su :	5.5 µl
T4 polinukleotid kinaz (10U/µl) :	0.5 µl
Toplam hacim :	20 µl

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

Reaksiyon Karışımı	
cDNA :	3 µl
Fosforillenmiş primer çifti (10 pMol/µl) :	2 µl
dNTP karışımı (2,5 mM) :	3 µl
$MgSO_4$ (25 mM) :	2 µl
Tampon (x10) :	4 µl
Deiyoize distile su :	25.5 µl
KOD-plus (1U/µl) :	0.5 µl
Toplam hacim :	40.0 µl

Reaksiyon koşulları, CCL5 geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 33 döngü, 95°C-15 sn / 56°C-15 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; CDKN1B geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 33 döngü, 95°C-15 sn / 54°C-15 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; HLA-B geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 34 döngü, 95°C-20 sn / 54°C-25 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; IFNA5 geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 34 döngü, 95°C-20 sn / 54°C-25 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; IFI27 geni için ise 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 33 döngü, 95°C-15 sn / 50°C-15 sn / 68°C-25 sn ve bir döngü 68°C-10 dk;IFIT1 96 °C da 4 dakika ön denatürasyondan sonra 5 döngü, 95°C-15 sn / 48°C-10 sn / 68°C-1 dk ve 33 döngü, 95°C-15 sn / 54°C-10 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk bir döngü; IFIT3 geni için 95 °C da 3 dakika ön

denatürasyondan sonra 34 döngü, 95°C-20 sn / 54°C-25 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; IFITM3 geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 33 döngü, 95°C-15 sn / 54°C-15 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; IFNE geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 33 döngü, 95°C-15 sn / 54°C-15 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk; ve OAS1 geni için 95 °C da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 4 döngü, 95°C-15 sn / 57°C-30 sn / 68°C-2 dk ve 33 döngü, 95°C-20 sn / 55°C-15 sn / 68°C-1 dk ve bir döngü 68°C-10 dk bir döngü olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.22.3. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 µl'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler oda sıcakığında 14.000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10 dakika buz üzerinde bekletildi ve 4 °C'da 15 dakika 14.000 dev./dk hızda santrifüj edildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 20 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bunun için örneklerin üzerine 4 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. 20-30 µl elüsyon tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.22.4. pCHA plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması

qPZR testleri sonucunda ekspesyon düzeylerinde belirgin farklılıklar görülen genler üzeriden kodlanan proteinlerin daha ileri aşamada influeza A virüsü replikasyonuna etkilerin araştırma amacıyla, bu genlere ait cDNA'lar memeli hücrelerinde ekpresyon vektörüne klonlandı. Çok sayıda farklı proteinin Western

melezleme ve immünfloresans teknikler ile analizinde kullanılacak antikorların temin edilmesindeki zorluklar gözönünde bulundurularak, söz konusu genler HA-uzantılı (HA-Tag) protein kodlayacak şekilde pCHA plazmit vektörüne klonlandı. Klonlama işlemlerinde, genlerin okuma çerçevelerinin pCHA plazmitinde bulunan HA-uzantısını kodlayan DNA dizinin kodon çerçevesi ile uygunluğu dikkate alındı. Bu nedenle pCHA plazmit vektörü, EcoRV restriksiyon enzimi hedef bölgesinden kesilerek doğrusal hale getirildi. Bunun için 5 µg pCHA plazmit DNA'sı, deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre NEBuffer 3.1 (NEB) ve 1 µl (10U) EcoRV restriksiyon endonükleazı eklendi ve 37°C'da 1 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kesilen DNA örneği fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Çökelti 45 µl TE içerisinde çözündürülüp, SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) ile defosforile edildi. Bu işlem için örnek üzerine 5 µl 10x konsantre SAP tamponu ve 2U SAP enzimi (1U/µl -Fermentas) eklendikten sonra 1 saat 37 °C'da inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA'sı tekrar fenol: kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.22.5. Doğrusal Hale Getirilen pCHA Plazmit Vektörünün cDNA'ları ile Ligasyonu ve Transformasyonu

Doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* cDNA örneklerinin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 20 µl hacim içerinde T4-DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 25-30 ng pCHA plazmit DNA'sı, 30-50 ng arasında değişen miktarlarda cDNA ile karıştırıldı ve ortam hacmi 18 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 2 µl 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 1 µl (1U) T4 DNA ligaz (TaKaRa) enzimi eklendi. Ligasyon işlemi 15 °C'a ayarlı PZR cihazında 15-16 saate gerçekleştirildi. Transformasyon için ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Kompetent hale getirilen *E. coli* Mach1 ya da DH5α hücrelerden 150 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 75 sn 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Transformasyon ortamına 750 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl, antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37°C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, pozitif transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlanarak küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

5.22.6. Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması

Transformasyon sonrası, her bir ligasyon örneği için katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden ortalama 10-15 koloni, steril kürdan ile alınarak 5 µl deiyonize distile su içerinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örnekler PZR cihazında 95 °C'da 5 dk bekletildikten sonra buz üzerine alındı. Örneklerin üzerine 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 1 µl (10 pmol/µl) hedef bölgesi vektör içerisinde olan ileri primer (pCHA-Seq-For: 5'-GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA'-3), 1 µl (10 pmol/ µl) hedef bölgesi cDNA içerisinde olan geri primer (CCL5 Rev, CDKN1B Rev, HLA-B Rev, IFNA5 Rev, IFI27 Rev, IFIT1 Rev, IFIT3 Rev, IFITM3 Rev, IFNE Rev veya OAS1 Rev), 1 µl dNTP (2 mM), 2 µl $MgCl_2$ (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 / 50-55°C'da 15 sn / 72°C'da1-2 dakika olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.22.7. Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu

Koloni-PZR sonucunda pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 5 ml doygun kültürler hazırlandı. Bu koloniler steril kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C'da 120 dev./dk çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 6000 dev./dk hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltisi, 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve

karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4°C'da, 15000 dev./dk hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'sını içeren üst sıvı üzerine 2.5 hacim etil alkol 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 50-100 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.

5.22.8. Plazmit DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

pCHA plazmitine belirli cDNA'ların klonlanması ile elde edilen rekombinant ekspresyon vektörleri, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapıldı. DNA örneklerinden 0.5-1 µg alındı ve hacmi deiyonize distile ile 18 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 2 µl kullanılan enzim için uygun x10 konsantre 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. Plazmit DNA'larının kesilmesinde kullanılan restriksiyon enzimleri **Tablo 5.2**'de verildi.

Tablo 5-2. Plazmit DNA'ları ve bu DNA'ların kontrolünde kullanılan restriksiyon enzimleri.

Plazmit DNA'ları	Restriksiyon Enzimleri
pCHA-CCL5	PZR kontrolü
pCHA-CDKN1B	PstI
pCHA-HLA-B	BglII
pCHA-IFNA5	PZR kontrolü
pCHA-IFI27	PstI
pCHA-IFIT1	PstI
pCHA-IFIT3	PstI
pCHA-IFITM3	EcoRV
pCHA-IFNE	BglII
pCHA-OAS1	PstI

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

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

5.23. Delesyonlu ve Kimerik PA Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

Transfekte HEK293 hücrelerde İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi PA alt ünitesinin sentez edilmesinin gen ekspresyonuna etkilerini saptamak için; PA proteinin sadece amino-terminal ya da karboksi-terminal yarımlarını kodlayan delesyonlu plazmitler ve WSN ile DkPen PA proteinlerinin amino-terminal ve karboksi-terminal yarımları karşılıklı değiştirilmiş kimerik proteinler kodlayan plazmitler oluşturuldu.

Delesyonlu PA proteinleri kodlayan plazmitler, pCAGGS-PA(D) ve pCAGGS-PA(W) plazmitleri (Pham ve ark., 2018) üzerinden inverz (ters) PZR ile elde edildi. İnfluenza A virüsü DkPen virüsüne ait delesyonlu PA proteinleri kodlayan pCAGGS-nPA(D) ve pCAGGS-cPA(D) vektörlerini oluşturmak için **Tablo 5-3**'de dizileri verilen Vect-For/nPA-D-Rev ve cPA-D-For/Vect-Rev primer çiftleri; influenza A WSN virüsüne ait delesyonlu PA proteinlerini kodlayan pCAGGS-nPA(W) ve pCAGGS-cPA(W) vektörlerini oluşturmak için ise Vect-For/nPA-W-Rev ve cPA-W-For/ Vect-Rev primer çiftleri kullanıldı. Ters PZR ile çoğaltılan DNA fragmentleri yukarıda anlatıldığı şekilde (**bkz. 5.22.3**) agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıdı. Saflaştırılan DNA fragmentleri T4 DNA ligaz enzimi ile halkasal şekle dönüştürüldü (self ligasyon).

Tablo 5-3 Delesyonlu ve kimerik PA proteini kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulmasında kullanılan oligonukleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
Vect-For :	5′-AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATG-3′
nPA-D-Rev :	5′-CTAGTTCTTTGTCTTTGGGATCTTC-3
cPA-D-For :	5′-ATGAAGAAAACAAGCCAATTGAAG-3′
Vect-Rev :	5′-GGCGGCGCGAGCTCGAGG-3′
nPA-W-Rev :	5′-CTAATTTTTAGTCCTTGGAATTTTCTC - 3′
cPA-W-For :	5′-ATGAAGAAAACGAGTCAGTTAAAG - 3′

Kimerik PA proteinleri kodlayan plazmit vektörler [pCAGGS-PA(W-D) ve pCAGGS-PA(D-W)], pCAGGS-PA(D) ve pCAGGS-PA(W) plazmit vektörlerinden yararlanılarak alt klonlama tekniği ile oluşturuldu. Bunun için pCAGGS-PA(D) ve pCAGGS-PA(W) plazmitleri önce BsmI enzimi (New England Biolabs) daha sonra DraIII enzimi (New England Biolabs) ile kesildi. Oluşan DNA fargmentleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. PA proteinin karboksi terminal yarımlarını kodlayan DNA fragmentleri jelden saflaştırılan büyük fragmentler (plazmit) ile çapraz şekilde ligasyona uğratıldı. Ligasyon işlemi T4 DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Doğru plazmit taşıyan koloniler koloni-PZR ile seçildi (**bkz.5.22.6**). Doğru plazmit taşıyan kolonilerden hazırlanan plazmit DNA'lar DNA dizi analizi kontrol edildi.

5.24. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğru olduğu saptanan plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı ve memeli hücre kültürlerinde kullanılabilecek kalitede saflaştırıldı. Bu amaçla plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37°C'da bir gece inkübe edilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml ampisilin içeren taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37°C' da 120 dev./dk çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında Qiagen orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA 500 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA miktarı ve kalitesi, 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Plazmit DNA'nın doğruluğu **5.22.8**'de belirtildiği şekilde restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol edildi ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20°C'da saklandı.

5.25. pCHA Plazmitine Klonlanan İnsan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Tekniği ile Analizi

pCHA plazmit vektörlerinde klonlanan insan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genlerinin anlatım yapıp yapmadığı, transfeksiyon etkinliği yüksek olan HEK293 hücrelerinde Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu amaçla plazmit DNA'ları HEK293 hücrelerine transfekte edildi ve bu hücrelerden hazırlanan protein örnekleri, SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelendi.

5.25.1. HEK293 Hücrelerinin Plazmitler ile Transfeksiyonu ve Hücre Lizatlarının Hazırlanması

HEK293 hücreleri ($1x10^5$ hücre/kuyu) D'MEM içeren 12-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler **5.18.2**'de anlatıldığı şekilde 1-2 µg plazmit DNA ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası kültürler 48 saat 37°C'da inkübe edildi. Daha sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler T-FTS ile bir kez yıkandı. Hücreler 200 µl x1 konsantre SDS-örnek

yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve poliakrilamid jel elektroforezi deneylerinde kullanıldı.

5.25.2. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x0.8 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); 2 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.5 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 2.5 ml deiyonize distile su, 60 µl APS (%10 w/v) ve 30 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 300-500 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su alınarak ikinci bölüm jel için hazır hale getirildi. % 5'lik akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 1 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1.25 ml 4X konsantre paketleme jel tamponu, 2.75 ml deiyonize distile su, 60 µl APS (%10 w/v) ve 30 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı.

5.25.3. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi

Yukarıda (**bkz.5.25.1**) anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre lizatları 5 dakika suda tutularak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler, 10-15 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi, poliakrilamid jel elektroforez tamponu ile dolu tank içerisinde ilk 20 dakika 40 volt, daha sonra 80 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.

5.25.4. 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 pCHA plazmit vektöründe klonlanan dolayısıyla HA uzantısı taşıyan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* proteinleri kodlayan genlerin analizinde, fare orijinli monoklonal anti-HA antikorları (Santa Cruz, sc-7392) kullanıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar bir kez TBS-T, iki kez TBS ile 20'şer dakika yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar TBS tamponunda 1/7500 oranında seyreltilen HRP konjugeanti-fare IgG (Invitrogen/Thermo; 31420) antikoru ile 30 dakika muamele edildi. Sonrasında membranlar tekrar bir kez TBS-T, iki kez TBS ile 20'şer dakika yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (H&C, RPN2232) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.26. pCHA Plazmiti Üzerinden Kodlanan İnsan Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmünfloresans Yöntemle İncelenmesi

pCHA plazmit vektörüne klonlanan insan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genleri tarafından kodlanan proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının saptanmasında HeLa hücrelerinden yararlanıldı.

5.26.1. 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, **5.18.2**'de anlatıldığı şekilde 1.5 µg plazmit DNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-48 saat sonra plazmit vektör üzerinden kodlanan proteinler immünfloresans yöntem ile analiz edildi.

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

Plazmit DNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücreleri 10 dakika T-FTS ile yıkandı ve sonrasında % 3 paraformaldehid çözeltisi içerisinde 20 dakika oda sıcaklığında bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler iki kez 10 dakika T-FTS ile yıkandı. 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 1:500 oranında seyreltilerek hazırlanan primer antikorların etkisine bırakıldı. Primer antikor olarak HA uzantısı taşıyan proteinleri için fare monoklonal anti HA antikorları kullanıldı. HA uzantılı CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE veya OAS1kodlayan plazmitler ile İnfluenza A virüsü PA proteini kodlayan plazmitin birlikte transfekte edildiği hücre örneklerinde, anti-HA antikoru ile birlikte tavşan anti-PA poliklonal antikoru da kullanıldı. Hücreler üç kez 10 dakika T-FTS içerisinde tutularak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı ve ikinci kez % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 20 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 1/1000 seyreltmede DAPI çözeltisi 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.

5.27. pCHA Plazmitine Klonlanan Genler Tarafından Kodlanan İnterferon Yolağı ile ilişkili İnsan Proteinlerinin İnflueza A Virüs RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması

Virüs ile enfekte ya da viral RNA polimerz enzimini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde ekspresyon düzeyi bakımından belirgin farklılıklar gösteren interferon yolağı ile ilişkili genler 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 kullanılak araştırıldı. Bunun için, HEK293 hücreleri 24 kuyulu plaklara $5x10^4$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve hücreler 20-24 saat süre ile standart kültür koşullarında üretildi. Her bir kuyuda üretilen hücreler için, Tablo 5-4'de verilen miktarlarda WSN ya da DkPen virüsü minireplikonunu oluşturan plazmitlerin (pHH21-vNS-luc, pRL, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PB2, pCAGGS-PA ve pCAGGS-NP) ve belirli miktarlarda (30 ng ya da100 ng) insan proteini kodlayan bir plazmitin karışımı hazırlandı ve total plazmit miktarı pCAGGS plazmit vektörü ile 250 ng'a tamamlandı. Hazırlanan plazmit karışımları PEI kullanılarak **(**bkz.5.18.2**)** HEK293 hücrelerine transfekte edildi.

Tablo 5-4 İnfluenza virüsü minireplikon testlerinde kullanılan, WSN ve DkPen minireplikonunu oluşturan plazmitler, insan proteinlerini (CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3 , IFNE ve OAS1) kodlayan plazmitler ve 24-well plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda her bir kuyucuk için kullanılan plazmit miktarları.

İnfluenza A/WSN minireplikonu:

Plazmitler		**Miktar (ng/kuyu)**
pHH21-vNS-luc	:	5
pRL	:	2
pCAGGS-PB1(W)	:	3
pCAGGS-PB2(W)	:	3
pCAGGS-PA(W)	:	1
pCAGGS-NP(W)	:	5
pCAGGS	:	131-231
pCHA-CCL5	:	30/100
pCHA-CDKN1B	:	30/100
pCHA-HLA-B	:	30/100
pCHA-IFNA5	:	30/100
pCHA-IFI27	:	30/100
pCHA-IFIT1	:	30/100
pCHA-IFIT3	:	30/100
pCHA-IFITM3	:	30/100
pCHA-IFNE	:	30/100
pCHA-OAS1	:	30/100

Tablo 5-4 (devamı) İnfluenza virüsü minireplikon testlerinde kullanılan, WSN ve DkPen minireplikonunu oluşturan plazmitler, insan proteinlerini (CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3 , IFNE ve OAS1) kodlayan plazmitler ve 24-well plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda her bir kuyucuk için kullanılan plazmit miktarları.

İnfluenza A/DkPen minireplikonu:

Plazmitler		Miktar (ng/kuyu)
pHH21-vNS-luc	:	5
pRL	:	2
pCAGGS-PB1(D)	:	10
pCAGGS-PB2(D)	:	10
pCAGGS-PA(D)	:	3
pCAGGS-NP(D)	:	10
pCAGGS	:	131-231
pCHA-CCL5	:	30/100
pCHA-CDKN1B	:	30/100
pCHA-HLA-B	:	30/100
pCHA-IFNA5	:	30/100
pCHA-IFI27	:	30/100
pCHA-IFIT1	:	30/100
pCHA-IFIT3	:	30/100
pCHA-IFITM3	:	30/100
pCHA-IFNE	:	30/100
pCHA-OAS1	:	30/100

Transfeksiyon sonrası hücreler standart kültür koşullarında inkübe edildi Transfekte kültürler 48 saat standart kültür koşullarda inkübe edildikten sonra, 100 µl Renilla 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. Aynı lizatlarda normalizasyon için kullanılan renilla lusiferaz enzimi aktivitesi ölçüldü. Bunun için hücre lizatından 3 µl alınarak 20 µl renilla lusiferaz substratı üzerine eklendi ve 3 saniye süre ile luminesans ölçüldü. Lusiferaz aktivite değerleri Renilla lusiferaz değerlerine oranlanarak sonuçlar normalize edildi. Farklı miktarlarda insan proteini (*CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1*) sentez edilen hücrelerde infuenza A virüsü RNA polimeraz aktiviteleri lusiferaz belirteç enzimi aktivitesi temel alınarak değerlendirildi. Bazı deneylerde normalizasyon için renilla lusiferaz yerine pSEAP plazmiti üzerinden kodlana SEAP (*İng. Secreted embryonic alkaline phosphatase*)

enzimi kullanıldı. Bu durumda transfeksiyon deneylerinde pRL plazmit vektörü yerine pSEAP plazmit vektörü transfeksiyon karışımına eklendi. SEAP aktivitesini belirlemek için inkübasyondan 24 saat sonra kültürlerden 100 µl besiyeri örnekleri alındı. Bu örneklerde kontrol amaçlı kullanılan pSEAP plazmiti üzerinden SEAP aktivitesi ölçüldü.

5.28. İnfluenza A virüsü PA Proteinlerinin Transkripsiyon ve/veya Translasyon Üzerindeki Etkilerinin Belirlenmesi

İnfluenza PA proteinlerini viral RNA polimeraz enzimini oluşturan üç altbirimden biridir. Bu proteininin hücrelerde tek başına ya da PB1 ve PB2 proteini ile birlikte sentez edildiğinde konak hücrelerde transkripsiyon ve/veya translasyonu nasıl etkilediği sorusuna yanıt arandı. Deneylerde iki farklı tip influenza A virüsü (WSN ve DkPen) doğal PA proteinlerinin yanısıra, kimerik PA proteinleri (PA/W-D ve PA/D-W) ve delesyonlu PA proteinlerinin (nPA/W, cPA/W, nPA/D, cPA/D) transkripsiyon ve/veya translasyon üzerine etkileri araştırıldı. Bunun için iki farklı yol izlendi. Birincisi; HEK293 hücreleri RNA polimeraz II promotörü kontrolünde SEAP belirteç geni taşıyan pSEAP plazmiti değişen miktarlarda PA proteinleri ile birlikte transfekte edildi. HEK293 hücreleri 24 kuyulu plaklara ($1x10^5$ hücre/kuyu) ekildi ve 20-24 saat standart kültür koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler belirli miktrada pSEAP plazmiti (50 ng/kuyu) ve artan miktarlarda PA proteini kodlayan plazmitler (0.3-10 ng) ile karıştırılarak birlikte transfekte edildi. Transfeksiyonda her bir kuyucuk için kullanılan total plazmit DNA miktarı pCAGGS plazmiti ile 250 ng'a tamamlandı. Transfeksiyon işlemi **5.18.2**'de verildiği gibi PEI ile gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 20 saat sonra hücre kültürlerinden alınan besiyeri örneklerinde belirteç SEAP aktivitesi ölçüldü. İkincisi; HEK 293 hücreleri HA uzantılı insan beta aktin proteini kodlayan pCHA-ACTB plazmiti ile viral PA proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler RIPA tamponunda parçalandı ve hücre lizatlarında doğal beta aktin ve HA uzantılı beta aktin protein miktarları Western melezleme tekniği ile karşılaştırıldı. Bunn için, HEK293 hücreleri, 12 kuyulu bir plakada (2.5×10^5 hücre / kuyu) olacak şekilde ekildi ve 24 saat sonra pCHA-ACTB (0.75 ug / kuyu) ve PA kodlayan plazmitlerle (0.75 ug / kuyu) birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saatlik sonra hücreler RIPA

tamponunda toplandı. Hücre lizatlarındaki proteinler SDS-PAGE ile ayrıldı ve poliviniliden diflorür (PVDF) membranına aktarıldı. Bloke edildikten sonra membran ilk önce fare monoklonal anti-HA (Santa Cruz, # sc-7392) veya anti-aktin (MyBioSource, # MBS9400413) ve ardından sekonder antikor anti-fare IgG-HRP (Invitrogen, # 31420) kullanıldı. Aktin proteinleri bir western melezleme kiti kullanılarak (GE Healthcare, İtalya) görüntülendi.

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

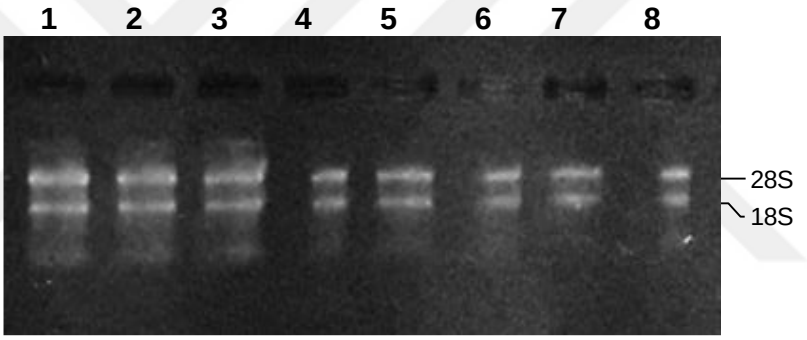
pSEAP plazmiti ile transfekte edilen HEK293 hücre kültürlerinde besiyerine salınan SEAP enzimi aktivitesi ticari kit (Roche, Mannheim, Almanya # 31420) kullanılarak ölçülüdü. Enzim aktivite tayininde üretici firmanın sağladığı kılavuz temel alındı. Bunun için transfeksiyondan 20-24 saat sonra 100 µl 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 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra enzim aktivitesi bir luminometrede (GloMax20/20 Luminometre, Promega) luminesans olarak ölçüldü.

6. BULGULAR

İnterferonla ile özellikle influenza virüsleri gibi RNA genomu taşıyan virüsler arasında çok sıkı bir ilişki vardır. Viral RNA'ların replikasyonu sırasında oluşan çift zincirli RNA moleküllerinin uyarısıyla konak hücreler tarafından sentez edilen interferonlar otokrin, parakrin ve endokrin etkili sitokinlerdir. Membranları geçemeyen bu moleküller hücre yüzeyinde bulunan kendilerine özgü reseptörlere bağlanarak hücre içerisinde gen ekspresyonu düzeyinde bir dizi biyolojik olayın başlamasını tetiklerler. İnterferonlar ile ilişkili bu olaylarda görev alan çeşitli proteinlerin influenza A virüsü replikasyonu ile yakın ilişkisi olduğu ve viral replikasyon üzerinde çoğunlukla negatif etki gösterdikleri bilinmektedir. Bununla birlikte farklı influenza A virüsü tipleri interferonlar ve interferonlar ile ilişkili proteinlerde farklı düzeylerde etkilenmektedirler. Bu tez çalışmasında, iki farklı tipte influenza A virüsü ile enfekte edilen ya da viral RNA polimeraz enzimini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen insan orijinli HEK293 hücrelerinde interferonlar ve interferonlar ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerin transkript seviyelerinin nasıl etkilendiği, transkript düzeyinde önemli farklılık gösteren bazı genlerin kodladığı proteinlerin viral RNA polimeraz enzimi aktivitesini hangi yönde etkilediği sorularına yanıt arandı. Bu hedefler doğrultusunda virüs ile enfekte edilen ya da viral polimeraz enzimi kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden total RNA ekstraksiyonu yapıldı. Total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile komplementer DNA'lar (cDNA) hazırlandı ve kantitatif gerçek zamanlı PZR teknikleri (qPZR) ile interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeyleri belirlendi. İnfluenza A virüsü replikasyonu açısından önemli olabileceği düşünülen genler, pCHA plazmit vektörüne klonlandı ve bu vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde geçici olarak miktarları arttırılan ilgili konak proteinlerinin viral RNA polimeraz enzimine etkileri influenza virüsü minireplikon modeli ile araştırıldı. Bu bağlamda elde edilen bulgular deneylerin akışına paralel olarak verildi.

6.1. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte Edilen ya da Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinden Total RNA Ekstraksiyonu ile İlgili Veriler

Total RNA, virüs ile enfekte veya transfekte edilen hücrelerden RNeasy plus mini kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile ekstre edildi. Ekstre edilen RNA örnekleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. Elektroforez sonuçları, hazırlanan total RNA'ların, çalışmanın bir sonraki kademesi olan reverz transkripsiyon için kullanılabilecek kalitede olduğunu gösterdi. Elektroforez sonrası, total RNA'da baskın olarak bulunan 18S ve 28S ribozomal RNA'ların herhangi bir yıkıma uğramaksızın tek bant halinde ayrıldıkları gözlendi (**Şekil 6-1**). Hazırlanan total RNA, cDNA hazırlamak için kalıp olarak kullanıldı.

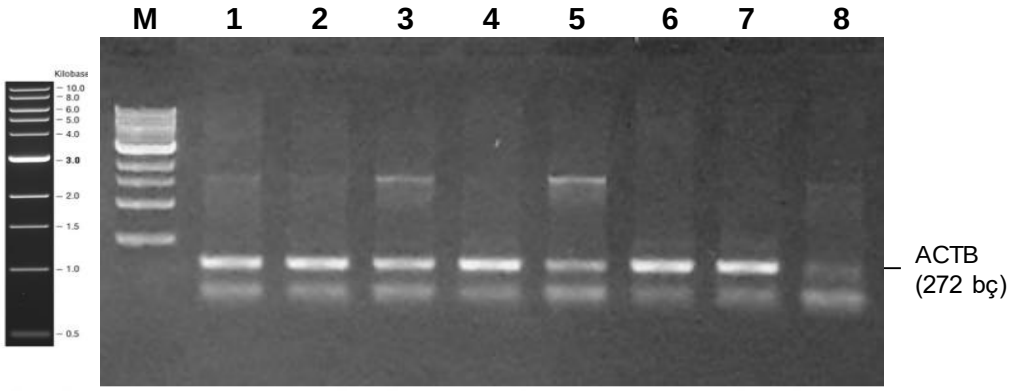


Şekil 6-1. İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen ya da plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile analizi. 1. İnfluenza A/Duck/Pen/H5N2 ile enfekte hücrelerden elde edilen RNA, 2. İnfluenza A/WSN/H1N1 ile enfekte hücrelerden elde edilen RNA, 3. İşlem görmemiş HEK293 hücrelerden elde edilen RNA, 4. pCGGS-PA(D) plazmit DNA'sı ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA, 5. pCGGS-PA(W) plazmit DNA'sı ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA, 6. pCGGS-PA(D), pCAGGS-PB1(D) ve pCAGGS-PB2(D) plazmitleri ile birlikte transfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA, 7. pCAGGS-PA(W), pCAGGS-PB1(W) ve pCAGGS-PB2(W) plazmitleri ile birlikte transfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA, 8. pCAGGS (kontrol) plazmiti ile transfekte edilen hücrelerden elde edilen RNA. RNA örnekleri EtBr katılmamış %1'lik agaroz jelde 30 dakika 100V sabit gerilim altında yürütüldü. Jel 0.5μg/ml konsantrasyonda EtBr içeren deiyonize distile suda 30 dakika bekletildi. Daha sonra 30 dakika deiyonize distile da yıkandı ve RNA bantları görüntülendi.

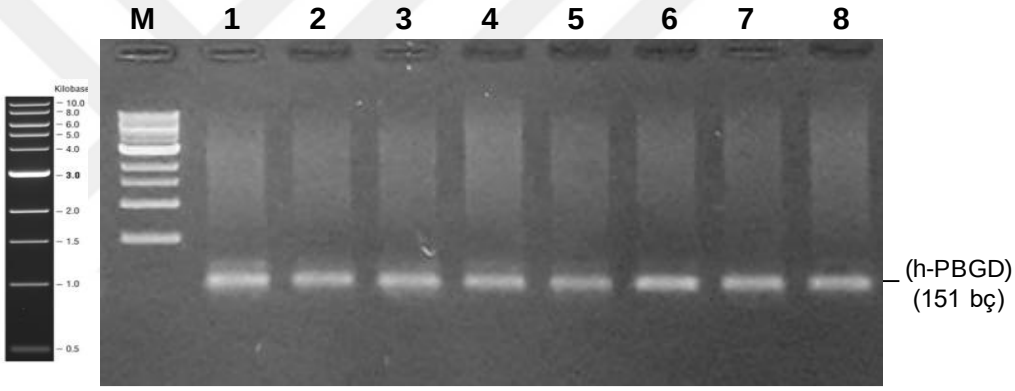
6.2. Reverz Transkripsiyon ile cDNA'ların Hazırlanması ve Kontrolü ile İlgili Veriler

Total RNA üzerinden oligo dT primer kullanılarak reverz transkripsiyon ile elde edilen cDNA'ların kontrolleri aktin beta (ACTB) ve porfobilinojen deaminaz (PBGD) genlerine ait cDNA'ların PZR ile çoğaltılması ve reaksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesiyle yapıldı. Kontrol amaçlı yapılan PZR sonucunda ACTB geni için beklenen 272 baz çifti, PBGD geni için ise beklenen 151 baz çifti boyutunda DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 6-2**). Sonrasında cDNA'lar interferon ve interferon yolakları ile ilişkili gen transkriptlerinin qPZR ile kantitasyonunda kalıp olarak kullanıldı.

A



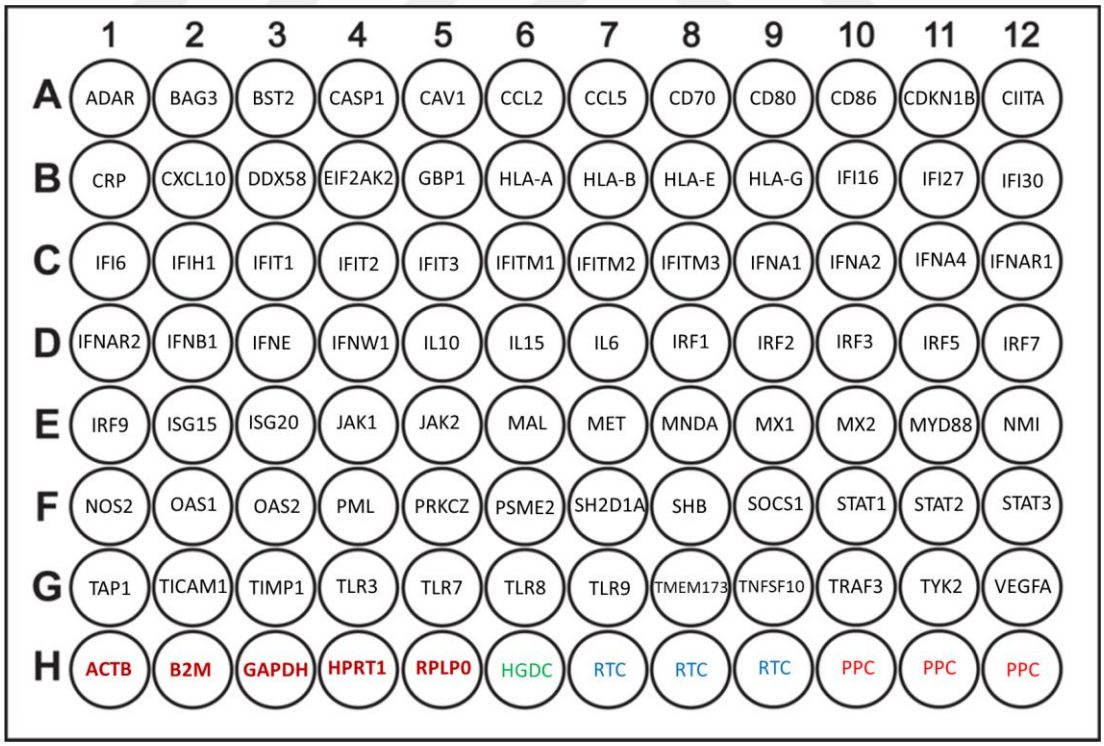
B



Şekil 6-2. Reverz transkripsiyon ile elde edilen cDNA'ların ACTB (A) ve PBGD (B) cDNA'ları üzerinden PZR ile kontrol edilmesi. PZR'nda Tablo 5-1'de nükleotid dizileri verilen Act 280-For/Act 552-Rer ve PBGD-For/PBGD-Rev primer çiftleri kullanıldı. Elektroforez işlemi %1'lik agaroz jel ile 100V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. 1.İnfluenza A/Duck/Pen/H5N2 ile enfekte edilen hücrelere ait cDNA, 2. İnfluenza A/WSN/H1N1 ile enfekte edilen hücrelere ait cDNA, 3. İşlem görmemiş HEK293 hücrelerlerine ait cDNA, 4. pCGGS-PA(D) plazmit DNA'sı ile transfekte edilen hücrelere ait cDNA, 5. pCGGS-PA(W) plazmit DNA'sı ile transfekte edilen hücrelere ait cDNA, 6. pCGGS-PA(D), pCAGGS-PB1(D) ve pCAGGS-PB2(D) plazmitleri ile birlikte transfekte edilen hücrelere ait cDNA, 7. pCAGGS-PA(W), pCAGGS-PB1(W) ve pCAGGS-PB2(W) plazmitleri ile birlikte transfekte edilen hücrelere ait cDNA, 8. pCAGGS (kontrol) plazmiti ile transfekte edilen hücrelere ait cDNA. M. 1 kb DNA ladder (NEB-3232).

6.3. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte ya da Viral RNA Polimeraz Enzimi Kodlayan Plazmitler ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler

HEK293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'larda interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeylerini belirlemek için Qiagen şirketi (Qiagen, Hilden, Almanya) tarafından geliştirilen 96 kuyulu "*RT² Profiler PCR Array*" (PAHS-016ZD-6) plakaları kullanıldı. Bu plakalar, interferon α, interferon β, interferon reseptörleri ve interferon sinyal yolağında iş gören belirli proteinleri kodlayan genlerin kantitasyonu için tasarlanmıştır. Doksan altı kuyulu plakalarda interferon ve interferonlar ile ilişkili 84 farklı gen, 5 housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0), 3 pozitif kontrol, 3 reverz transkripsiyon kontrolü ve 1 genomik DNA kontaminasyon kontrolü için uygun primerleri içeren alanlar bulunmaktadır. **Şekil 6-3**'de 96 kuyulu plakalarda ele alınan genler ve konumları verildi.



Şekil 6-3. *RT² Profiler PCR Array* 96 kuyulu plakada kantitasyon için genler ve genlerin konumları.

"*RT² Profiler PCR Array*" kitinde 96 kuyulu plaklarda konumları ve kısaltılmış olarak isimleri görülen genlerin açık isimleri ve veri bankası (GenBank) numaraları **Tablo 6-1** verildi.

Tablo 6-1 Çalışmada kullanılan *RT² Profiler PCR Array* kitinin içerdiği interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin açık isimleri, kısaltılmış isimleri (sembol) ve veri bankası (GenBank) numaraları.

Pozisyon	GenBank	Sembol	Genlerin Açık İsimleri
A01	NM_001111	ADAR	Adenosine deaminase, RNA-specific
A02	NM_004281	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
A03	NM_004335	BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2
A04	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
A05	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
A06	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A07	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
A08	NM_001252	CD70	CD70 molecule
A09	NM_005191	CD80	CD80 molecule
A10	NM_006889	CD86	CD86 molecule
A11	NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
A12	NM_000246	CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator
B01	NM_000567	CRP	C-reactive protein, pentraxin-related
B02	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
B03	NM_014314	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
B04	NM_002759	EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
B05	NM_002053	GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible
B06	NM_002116	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A
B07	NM_005514	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B
B08	NM_005516	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
B09	NM_002127	HLA-G	Major histocompatibility complex, class I, G
B10	NM_005531	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16

Pozisyon	GenBank	Sembol	Genlerin Açık İsimleri
B11	NM_005532	IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27
B12	NM_006332	IFI30	Interferon, gamma-inducible protein 30
C01	NM_002038	IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6
C02	NM_022168	IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1
C03	NM_001548	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
C04	NM_001547	IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
C05	NM_001549	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
C06	NM_003641	IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
C07	NM_006435	IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
C08	NM_021034	IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3
C09	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
C10	NM_000605	IFNA2	Interferon, alpha 2
C11	NM_021068	IFNA4	Interferon, alpha 4
C12	NM_000629	IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
D01	NM_000874	IFNAR2	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
D02	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
D03	NM_176891	IFNE	Interferon, epsilon
D04	NM_002177	IFNW1	Interferon, omega 1
D05	NM_000572	IL10	Interleukin 10
D06	NM_000585	IL15	Interleukin 15
D07	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D08	NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1
D09	NM_002199	IRF2	Interferon regulatory factor 2
D10	NM_001571	IRF3	Interferon regulatory factor 3
D11	NM_001098629	IRF5	Interferon regulatory factor 5
D12	NM_001572	IRF7	Interferon regulatory factor 7

Pozisyon	GenBank	Sembol	Genlerin Açık İsimleri
E01	NM_006084	IRF9	Interferon regulatory factor 9
E02	NM_005101	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
E03	NM_002201	ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
E04	NM_002227	JAK1	Janus kinase 1
E05	NM_004972	JAK2	Janus kinase 2
E06	NM_002371	MAL	Mal, T-cell differentiation protein
E07	NM_000245	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
E08	NM_002432	MNDA	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
E09	NM_002462	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
E10	NM_002463	MX2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
E11	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
E12	NM_004688	NMI	N-myc (and STAT) interactor
F01	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
F02	NM_002534	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
F03	NM_002535	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa
F04	NM_033238	PML	Promyelocytic leukemia
F05	NM_002744	PRKCZ	Protein kinase C, zeta
F06	NM_002818	PSME2	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
F07	NM_002351	SH2D1A	SH2 domain containing 1A
F08	NM_003028	SHB	Src homology 2 domain containing adaptor protein B
F09	NM_003745	SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
F10	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
F11	NM_005419	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa
F12	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
G01	NM_000593	TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
G02	NM_182919	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1

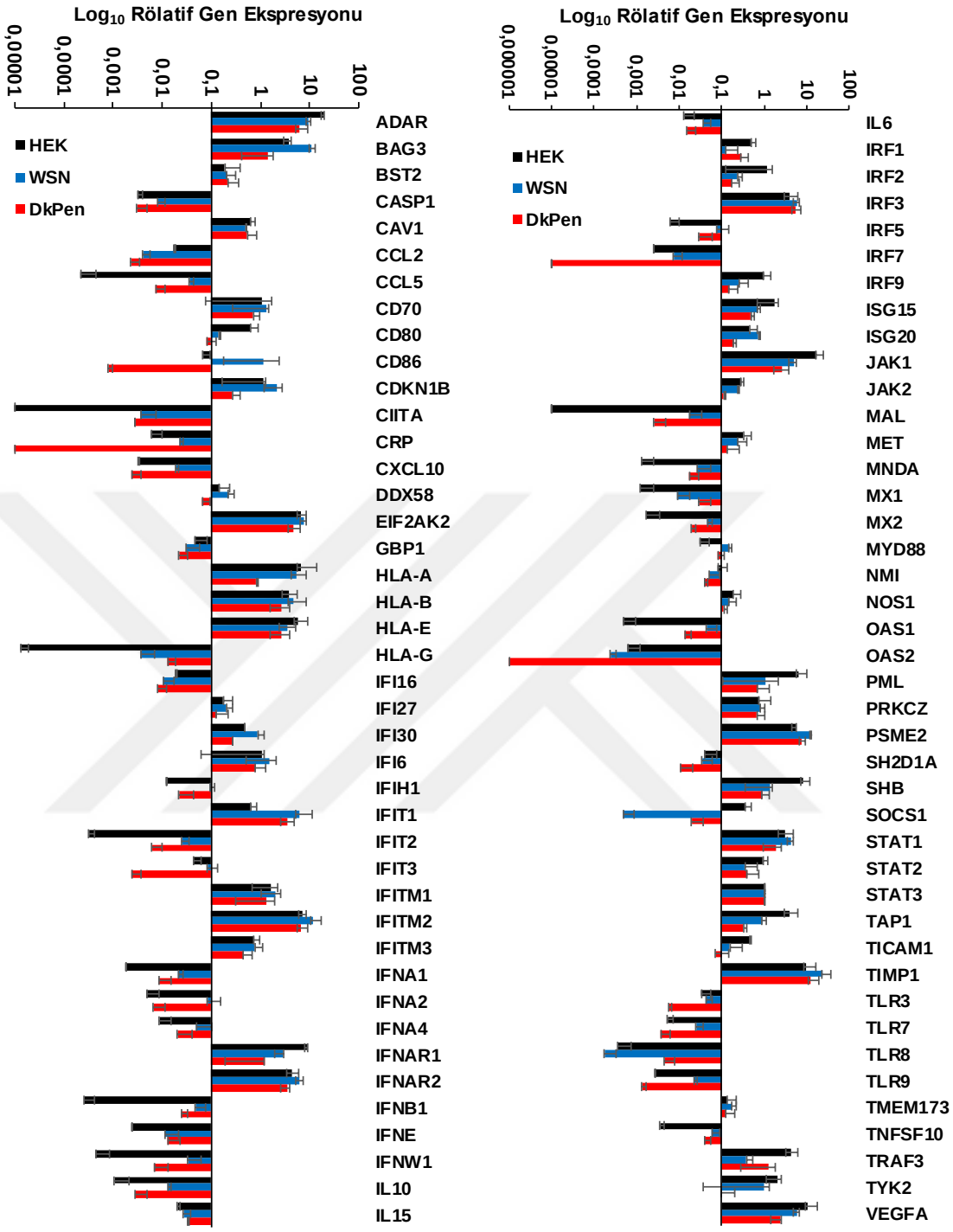
Pozisyon	GenBank	Sembol	Genlerin Açık İsimleri
G03	NM_003254	TIMP1	TIMP metallopeptidase inhibitor 1
G04	NM_003265	TLR3	Toll-like receptor 3
G05	NM_016562	TLR7	Toll-like receptor 7
G06	NM_138636	TLR8	Toll-like receptor 8
G07	NM_017442	TLR9	Toll-like receptor 9
G08	NM_198282	TMEM173	Transmembrane protein 173
G09	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G10	NM_003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
G11	NM_003331	TYK2	Tyrosine kinase 2
G12	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
H01	**NM_001101**	**ACTB**	**Actin, beta**
H02	**NM_004048**	**B2M**	**Beta-2-microglobulin**
H03	**NM_002046**	**GAPDH**	**Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase**
H04	**NM_000194**	**HPRT1**	**Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1**
H05	**NM_001002**	**RPLP0**	**Ribosomal protein, large, P0**

6.3.1. İnfluenza A Virüsleri ile Enfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler

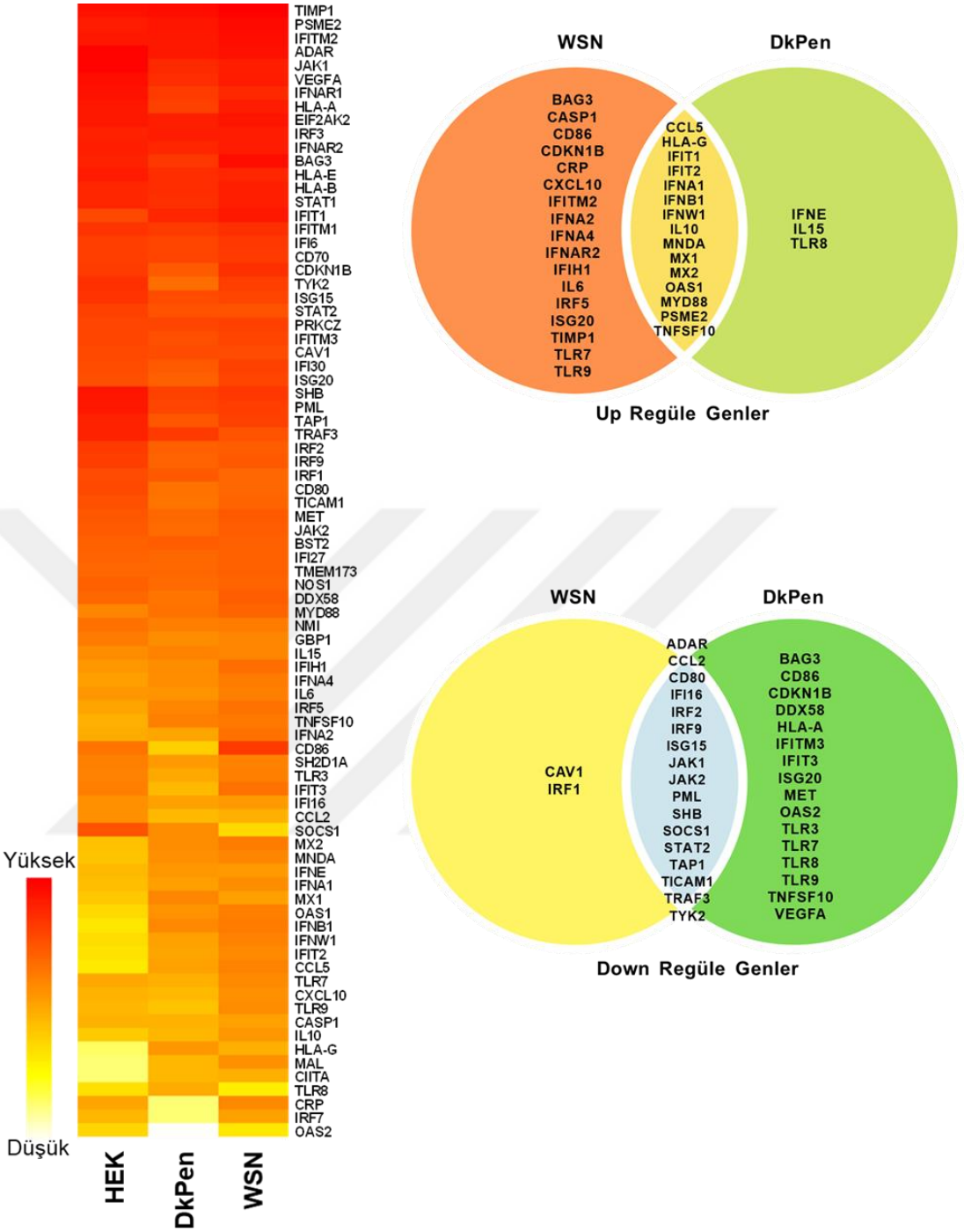
Virüsler ile enfekte edilen veya viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde interferonlar ile ilişkili genlerin ve housekeeping genlerin transkript düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile analiz edildi. Kantitatif PZR testlerinde Bio-Rad marka CFX96 model cihaz kullanıldı ve verilerin analizinde de Bio-Rad gerçek zamanlı PZR analiz programından yararlanıldı. Elde edilen transkript değerleri, STAT3 geninin transkript değerleri ile normalize edilerek, her bir gen için rölatif ekspresyon değerleri ortaya kondu. Deneyler her bir grup için en az üç kez tekrar edildi. Deney grupları arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS'de varyans analizi (Tek yönlü ANOVA ile Newman-Keuls post testi) ile yapıldı ve 0.05'in altındaki P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Virüsler ile enfekte olmamış HEK293 hücreleri ve iki farklı influenza A virüsü (WSN veya DkPen) ile enfekte edilen hücrelerdeki interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeylerini karşılaştırmalı olarak gösteren bar grafiği **Şekil 6-4**'te; aynı verilere ait ısı haritaları ve farklı deney grupları arasındaki gen ekspresyon düzeyi farklılıklarını özetleyen Venn diyagramları **Şekil 6-5**'te verildi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde insan tipi influenza (WSN) virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde, enfekte olmamış hücrelere kıyasla 32 genin up-regüle olduğu bulundu. Bu gen transkriptleri arasında, P değeri 18 gen için $p \leq 0.01$ ve 14 için p 0.05-0.01 olarak belirlenmiştir. 19 genin transkript seviyesi WSN virüsü enfekte hücrelerde down-regüle olduğu bulundu (13 gen için P değeri ≤ 0.01; 6 gen için p 0.05-0.01). İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir (**Şekil 5**). WSN virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerde en fazla artan transkriptlerin CCL5 (160 kat), HLA-G (275 kat), IFIT2 (81 kat), IFNB1 (185 kat), IFNW1 (76 kat) ve OAS1 (89 kat) olduğu belirlendi. Bu virüsle enfekte olmuş hücrelerdeki SOCS1 gen transkripti (697 kat) azaldığı tespit edildi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kuş tipi influenza (DkPen) virüsü ile enfekte olmuş hücrelerde, enfekte olmamış hücrelere kıyasla 18 genin up-regüle olduğu bulundu. Bu

gen transkriptleri arasında, P değeri 12 gen için p≤0.01 ve 6 için p 0.05-0.01 olarak belirlenmiştir. 32 genin transkript seviyesi enfekte hücrelerde down-regüle olduğu bulundu (26 gen için P değeri ≤ 0.01; 6 gen için p 0.05-0.01). İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir. DkPen virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerde en fazla artan transkriptlerin CCL5 (33 kat), HLA-G (980 kat), IFNB1 (92 kat) ve OAS1 (28 kat) olduğu belirlendi. Bu virüsle enfekte olmuş hücrelerdeki OAS2 gen transkripti (627 kat) ve SOCS1 gen transkripti (18 kat) azaldığı tespit edildi.

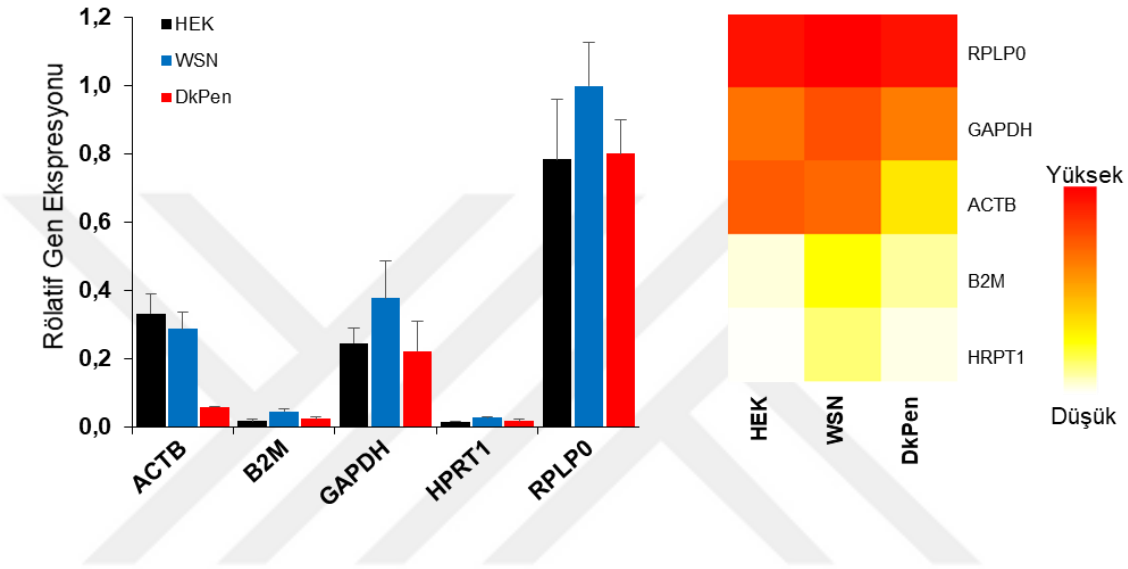


Şekil 6-4. Virüsler ile enfekte olmamış HEK293 hücreleri ve iki farklı influenza A virüs tipi (WSN veya DkPen) ile enfekte hücrelerde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri.



Şekil 6-5. Virüsler ile enfekte olmamış HEK293 hücreleri ve iki farklı influenza A virüs tipi (WSN veya DkPen) ile enfekte hücrelerde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları.

Virüs ile enfekte olmuş ya da enfekte olmamış hücrelerde Housekeeping genleri transkript düzeyleri, interferonlarla ilişkilendirilmedikleri için ayrı bir kategoride değerlendirildi. Enfekte olmayan hücrelerde ve virüslerle enfekte olmuş hücrelerde ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0 genlerinin nispi transkript miktarları **Şekil 6- 6** 'da verildi.



Şekil 6-6. İnfluenza A virüsleri (WSN veya DkPen) ile enfekte HEK293 hücrelerinde ve enfekte olmayan HEK293 hücrelerinde housekeeping genlerin ekspresyon profilleri ve ısı haritaları.

Her ne kadar interferon yolakları ile direkt bir ilişkisi bulunmasa da, enfekte olmamış hücrelere kıyasla influenza DkPen virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerde ACTB gen transkript seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($P \leq 0.0001$) ve ortalama 5.5 kat azalma olduğu görüldü. DkPen ile enfekte olmuş hücrelerde diğer housekeeping gen transkript seviyelerinde önemli bir değişiklik tespit edilmedi. İnfluenza WSN virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerde, ACTB gen transkript seviyesi de bir miktar azalma saptandı ($P=0.0426$), ancak DkPen virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerdeki kadar azalma olmadığı belirlendi. WSN ile enfekte olmuş hücrelerde ACTB transkriptinde yalnızca 1.16 kat azalma tespit edildi. İnfluenza WSN virüsleri ile enfekte olmuş hücrelerde diğer huosekeeping genlerinin transkript düzeylerinde nispi bir artış gözlendi **(Tablo 6-2**).

Tablo 6-2 Kontrol hücreleri ve influenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerinde housekeeping gen transkript seviyelerindeki farklılıklar.

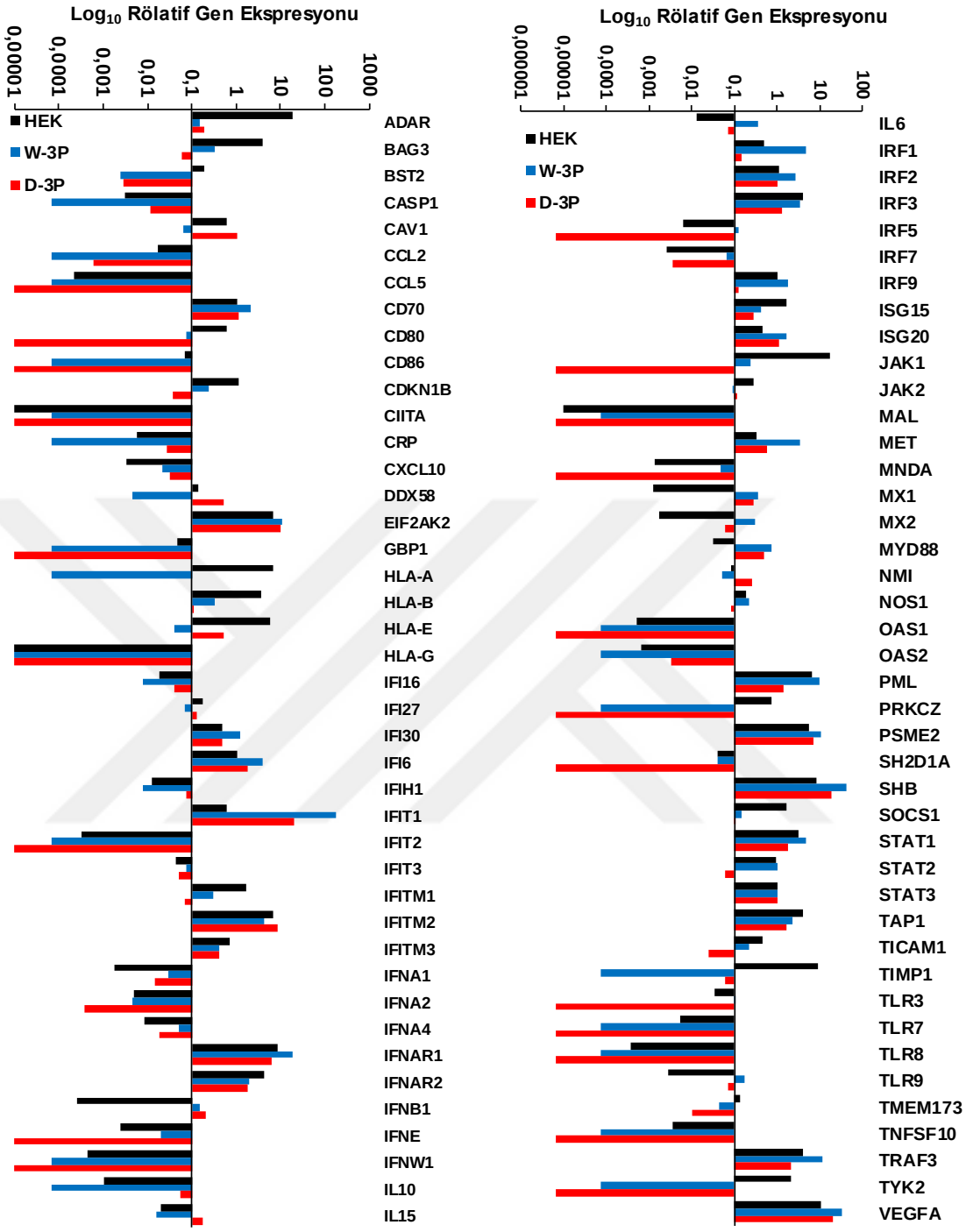
GenBank	Sembol	Gene Adı	P değeri	Nispi değişim HEK/WSN	P değeri	Nispi değişim HEK/DkPen
NM_001101	ACTB	Actin, beta	0.0426	1.16	0.0001	5.55
NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	0.0001	0.40	0.0480	0.76
NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,0179	0.65	0.5220	1.11
NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	0.0001	0.58	0.4900	0.90
NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0	0.02	0.78	0.8270	0.98

6.3.2. İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enziminin Üç Alt Birimini Kodlayan Plazmitler ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler

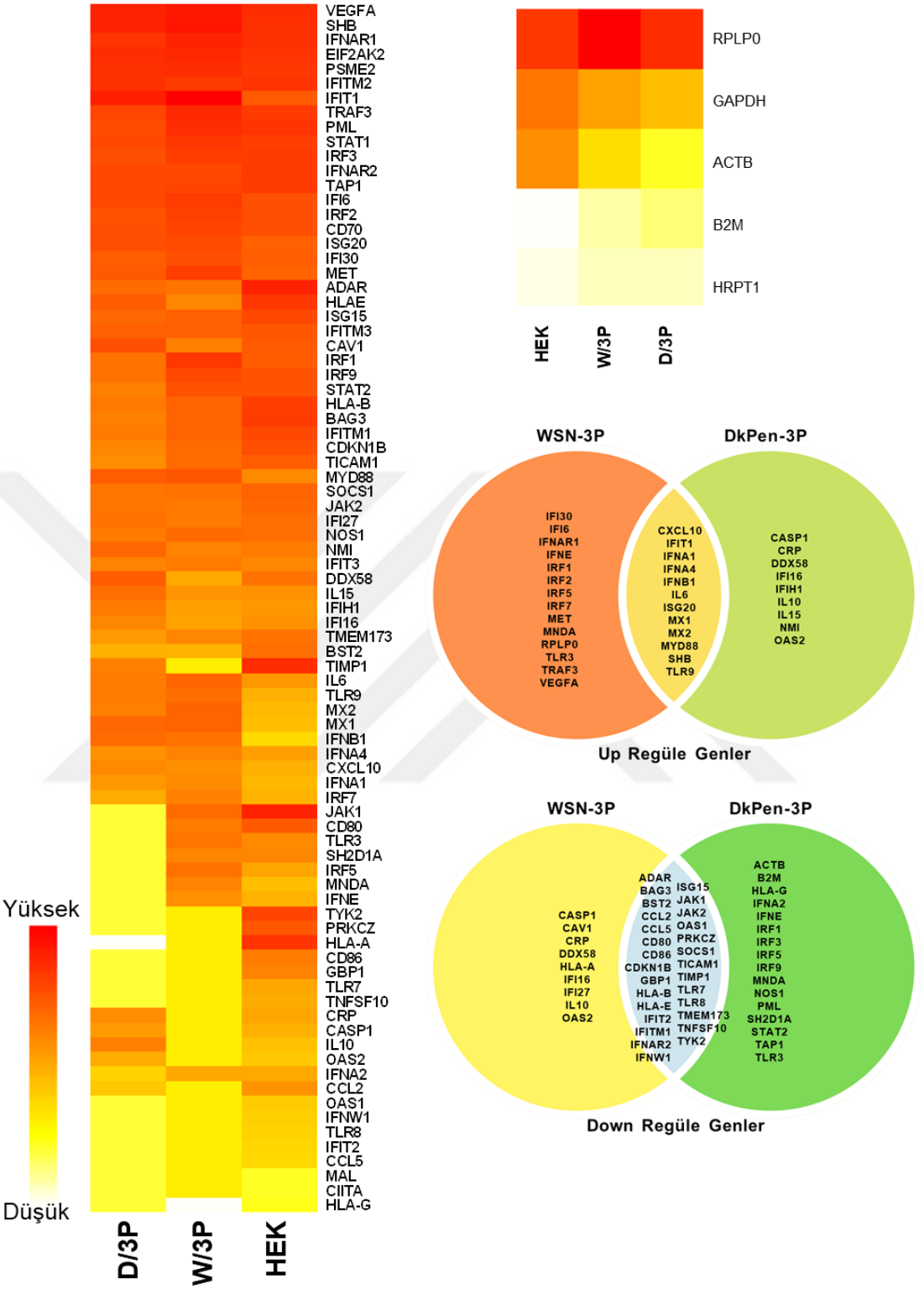
Daha önce yapılan çalışmalarda influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt birimlerinin birçok hücresel proteinle etkileşime girdiği ve bu proteinlerin bazılarının interferon savunma sistemi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Turan ve ark., 2004; Graef ve ark., 2010). Bu çalışmalar göz önüne alınarak, hem insan tipi İnfluenza A virüsü (WSN) hem de kuş tipi İnfluenza A virüsü (DkPen) virüsü RNA polimeraz enzimi alt birimlerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde interferon ile ilgili genlerin transkript seviyeleri araştırıldı. Deneyler sonucunda elde edilen veriler bar grafiği olarak **Şekil 6-7**'da; aynı verilere ait ısı haritaları ve farklı deney grupları arasındaki gen ekspresyon düzeyi farklılıklarını özetleyen Venn diyagramları **Şekil 6-8**'de verildi. Viral RNA polimeraz enziminin üç alt birimini (3P) aynı anda eksprese eden HEK293 hücrelerindeki genlerin ekspresyon profillerinin virüsler ile enfekte hücrelerdeki genlerin ekspresyon profillerine göre bazı farklılıklar gösterdiği saptandı.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde insan tipi influenza (WSN) viral RNA polimeraz enziminin üç alt birimi ile (3P) transfekte edilen hücrelerde, transfekte olmamış hücrelere kıyasla 26 genin up-regüle olduğu bulundu. 37 genin transkript seviyesinin tranfekte (3P) hücrelerde down-regüle olduğu bulundu. İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir (**Şekil 6-8**). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kuş tipi influenza

(DkPen) virüsü viral RNA polimeraz enziminin üç alt birimi ile (3P) transfekte edilen hücrelerde, transfekte olmamış hücrelere kıyasla 21 genin up-regüle olduğu bulundu. 44 genin transkript seviyesi transfekte hücrelerde down-regüle olduğu bulundu. İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir. Bunun, enfeksiyon koşullarında sadece viral RNA polimeraz enzimlerinin değil, aynı zamanda virüse ait diğer yapısal proteinlerinde sentez edilmesinden ve bu proteinlerin etkilerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, genel olarak WSN ve DkPen RNA polimeraz alt birimlerini eksprese eden hücrelerin gen ekspresyon profilleri göz önüne alındığında, enfekte olan hücrelerde daha fazla sayıda gen down regule olurken DkPen RNA polimeraz enzimini ifade edilen genlerde daha az sayıda genin up-regule olduğu gözlendi. (**Şekil 6-8**).



Şekil 6-7. İnfluenza A virüsü WSN (W-3P) ve DkPen (D-3P) RNA polimeraz alt birimlerini (PB2, PB1, PA) kodlayan plazmitler ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerinde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri. HEK, plazmitler ile transfekte olmamış HEK293 hücrelerini göstermektedir.

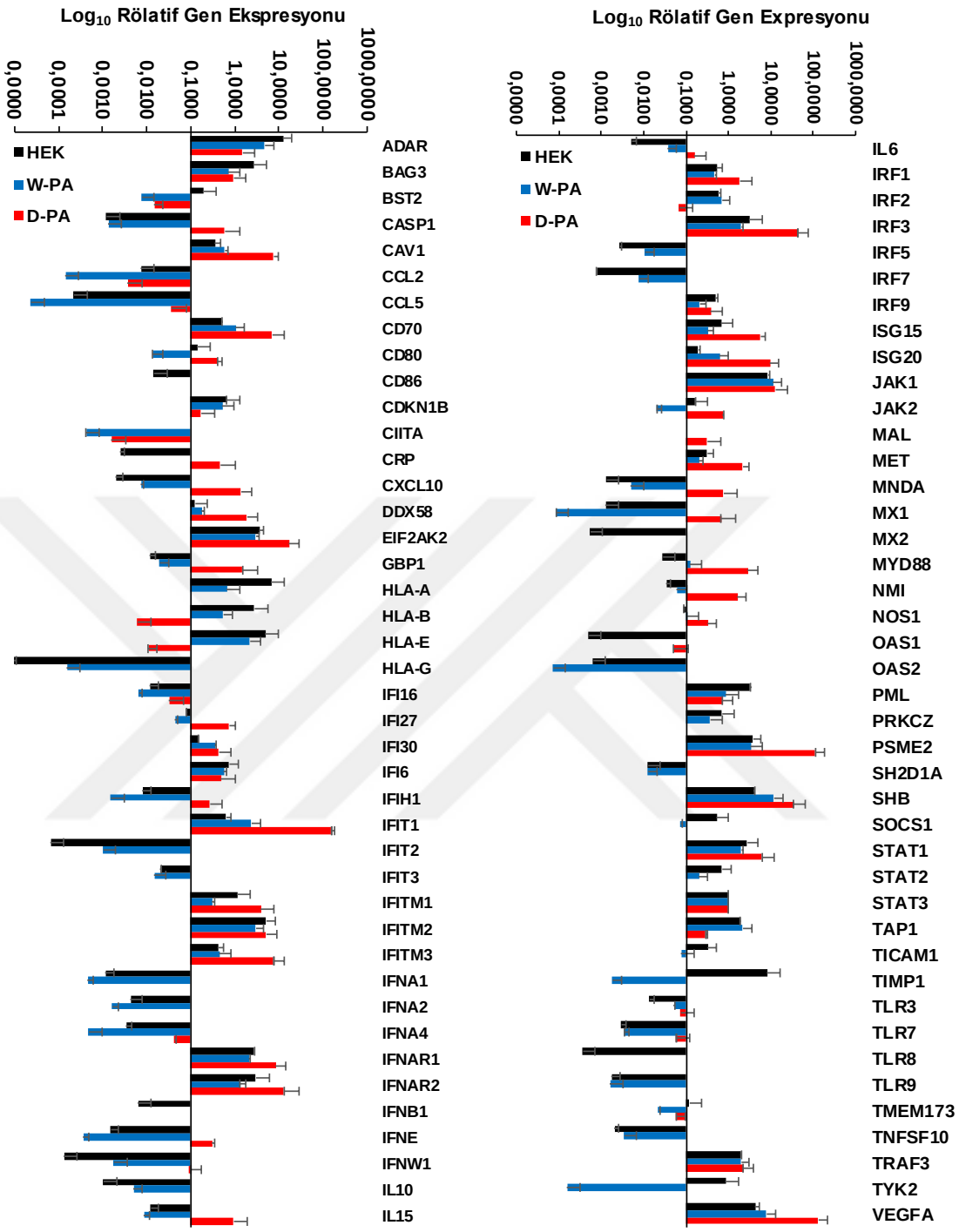


Şekil 6-8. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini (3P) eksprese eden plazmit DNA'ları ile geçici olarak transfekte edilmiş HEK293 hücrelerindeki interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları.

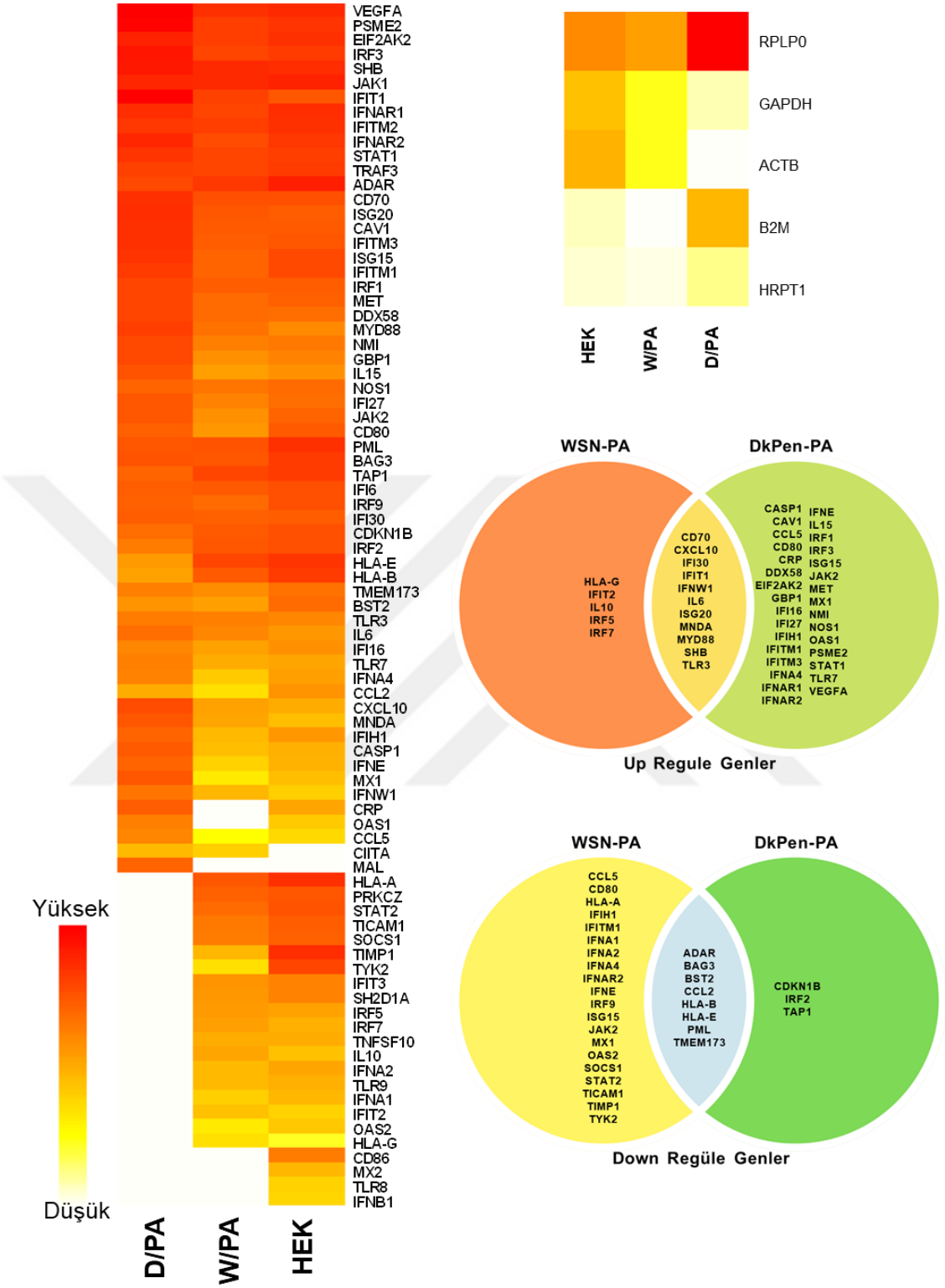
6.3.3. İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enziminin PA Alt Birimini Kodlayan Plazmit ile Transfekte Hücrelerde İnterferon ve İnterferon Yolakları ile İlişkili Gen Transkriptlerinin Kantitasyonu ile İlgili Veriler

İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi PB2, PB1 ve PA proteinlerinden oluşan heterotrimerik yapıda bir enzimdir. Bu proteinlerden nükleaz aktivitesine sahip olan PA alt birimi, viral mRNA'ların transkripsiyonu için gerekli olan konak mRNA moleküllerinin 5'-cap yapısının kesilmesinde işlev görür. Bu nedenle PA proteininin konak hücre transkript düzeyinde değişikliklere neden olabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle diğer viral RNA polimeraz alt birimleri (PB2 ve PB1) olmaksınız tek başına hücrelerde sentez edilen PA proteinin ele alınan genlerin transkript düzeyini nasıl etkilediği araştırıldı. Bunun için WSN ya da DkPen tipi virüse ait PA proteini kodlayan plazmit ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde interferon ve interferon ile ilişkili genlerin transkript düzeyleri "*RT² Profiler PCR Array*" plakaları üzerinden gerçek zamanlı qPZR ile belirlendi. Elde edilen veriler bar grafiği olarak **Şekil 6-9**'de; aynı verilere ait ısı haritaları ve Venn diyagramları **Şekil 6-10**'da verildi.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde insan tipi influenza (WSN) viral RNA polimeraz enziminin PA alt birimi ile transfekte edilen hücrelerde, transfekte olmamış hücrelere kıyasla 16 genin up-regüle olduğu bulundu. 28 genin transkript seviyesi PA ile transfekte hücrelerde down-regüle olduğu bulundu. İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir (**Şekil 6-8**). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde kuş tipi influenza (DkPen) virüsü viral RNA polimeraz enziminin PA alt birimi ile transfekte edilen hücrelerde, transfekte olmamış hücrelere kıyasla 42 genin up-regüle olduğu bulundu. 11 genin transkript seviyesi transfekte hücrelerde down-regüle olduğu bulundu. İnterferon yolu ile ilişkili diğer genlerin transkript seviyesindeki önemli değişikliklerin gözlenmediği görülmektedir. Özellikle kuş tipi influenza A virüsü PA proteininin genlerin transkript seviyelerinde daha agresif değişikliklere sebep olduğu görüldü. Bu sonuç influenza A virüsü PA proteininin hücresel transkripsiyonu etkileyen önemli viral faktörlerden biri olduğunu göstermektedir.



Şekil 6-9. İnfluenza A virüsü WSN (W-PA) ya da DkPen (D-PA) virüsü RNA polimeraz enzimi PA alt birimini kodlayan plazmit ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerinde interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ekspresyon profilleri



Şekil 6-10. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enziminin PA alt birimini eksprese eden plazmit DNA'sı ile geçici olarak transfekte edilmiş HEK293 hücrelerindeki interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin ısı haritaları ve Venn diyagramları.

6.4. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması İle İlgili Veriler

Gerçek zamanlı qPZR testleri sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile İnfluenza A virüsü replikasyonu için önemli olabileceği düşünülen ve özellikle ekspresyon profilleri farklı virüs tiplerine bağlı olarak değişkenlik gösteren genler, bu genler üzerinden kodlanan proteinlerin influenza virüsü replikasyonu ve transkripsiyonuna etkilerini araştırmak amacıyla memeli ekspresyon vektörlerine klonlandı. Yukarıda **Şekil 6 -(5-10)**'dan da anlaşılacağı gibi HEK293 hücrelerinde çok sayıda genin transkript düzeyinde virüs enfeksiyonu ya da viral polimeraz enzimi kodlayan plazmit transfeksiyonuna bağlı olarak anlamlı düzeylerde farklılıklar gözlendi. Mevcut laboratuvar koşulları ve iş yükü değerlendirilerek bu genler içerisinde *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genleri seçildi. Bunlara ek olarak klonlanmak istenen bazı genlerin cDNA üzerinden çoğaltılması ile ilgili sorunlar yaşandı. Öncelikli olarak belirlenen bu genler memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCHA plazmit vektörüne klonlandı. Bu bağlamda HEK293 hücrelerinden ekstre edilen RNA'lar üzerinde oligo-dT primerler kullanılarak cDNA'lar hazırlandı ve cDNA'lar genlere özgü primer çiftleri ile PZR tekniği ile çoğaltıldı. Çoğaltılan cDNA'lar EcoRV restriksiyon endonukleaz enzimi ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmiti ile ligasyona uğratıldı. Elde edilen yeni plazmit vektörler pCHA-CCL5, pCHA-CDKN1B, pCHA-HLA-B, pCHA-IFNA5, pCHA-IFI27, pCHA-IFIT1, pCHA-IFIT3, pCHA-IFITM3, pCHA-IFNE ve pCHA-OAS1 olarak adlandırıldı.

6.4.1. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin cDNA'larının Elde Edilmesi ile İlgili Veriler

İnsan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genlerine ait kodlayıcı bölgeler insan orijinli HEK-293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden genlere özgü primer kullanılarak PZR ile elde edildi. Elde edilen cDNA üzerinden PZR ile genlerin çoğaltılmasında kullanılan oligonukleotid primerlerin dizayn edilmesinde aşağıda *NCBI* referans kodları ve nükleotid dizleri verilen genlerden yararlanıldı.

İnsan chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5) varyant 1 cDNA'sı (NCBI-NM_002985.3)

ATGAAGGTCTCCGCGGCAGCCCTCGCTGTCATCCTCATTGCTACTGCCCTCTGCGCT
CCTGCATCTGCCTCCCCATATTCCTCGGACACCACACCCTGCTGCTTTGCCTACATT
GCCCGCCCACTGCCCCGTGCCCACATCAAGGAGTATTTCTACACCAGTGGCAAGTGC
TCCAACCCAGCAGTCGTCTTTGTCACCCGAAAGAACCGCCAAGTGTGTGCCAACCCA
GAGAAGAAATGGGTTCGGGAGTACATCAACTCTTTGGAGATGAGCTAG

İnsan cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (CDKN1B) cDNA'sı (NCBI - NM_004064.4)

ATGTCAAACGTGCGAGTGTCTAACGGGAGCCCTAGCCTGGAGCGGATGGACGCCAGG
CAGGCGGAGCACCCCAAGCCCTCGGCCTGCAGGAACCTCTTCGGCCCGGTGGACCAC
GAAGAGTTAACCCGGGACTTGGAGAAGCACTGCAGAGACATGGAAGAGGCGAGCCAG
CGCAAGTGGAATTTCGATTTTCAGAATCACAAACCCCTAGAGGGCAAGTACGAGTGG
CAAGAGGTGGAGAAGGGCAGCTTGCCCGAGTTCTACTACAGACCCCCGCGGCCCCCC
AAAGGTGCCTGCAAGGTGCCGGCGCAGGAGAGCCAGGATGTCAGCGGGAGCCGCCCG
GCGGCGCCTTTAATTGGGGCTCCGGCTAACTCTGAGGACACGCATTTGGTGGACCCA
AAGACTGATCCGTCGGACAGCCAGACGGGGTTAGCGGAGCAATGCGCAGGAATAAGG
AAGCGACCTGCAACCGACGATTCTTCTACTCAAAACAAAAGAGCCAACAGAACAGAA
GAAAATGTTTCAGACGGTTCCCCAAATGCCGGTTCTGTGGAGCAGACGCCCAAGAAG
CCTGGCCTCAGAAGACGTCAAACGTGA

İnsan major histocompatibility complex, class I, B (HLA-B) cDNA'sı (NCBI - NM _005514.8)

ATGCTGGTCATGGCGCCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTCGGCGGCCCTGGCCCTG
ACCGAGACCTGGGCCGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCTCCGTGTCCCGG
CCCGGCCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGTTC
GTGAGGTTCGACAGCGACGCCGCGAGTCCGAGAGAGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATA
GAGCAGGAGGGGCCGGAGTATTGGGACCGGAACACACAGATCTACAAGGCCCAGGCA
CAGACTGACCGAGAGAGCCTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCC
GGGTCTCACACCCTCCAGAGCATGTACGGCTGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTC
CTCCGCGGGCATGACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAG
GACCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACACGGCGGCTCAGATCACCCAGCGCAAGTGG
GAGGCGGCCCGTGAGGCGGAGCAGCGGAGAGCCTACCTGGAGGGCGAGTGCGTGGAG
TGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGACAAGCTGGAGCGCGCTGACCCCCCA
AAGACACACGTGACCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCTGG
GCCCTGGGTTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGAC
CAAACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCTTCCAG
AAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGTA

CAGCATGAGGGGCTGCCGAAGCCCCTCACCCTGAGATGGGAGCCGTCTTCCCAGTCC
ACCGTCCCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCCTAGCAGTTGTGGTCATC
GGAGCTGTGGTCGCTGCTGTGATGTGTAGGAGGAAGAGTTCAGGTGGAAAAGGAGGG
AGCTACTCTCAGGCTGCGTGCAGCGACAGTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACA
GCTTGA

İnsan interferon, alpha 5 (IFNA5) cDNA'sı (NCBI - NM_002169.3)

ATGGCCTTGCCCTTTGTTTTACTGATGGCCCTGGTGGTGCTCAACTGCAAGTCAATC
TGTTCTCTGGGCTGTGATCTGCCTCAGACCCACAGCCTGAGTAACAGGAGGACTTTG
ATGATAATGGCACAAATGGGAAGAATCTCTCCTTTCTCCTGCCTGAAGGACAGACAT
GACTTTGGATTTCCTCAGGAGGAGTTTGATGGCAACCAGTTCCAGAAGGCTCAAGCC
ATCTCTGTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGAC
TCATCTGCTACTTGGGATGAGACACTTCTAGACAAATTCTACACTGAACTTTACCAG
CAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTATGATGCAGGAGGTTGGAGTGGAAGACACTCCT
CTGATGAATGTGGACTCTATCCTGACTGTGAGAAAATACTTTCAAAGAATCACCCTC
TATCTGACAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCATGGGAGGTTGTCAGAGCAGAAATC
ATGAGATCCTTCTCTTTATCAGCAAACTTGCAAGAAAGATTAAGGAGGAAGGAATGA

İnsan interferon, alpha-inducible protein 27 (IFI27) varyant 1 cDNA'sı (NCBI - NM_1130080.3)

ATGGAGGCCTCTGCTCTCACCTCATCAGCAGTGACCAGTGTGGCCAAAGTGGTCAGG
GTGGCCTCTGGCTCTGCCGTAGTTTTGCCCCTGGCCAGGATTGCTACAGTTGTGATT
GGAGGAGTTGTGGCCATGGCGGCTGTGCCCATGGTGCTCAGTGCCATGGGCTTCACT
GCGGCGGGAATCGCCTCGTCCTCCATAGCAGCCAAGATGATGTCCGCGGCGGCCATT
GCCAATGGGGGTGGAGTTGCCTCGGGCAGCCTTGTGGCTACTCTGCAGTCACTGGGA
GCAACTGGACTCTCCGGATTGACCAAGTTCATCCTGGGCTCCATTGGGTCTGCCATT
GCGGCTGTCATTGCGAGGTTCTACTAG

İnsan interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT1) varyant 1 cDNA'sı (NCBI - NM_1548.5)

ATGAGTACAAATGGTGATGATCATCAGGTCAAGGATAGTCTGGAGCAATTGAGATGT
CACTTTACATGGGAGTTATCCATTGATGACGATGAAATGCCTGATTTAGAAAACAGA
GTCTTGGATCAGATTGAATTCCTAGACACCAAATACAGTGTGGGAATACACAACCTA
CTAGCCTATGTGAAACACCTGAAAGGCCAGAATGAGGAAGCCCTGAAGAGCTTAAAA

GAAGCTGAAAACTTAATGCAGGAAGAACATGACAACCAAGCAAATGTGAGGAGTCTG
GTGACCTGGGGCAACTTTGCCTGGATGTATTACCACATGGGCAGACTGGCAGAAGCC
CAGACTTACCTGGACAAGGTGGAGAACATTTGCAAGAAGCTTTCAAATCCCTTCCGC
TATAGAATGGAGTGTCCAGAAATAGACTGTGAGGAAGGATGGGCCTTGCTGAAGTGT
GGAGGAAAAAATTATGAACGGGCCAAGGCCTGCTTTGAAAAGGTGCTTGAAGTGGAC
CCTGAAAACCCTGAATCCAGCGCTGGGTATGCGATCTCTGCCTATCGCCTGGATGGC
TTTAAATTAGCCACAAAAAATCACAAGCCATTTTCTTTGCTTCCCCTAAGGCAGGCT
GTCCGCTTAAATCCAGACAATGGATATATTAAGGTTCTCCTTGCCCTGAAGCTTCAG
GATGAAGGACAGGAAGCTGAAGGAGAAAAGTACATTGAAGAAGCTCTAGCCAACATG
TCCTCACAGACCTATGTCTTTCGATATGCAGCCAAGTTTTACCGAAGAAAAGGCTCT
GTGGATAAAGCTCTTGAGTTATTAAAAAAGGCCTTGCAGGAAACACCCACTTCTGTC
TTACTGCATCACCAGATAGGGCTTTGCTACAAGGCACAAATGATCCAAATCAAGGAG
GCTACAAAAGGGCAGCCTAGAGGGCAGAACAGAGAAAAGCTAGACAAAATGATAAGA
TCAGCCATATTTCATTTTGAATCTGCAGTGGAAAAAAAGCCCACATTTGAGGTGGCT
CATCTAGACCTGGCAAGAATGTATATAGAAGCAGGCAATCACAGAAAAGCTGAAGAG
AATTTTCAAAAATTGTTATGCATGAAACCAGTGGTAGAAGAAACAATGCAAGACATA
CATTTCCACTATGGTCGGTTTCAGGAATTTCAAAAGAAATCTGACGTCAATGCAATT
ATCCATTATTTAAAAGCTATAAAAATAGAACAGGCATCATTAACAAGGGATAAAAGT
ATCAATTCTTTGAAGAAATTGGTTTTAAGGAAACTTCGGAGAAAGGCATTAGATCTG
GAAAGCTTGAGCCTCCTTGGGTTCGTCTACAAATTGGAAGGAAATATGAATGAAGCC
CTGGAGTACTATGAGCGGGCCCTGAGACTGGCTGCTGACTTTGAGAACTCTGTGAGA
CAAGGTCCTTAG

İnsan interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 IFIT3 varyant 1 cDNA'sı (NCBI - NM _001549.6)

ATGAGTGAGGTCACCAAGAATTCCCTGGAGAAAATCCTTCCACAGCTGAAATGCCAT
TTCACCTGGAACTTATTCAAGGAAGACAGTGTCTCAAGGGATCTAGAAGATAGAGTG
TGTAACCAGATTGAATTTTTAAACACTGAGTTCAAAGCTACAATGTACAACTTGTTG
GCCTACATAAAACACCTAGATGGTAACAACGAGGCAGCCCTGGAATGCTTACGGCAA
GCTGAAGAGTTAATCCAGCAAGAACATGCTGACCAAGCAGAAATCAGAAGTCTAGTC
ACTTGGGGAAACTACGCCTGGGTCTACTATCACTTGGGCAGACTCTCAGATGCTCAG
ATTTATGTAGATAAGGTGAAACAAACCTGCAAGAAATTTTCAAATCCATACAGTATT
GAGTATTCTGAACTTGACTGTGAGGAAGGGTGGACACAACTGAAGTGTGGAAGAAAT

GAAAGGGCGAAGGTGTGTTTTGAGAAGGCTCTGGAAGAAAAGCCCAACAACCCAGAA
TTCTCCTCTGGACTGGCAATTGCGATGTACCATCTGGATAATCACCCAGAGAAACAG
TTCTCTACTGATGTTTTGAAGCAGGCCATTGAGCTGAGTCCTGATAACCAATACGTC
AAGGTTCTCTTGGGCCTGAAACTGCAGAAGATGAATAAAGAAGCTGAAGGAGAGCAG
TTTGTTGAAGAAGCCTTGGAAAAGTCTCCTTGCCAAACAGATGTCCTCCGCAGTGCA
GCCAAATTTTACAGAAGAAAAGGTGACCTAGACAAAGCTATTGAACTGTTTCAACGG
GTGTTGGAATCCACACCAAACAATGGCTACCTCTATCACCAGATTGGGTGCTGCTAC
AAGGCAAAAGTAAGACAAATGCAGAATACAGGAGAATCTGAAGCTAGTGGAAATAAA
GAGATGATTGAAGCACTAAAGCAATATGCTATGGACTATTCGAATAAAGCTCTTGAG
AAGGGACTGAATCCTCTGAATGCATACTCCGATCTCGCTGAGTTCCTGGAGACGGAA
TGTTATCAGACACCATTCAATAAGGAAGTCCCTGATGCTGAAAAGCAACAATCCCAT
CAGCGCTACTGCAACCTTCAGAAATATAATGGGAAGTCTGAAGACACTGCTGTGCAA
CATGGTTTAGAGGGTTTGTCCATAAGCAAAAAATCAACTGACAAGGAAGAGATCAAA
GACCAACCACAGAATGTATCTGAAAATCTGCTTCCACAAAATGCACCAAATTATTGG
TATCTTCAAGGATTAATTCATAAGCAGAATGGAGATCTGCTGCAAGCAGCCAAATGT
TATGAGAAGGAACTGGGCCGCCTGCTAAGGGATGCCCCTTCAGGCATAGGCAGTATT
TTCCTGTCAGCATCTGAGCTTGAGGATGGTAGTGAGGAAATGGGCCAGGGCGCAGTC
AGCTCCAGTCCCAGAGAGCTCCTCTCTAACTCAGAGCAACTGAACTGA

İnsan Interferon induced transmembrane protein 3 (IFITM3) varyant 1 cDNA'sı (NCBI - NM_21034.3)

ATGAATCACACTGTCCAAACCTTCTTCTCTCCTGTCAACAGTGGCCAGCCCCCCAAC
TATGAGATGCTCAAGGAGGAGCACGAGGTGGCTGTGCTGGGGGCGCCCCACAACCCT
GCTCCCCCGACGTCCACCGTGATCCACATCCGCAGCGAGACCTCCGTGCCCGACCAT
GTCGTCTGGTCCCTGTTCAACACCCTCTTCATGAACCCCTGCTGCCTGGGCTTCATA
GCATTCGCCTACTCCGTGAAGTCTAGGGACAGGAAGATGGTTGGCGACGTGACCGGG
GCCCAGGCCTATGCCTCCACCGCCAAGTGCCTGAACATCTGGGCCCTGATTCTGGGC
ATCCTCATGACCATTCTGCTCATCGTCATCCCAGTGCTGATCTTCCAGGCCTATGGA
TAG

İnsan Interferon, epsilon (IFNE) cDNA'sı (NCBI - NM_176891.4)

ATGATTATCAAGCACTTCTTTGGAACTGTGTTGGTGCTGCTGGCCTCTACCACTATC
TTCTCTCTAGATTTGAAACTGATTATCTTCCAGCAAAGACAAGTGAATCAAGAAAGT

TTAAAACTCTTGAATAAGTTGCAAACCTTGTCAATTCAGCAGTGTCTACCACACAGG
AAAAACTTTCTGCTTCCTCAGAAGTCTTTGAGTCCTCAGCAGTACCAAAAAGGACAC
ACTCTGGCCATTCTCCATGAGATGCTTCAGCAGATCTTCAGCCTCTTCAGGGCAAAT
ATTTCTCTGGATGGTTGGGAGGAAAACCACACGGAGAAATTCCTCATTCAACTTCAT
CAACAGCTAGAATACCTAGAAGCACTCATGGGACTGGAAGCAGAGAAGCTAAGTGGT
ACTTTGGGTAGTGATAACCTTAGATTACAAGTTAAAATGTACTTCCGAAGGATCCAT
GATTACCTGGAAAACCAGGACTACAGCACCTGTGCCTGGGCCATTGTCCAAGTAGAA
ATCAGCCGATGTCTGTTCTTTGTGTTCAGTCTCACAGAAAAACTGAGCAAACAAGGA
AGACCCTTGAACGACATGAAGCAAGAGCTTACTACAGAGTTTAGAAGCCCGAGGTGA

İnsan 2'-5'-oligoadenylate synthetase 1 (OAS1) varyant 1 cDNA'sı (NCBI - NM _016816.4)

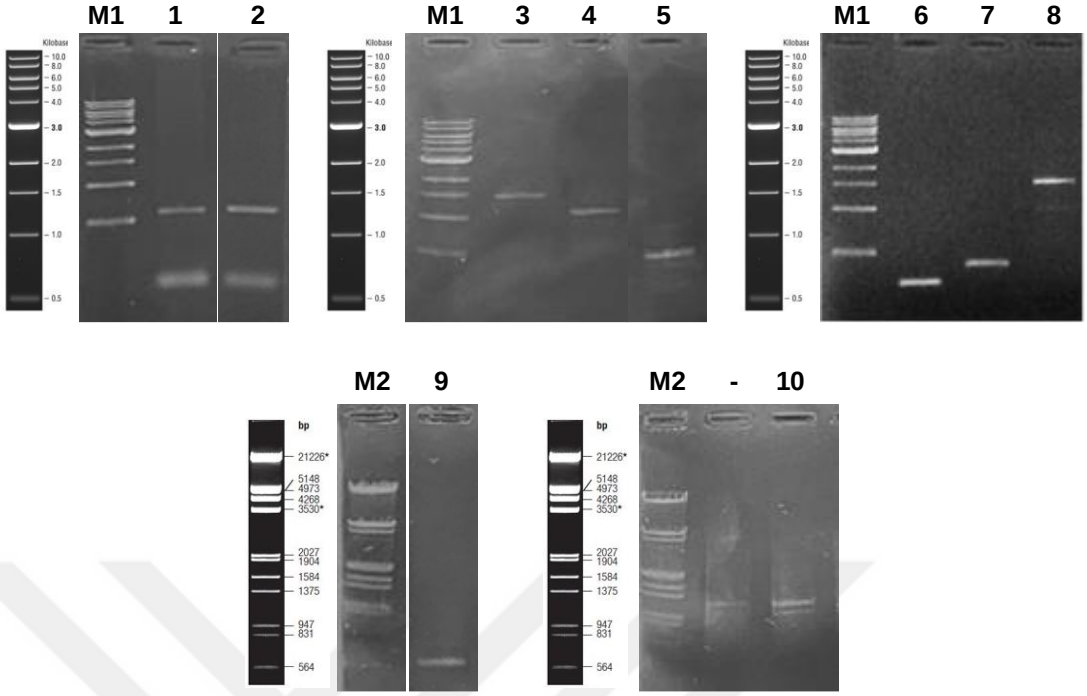
ATGATGGATCTCAGAAATACCCCAGCCAAATCTCTGGACAAGTTCATTGAAGACTAT
CTCTTGCCAGACACGTGTTTCCGCATGCAAATCAACCATGCCATTGACATCATCTGT
GGGTTCCTGAAGGAAAGGTGCTTCCGAGGTAGCTCCTACCCTGTGTGTGTGTCCAAG
GTGGTAAAGGGTGGCTCCTCAGGCAAGGGCACCACCCTCAGAGGCCGATCTGACGCT
GACCTGGTTGTCTTCCTCAGTCCTCTCACCACTTTTCAGGATCAGTTAAATCGCCGG
GGAGAGTTCATCCAGGAAATTAGGAGACAGCTGGAAGCCTGTCAAAGAGAGAGAGCA
TTTTCCGTGAAGTTTGAGGTCCAGGCTCCACGCTGGGGCAACCCCCGTGCGCTCAGC
TTCGTACTGAGTTCGCTCCAGCTCGGGGAGGGGGTGGAGTTCGATGTGCTGCCTGCC
TTTGATGCCCTGGGTCAGTTGACTGGCGGCTATAAACCTAACCCCCAAATCTATGTC
AAGCTCATCGAGGAGTGCACCGACCTGCAGAAAGAGGGCGAGTTCTCCACCTGCTTC
ACAGAACTACAGAGAGACTTCCTGAAGCAGCGCCCCACCAAGCTCAAGAGCCTCATC
CGCCTAGTCAAGCACTGGTACCAAAATTGTAAGAAGAAGCTTGGGAAGCTGCCACCT
CAGTATGCCCTGGAGCTCCTGACGGTCTATGCTTGGGAGCGAGGGAGCATGAAAACA
CATTTCAACACAGCCCAGGGATTTCGGACGGTCTTGGAATTAGTCATAAACTACCAG
CAACTCTGCATCTACTGGACAAAGTATTATGACTTTAAAAACCCCATTATTGAAAAG
TACCTGAGAAGGCAGCTCACGAAACCCAGGCCTGTGATCCTGGACCCGGCGGACCCT
ACAGGAAACTTGGGTGGTGGAGACCCAAAGGGTTGGAGGCAGCTGGCACAAGAGGCT
GAGGCCTGGCTGAATTACCCATGCTTTAAGAATTGGGATGGGTCCCCAGTGAGCTCC
TGGATTCTGCTGGCTGAAAGCAACAGTGCAGACGATGAGACCGACGATCCCAGGAGG
TATCAGAAATATGGTTACATTGGAACACATGAGTACCCTCATTTCTCTCATAGACCC

AGCACACTCCAGGCAGCATCCACCCCACAGGCAGAAGAGGACTGGACCTGCACCATC
CTCTGA

HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile incelendi. PZR sonucunda **Tablo 6-3**'de verilen büyüklüklerde beklenen DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 6-11**).

Tablo 6-3. PZR ile çoğaltılan genler ve elde edilen DNA fragmentlerinin baz çifti (bç) olarak büyüklükleri.

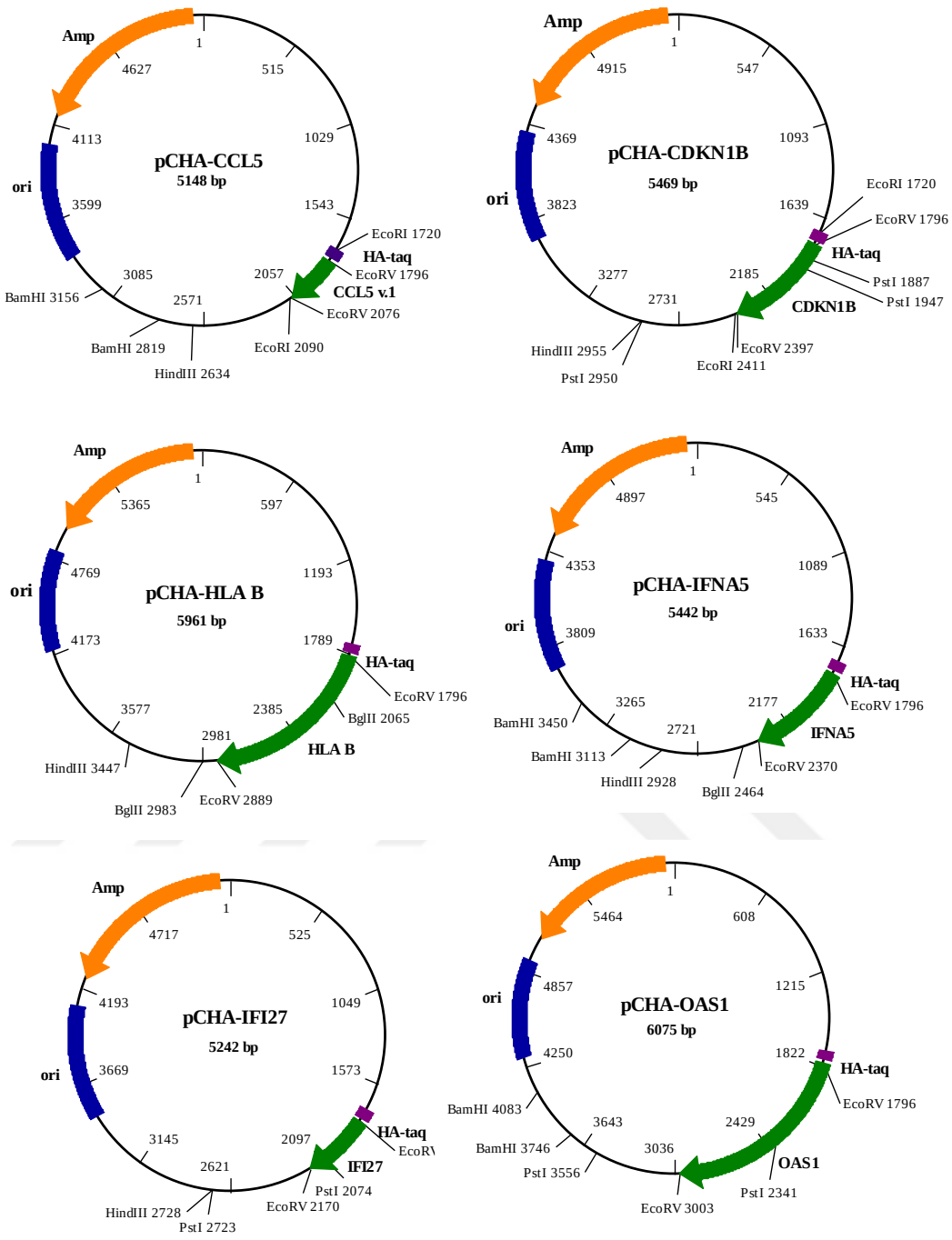
PZR Ürünleri	**DNA boyutu**
CCL5	276 bç
CDKN1B	597 bç
HLA-B	1089 bç
IFNA5	570 bç
IFI27	369 bç
IFIT1	1437 bç
IFIT3	1473 bç
IFITM3	402 bç
IFNE	627 bç
OAS1	1203 bç



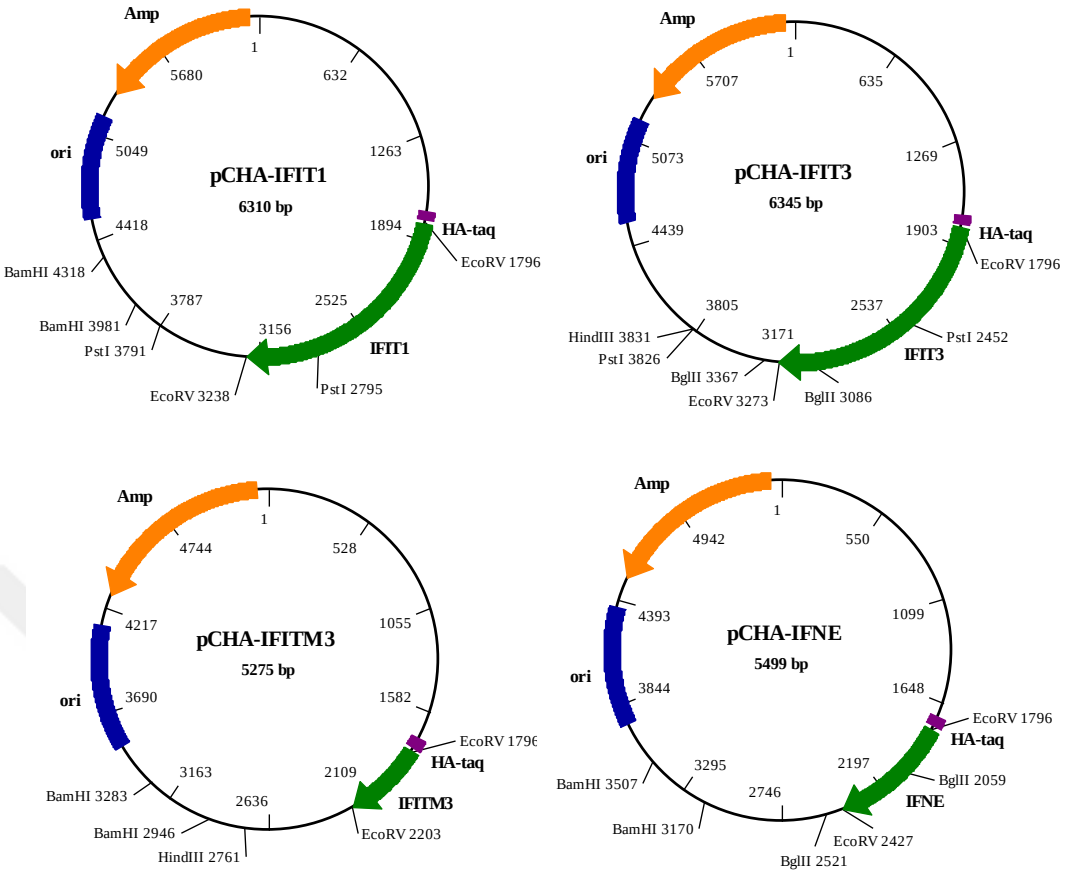
Şekil 6-11. İnsan HEK-293 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan CDKN1B(1), IFNE(2), IFIT3(3), HLA-B(4), IFNA5(5), IFI27(6), IFITM3(7), IFIT1(8), CCL5(9) ve OAS1(10) DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. DNA örneklerinin incelenmesinde %1'lik agaroz jeller kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi. M1. 1 kb ladder (NEB, N3232). M2. HindIII ve EcoRI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı (λ/HindIII+EcoRI).

6.4.2. qPZR Testlerinde Ekspresyon Düzeylerinde Farklılık Saptanan Genlerin pCHA Vektörüne Klonlanması ile İlgili Veriler

HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan genler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra fenol:kloroform:izoamilalkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktürüldükten sonra agaroz jel ile saflaştırıldı. Saflaştırılan DNA'lar EcoRV restriksiyon enzimi ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı ligasyona uğratıldı. **Şekil 6-12**'de haritaları verilen; pCHA-CCL5, pCHA-CDKN1B, pCHA-HLA-B, pCHA-IFNA5, pCHA-IFI27, pCHA-IFIT1, pCHA-IFIT3, pCHA-IFITM3, pCHA-IFNE ve pCHA-OAS1 olarak isimlendirilen ekspresyon vektörleri elde edildi.



Şekil 6-12. İnsan CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 genlerinin pCHA plazmitine klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri. Vektör haritaları pCHA ve genlerin nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önünde bulundurularak BioEdit programı ile çizildi.



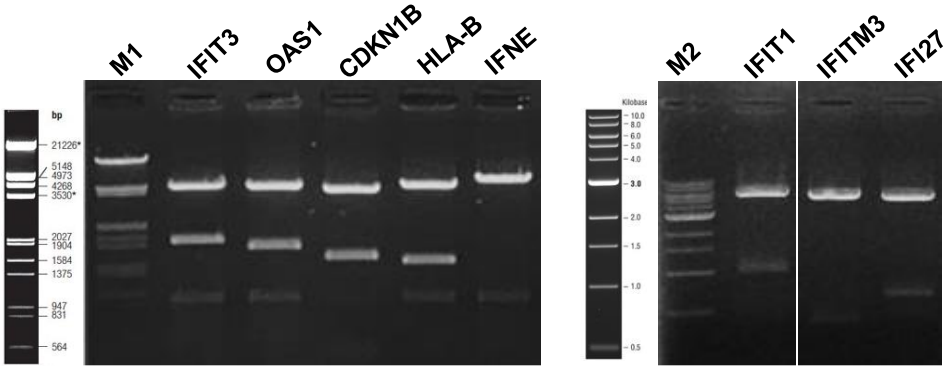
Şekil 6-12. (devamı) İnsan CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 genlerinin pCHA plazmitine klonlanması ile elde edilen ekspresyon vektörleri. Vektör haritaları pCHA ve genlerin nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önünde bulundurularak BioEdit programı ile çizildi.

Elde edilen plazmit vektörlerin doğrulukları, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak, aşağıda **Tablo 6-4**'te verilen enzimler ile kesilerek kontrol edildi.

Tablo 6-4 Plazmit vektörlerin kesilerek kontrol edilmesinde kullanılan restriksiyon endonukleaz enzimleri ve kesim sonrasında oluşması beklenen DNA fragment boyutları (bç).

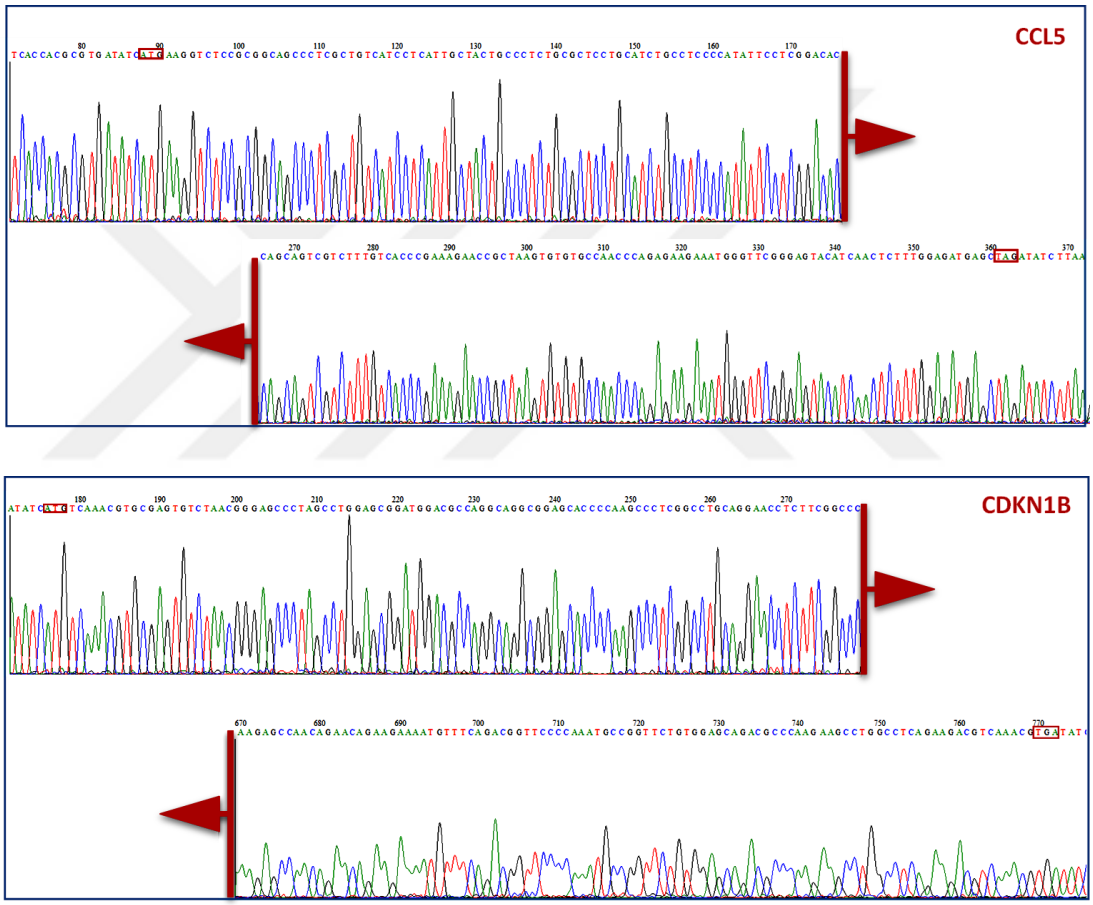
Plazmit Vektörler	**Restriksiyon Enzimleri**	**Beklenen DNA Fragment Boyutları**
pCHA-CCL5	PZR Kontrolü	-
pCHA-CDKN1B	PstI	60/1003/4406
pCHA-HLA-B	BglII	918/5043 bç
pCHA-IFNA5	PZR Kontrolü	-
pCHA-IFI27	PstI	649/4593 bç
pCHA-IFIT1	PstI	996/5314 bç
pCHA-IFIT3	PstI	1374/4971 bç
pCHA-IFITM3	EcoRV	407/4868 bç
pCHA-IFNE	BglII	462/5037 bç
pCHA-OAS1	PstI	1215/4860 bç

Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi sonuçları **Şekil 6-13**'de verildi. Elektroforez sonuçlarının **Tablo 6-4'**de verilen beklenen DNA fragment boyutları ile uyumlu olduğu görüldü.



Şekil 6-13. Restriksiyon endonükleazları ile kesilen plazmit vektörlerinin agaroz jel elektroforezi profilleri. DNA örnekleri %1'lik agaroz jel ile analiz edildi. Elektroforez işlemi100 V sabit gerilimde 25 dakikada tamamlandı. M1. 1 kb ladder (NEB, N3232L). M2. HindIII ve EcoRI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı (λ/HindIII+EcoRI).

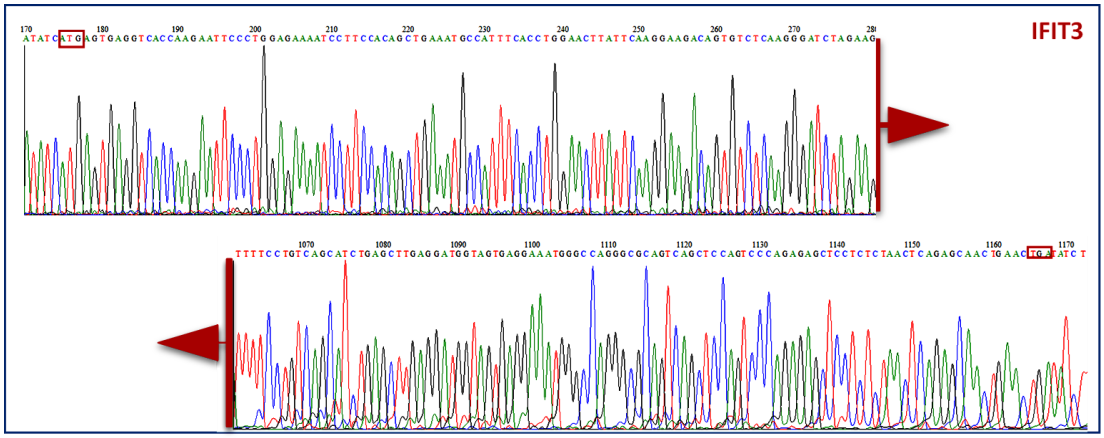
Plazmit vektörlerin restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi, vektör üzerinde taşınan cDNA'nın doğruluğu ve yönü hakkında bilgi vermekle birlikte, olası nükleotid hataları hakkında bilgi vermemektedir. Bu nedenle gerek PZR'undan kaynaklanabilecek hatalar, gerek sentetik primerler içerisinde bulunabilecek hatalar gerekse DNA kesim işlemleri ve ligasyon aşamasında ortaya çıkabilecek olası hataların belirlenmesi amacıyla tüm plazmit vektörlerde klonlanan genler DNA dizi analizi ile kontrol edildi (**Şekil 6-14**). DNA dizi analizi sonuçlarının teorik olarak tasarlanan vektör yapısı ve nükleotid dizileri ile birebir aynı olduğu ortaya kondu.

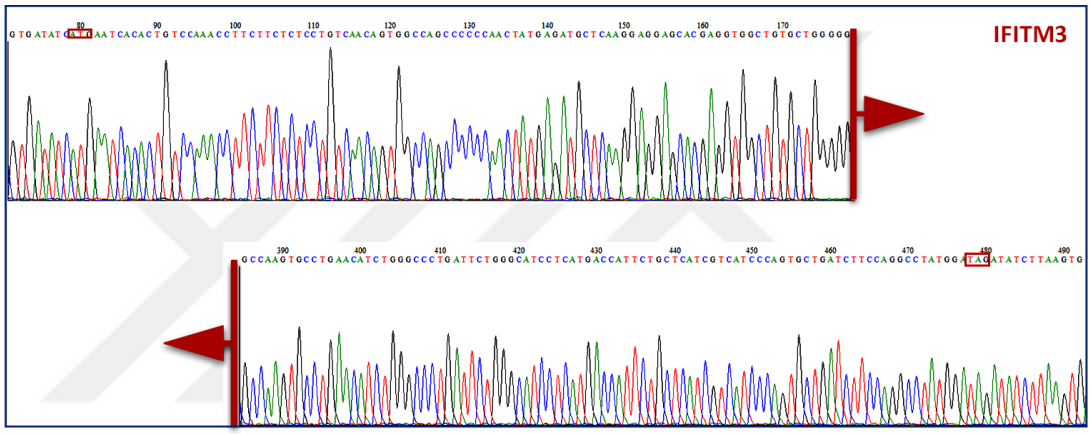


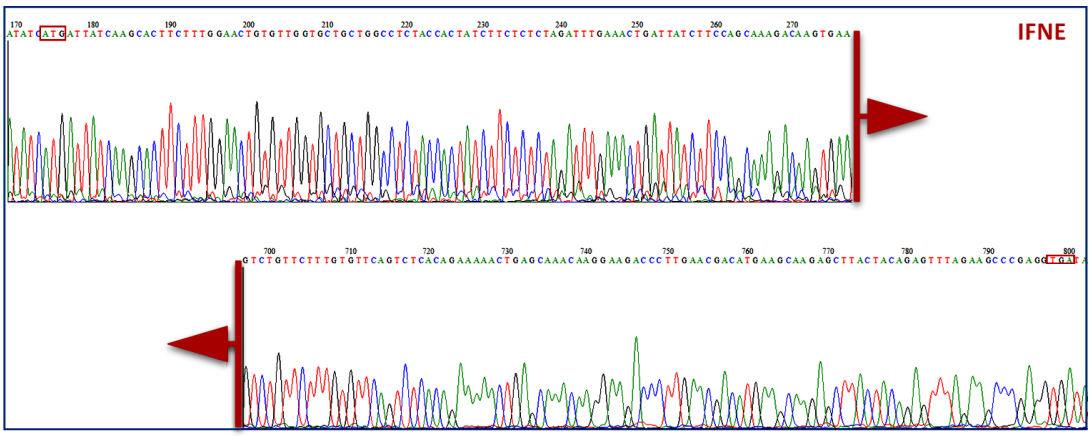
Şekil 6-14 . pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin dizi analizi kromatogramları. Gen isimleri şekil üzerinde belirtilmiştir. Kromatogramlar genlerin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.



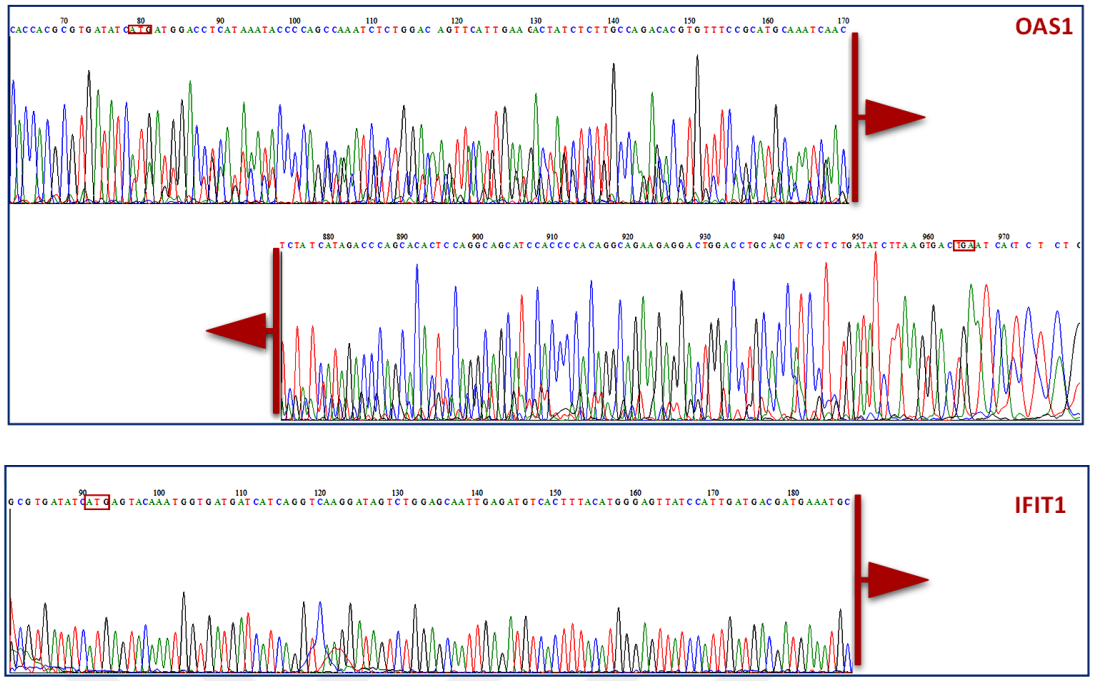
Şekil 6-14. (devamı) pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin dizi analizi kromatogramları. Gen isimleri şekil üzerinde belirtilmiştir. Kromatogramlar genlerin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.







Şekil 6-14. (devamı) pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin dizi analizi kromatogramları. Gen isimleri şekil üzerinde belirtilmiştir. Kromatogramlar genlerin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.



Şekil 6-14 (devamı) pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin dizi analizi kromatogramları. Gen isimleri şekil üzerinde belirtilmiştir. Kromatogramlar genlerin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

6.5. pCHA Plazmit Vektörüne Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Belirlenmesine İlişkin Veriler

pCHA plazmit vektörlerine klonlanan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genlerinin anlatım yapıp yapmadıkları, ekspresyon düzeyleri ve hücre içi lokalizasyonları Western melezleme ve immunfloresan teknikler ile ortaya kondu.

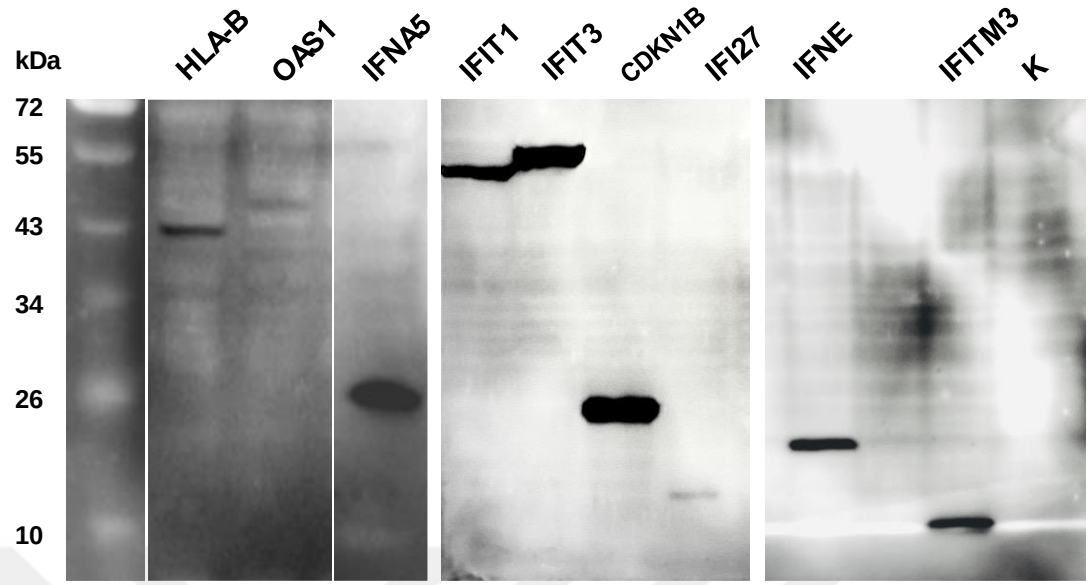
6.5.1. Western Melezleme Çalışmaları ile İlgili Veriler

İnsan *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* geni klonlanan plazmit DNA'lar ile transfekte edilen HEK293 hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve lizatlarda bulunan proteinler denatüre koşullarda %10'luk akrilamid gel üzerinde ayrıştırıldı. Ayrıştırılan proteinler PVDF membranlara transfer edildi. pCHA plazmit vektörü üzerinden kodlanan proteinler amino-terminal uçlarında YPYDVPDYA amino asitlerinden oluşan hemaglütinin (HA) uzantısı (epitopu) taşıdıklarından bu proteinlerinin görüntülenmesinde monoklonal anti-HA

antikorları kullanıldı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 6-15**'te verildi. HEK293 hücrelerinde pCHA plazmit vektörü üzerinden geçici olarak sentez edilen proteinlerin, amino asit içeriklerine göre ortalama molekül ağırlıkları Dalton (Da) olarak belirlendi (**Tablo 6-5**).

Tablo 6-5 pCHA plazmitine klonlanan genler tarafından kodlanan proteinlerin amino asit sayıları ve amino asit kompozisyonuna göre belirlenmiş molekül ağırlıkları (Dalton)

Plazmit Vektörler	**Kodlanan Proteinin Amino A. Sayısı**	**Proteinin Molekül Ağırlığı (Dalton)**
pCHA-CCL5	91 a.a	9989,11
pCHA-CDKN1B	198 a.a.	22072,14
pCHA-HLA-B	362 a.a.	40457,90
pCHA-IFNA5	189 a.a.	21941,29
pCHA-IFI27	122 a.a.	11540,93
pCHA-IFIT1	478 a.a.	55357,54
pCHA-IFIT3	490 a.a.	55981,98
pCHA-IFITM3	133 a.a.	14631,33
pCHA-IFNE	208 a.a.	24413,19
pCHA-OAS1	400 a.a	46026,19

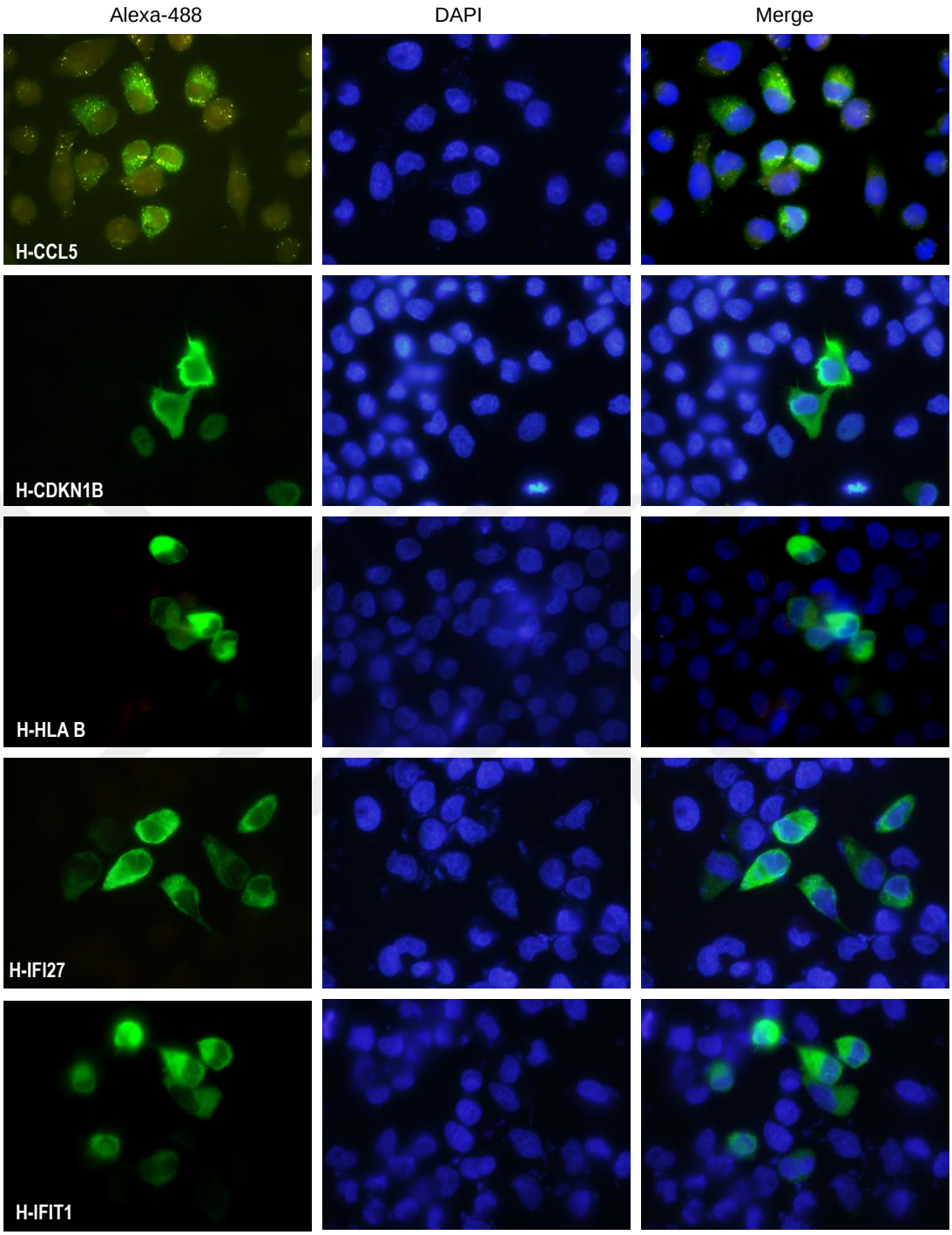


Şekil 6-15. Plazmit vektörlerle transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentezlenen IFIT1, IFIT3, CDKN1B, IFNA5, IFNE ve IFITM3 proteinlerinin Western melezleme yöntemi ile görüntülenmesi. Yöntem kısmında verildiği şekilde hazırlanan hücre lizatlarından %10'luk poliakrilamid jelde her bir kuyuya 15 µl örnek uygulandı. Elektroforez işlemi, ilk 15 dakika 40 V/jel, devamında 80 V/jel sabit gerilim altında 75-90 dakikada tamamlandı. K. Transfekte olmamış HEK293 hücre lizatı.

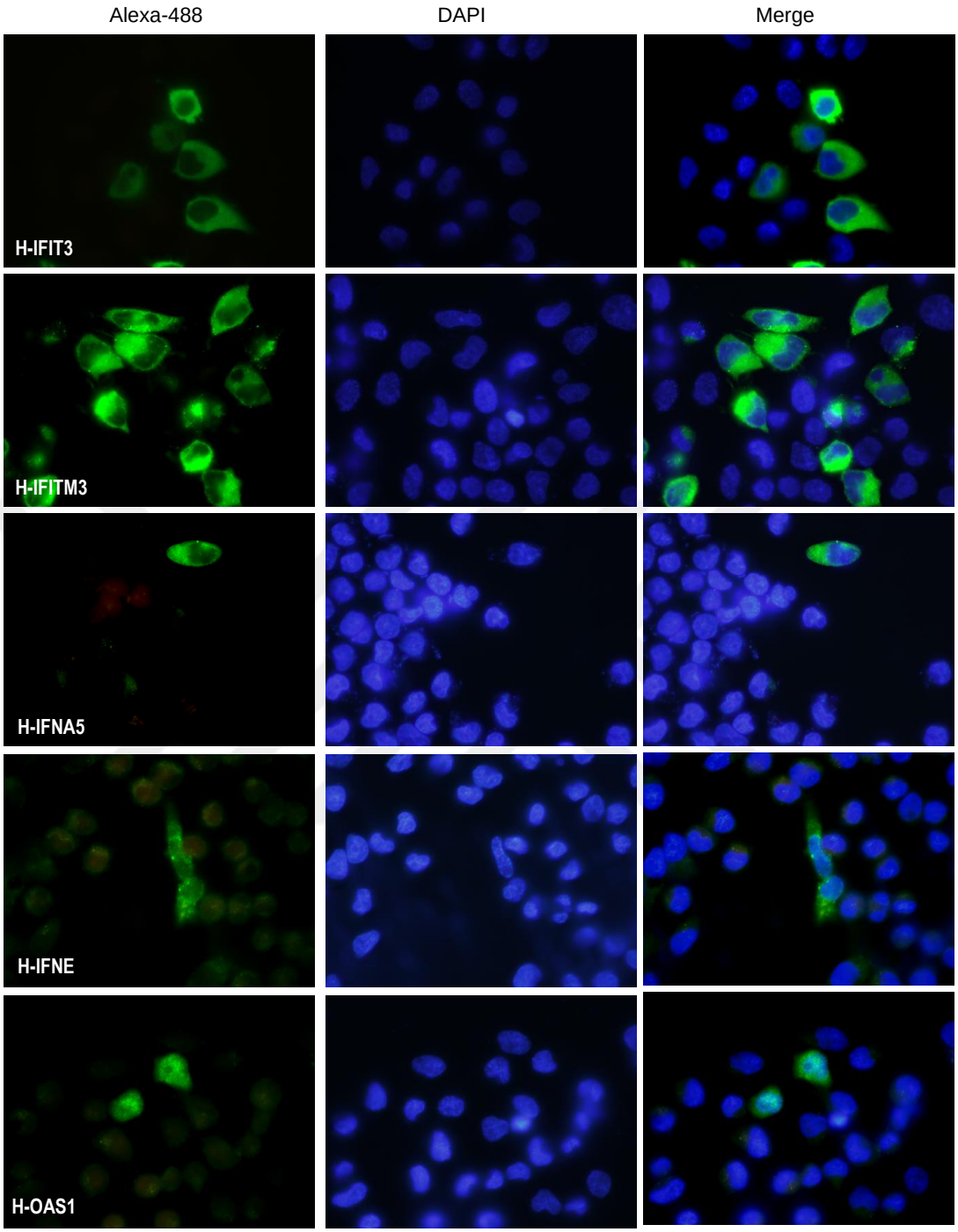
Western analizleri sonucunda da HLA-B için ~40.5 kDa, OAS1 için ~46 kDa, IFNA5 için ~22kDa, IFIT1 için ~55 kDa, IFIT3 için ~56 kDa, CDKN1B için ~22kDa, IFITM3 için ~15 kDa, IFNE için ~24 kDa ve IFI27 ~12 kDa büyüklüklerde beklenen protein bantları saptandı. Plazmitler ile transfekte edilen HEK393 hücrelerinde HA uzantılı CCL5 (~10 kDa) proteini Western melezleme tekniği ile görüntülenemedi. Plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentez edilen bu proteinler miktar olarak değerlendirildiğinde, IFNA5, IFIT3 ve CDKN1B proteinlerinin yüksek düzeylerde eksprese olduğu; OAS1 ve IFI27 proteinlerinin ise düşük düzeylerde eksprese olduğu saptandı.

6.5.2. İmmunfloresans Testler ile İlgili Sonuçlar

Western melezleme deneyleri, HEK293 hücrelerinde pCHA plazmit vektörlerine klonlanan genlerin büyük çoğunluğunun farklı düzeylerde de olsa anlatım yaptığını gösterdi. Aynı genlerin hücre içi lokalizasyonlarını belirlemek için, yine insan orijinli, fakat immunfloresans uygulamalar için daha elverişli olan HeLa hücreleri kullanıldı. Yuvarlak lameller üzerinde üretilen HeLa hücreleri PEI kullanılarak plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-48 saat sonra hücreler fikse edildi. Plazmitler üzerinden HA uzantılı olarak kodlanan proteinler Western melezlemede olduğu gibi monoklonal anti-HA antikorları ile işaretlendi. DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskop ile alınan görüntüler **Şekil 6-16'**da verildi. Genel olarak değerlendirildiğinde ele alınan tüm genlerin HeLa hücrelerinde ekspresyon yaptıkları, hücre içi lokalizasyon biçimleri bazı farklılıklar gösterse de ele alınan tüm proteinlerin sitoplazmada ya da sitoplazmik organellerde lokalize oldukları belirlendi. Floresan mikroskobu verileri, lazer taramalı mikroskoplar kadar belirgin lokalizasyon profilleri vermemekle birlikte, CCL5, IFITM3, IFNA5, IFNE ve OAS1 proteinlerinin sitoplazmada büyük olasılıkla sekresyon vezikülleri halinde lokalize olduğunu gösterdi. CDKNB1 proteinin daha çok hücre membranı sınırlarına yakın bölgelerde yoğunlaştığı görülürken; IFIT3, IFI27, HLA-B ve IFIT1 proteinleri sitoplazmada daha homojen dağılım gösterdiği belirlendi.



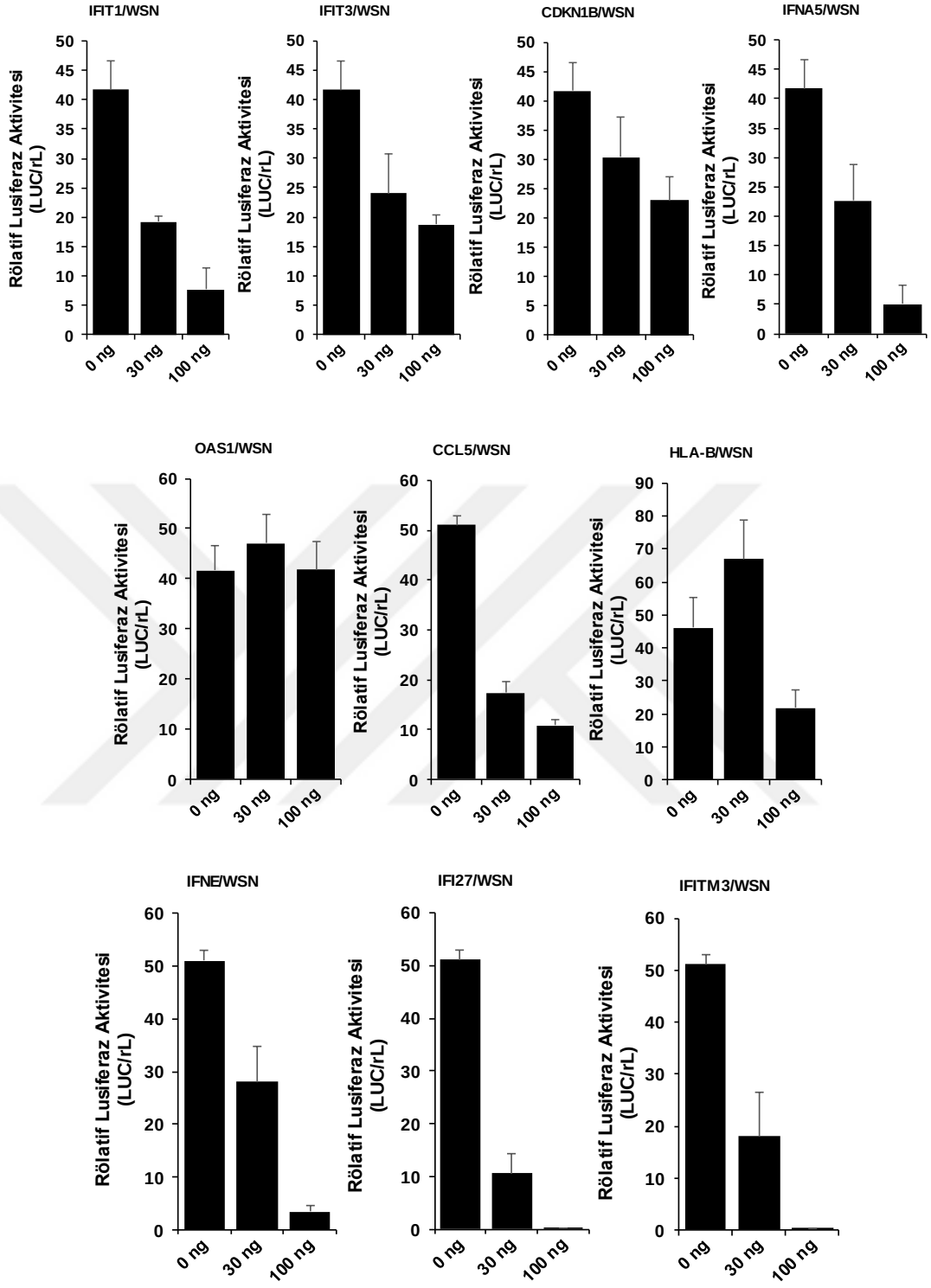
Şekil 6-16. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru (1/500 seyreltme); sekonder antikor olarak ise Alexa 488-konjuge anti-fare IgG antikoru (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.



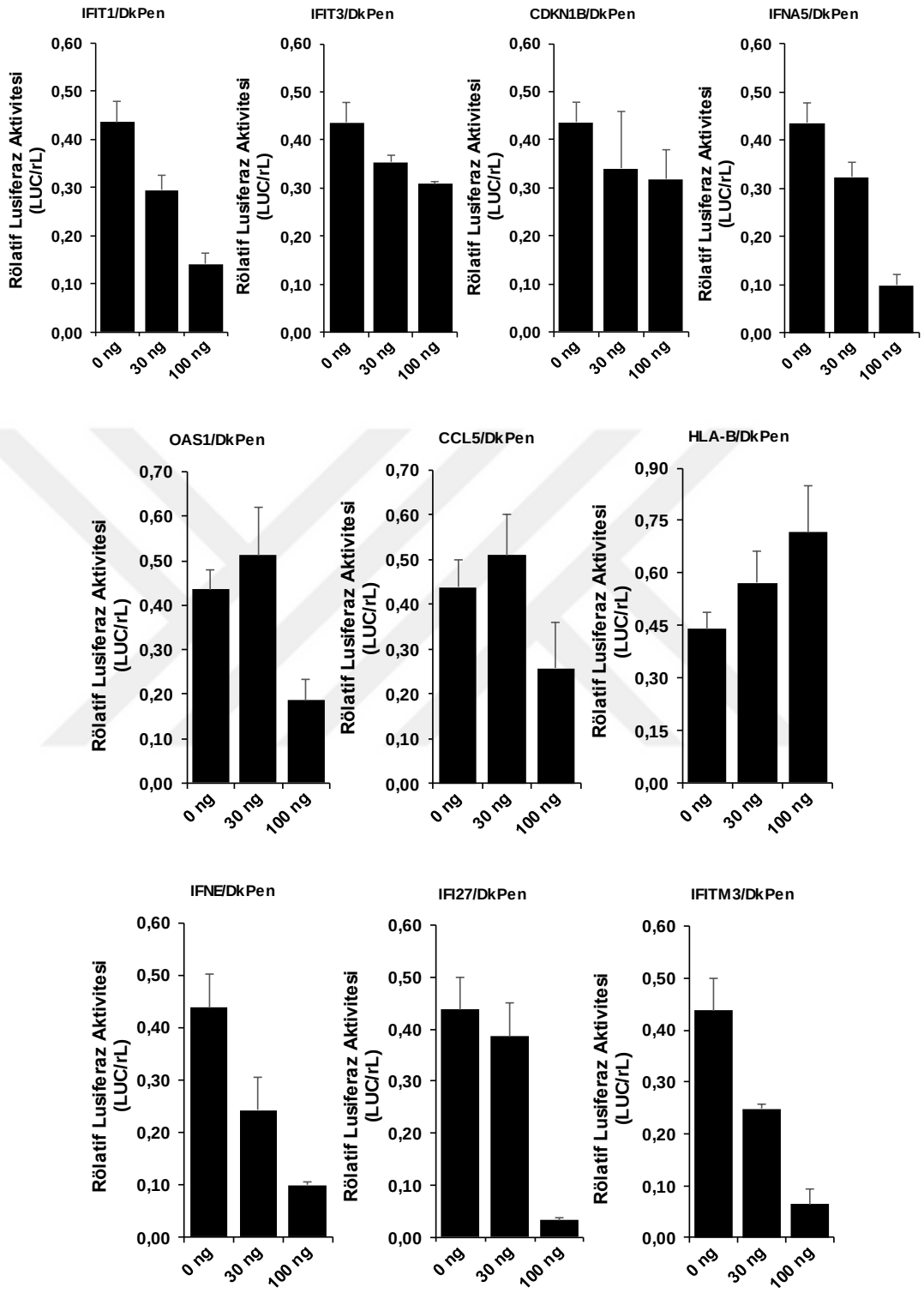
Şekil 6-16. (devamı) Plazmit vektörler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru (1/500 seyreltme); sekonder antikor olarak ise Alexa 488-konjuge anti-fare IgG antikoru (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

6.6. İnterferonlar ile İlişkili Seçilen Genler Tarafından Kodlanan Proteinlerin İnfluenza A virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkilerine İlişkin Veriler

HEK293 hücrelerinde CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 proteinindeki artışın insan ve kuş tipi influenza A virüsü RNA polimeraz enzimlerine etkileri, bu virüsler için geliştirilen minireplikon modelleri (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018) ile araştırıldı. Bunun için HEK293 hücreleri **Tablo 5-4**'de belirtilen miktarlarda influenza virüsü minireplikon plazmitleri ve artan miktarlarda insan proteinlerini kodlayan plamitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında kontrol Renilla lusiferaz ve RNA polimeraz enzim aktivitesi için belirteç işlevi gören ateş böceği lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. Lusiferaz aktiviteleri Renilla lusiferaz aktiviteleri ile normalize edildi ve elde edilen sonuçlar **Şekil 6-17** ve **Şekil 6-18** 'de verildi. Elde edilen sonuçlar, ele alınan proteinlerin büyük bir çoğunluğunun farklı düzeylerde de olsa her iki tip İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini negatif yönde etkilendiğini ortaya koydu. Buna karşın, HEK293 hücrelerinde OAS1 ve HLA-B proteinindeki artışın WSN ve DkPen tipi virüs RNA polimeraz enzimlerine etkilerinde farklılıklar gözlendi. HLA-B proteinindeki artış belirli konsantrasyonun üzerinde WSN tipi polimeraz enzimi üzerinde negatif etki yaparken, DkPen tipi polimeraz enzimini aktive edici yönde etki gösterdi. OAS1 proteinindeki artış ise WSN tipi polimeraz üzerinden önemli bir etki oluşturmadı, fakat DkPen tipi polimeraz enzimi üzerinde negatif etki oluşturdu.



Şekil 6-17. HEK-293 hücrelerinde artan miktarlarda CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 proteinlerinin insan tipi influenza A(WSN) virüsü üzerine etkileri.



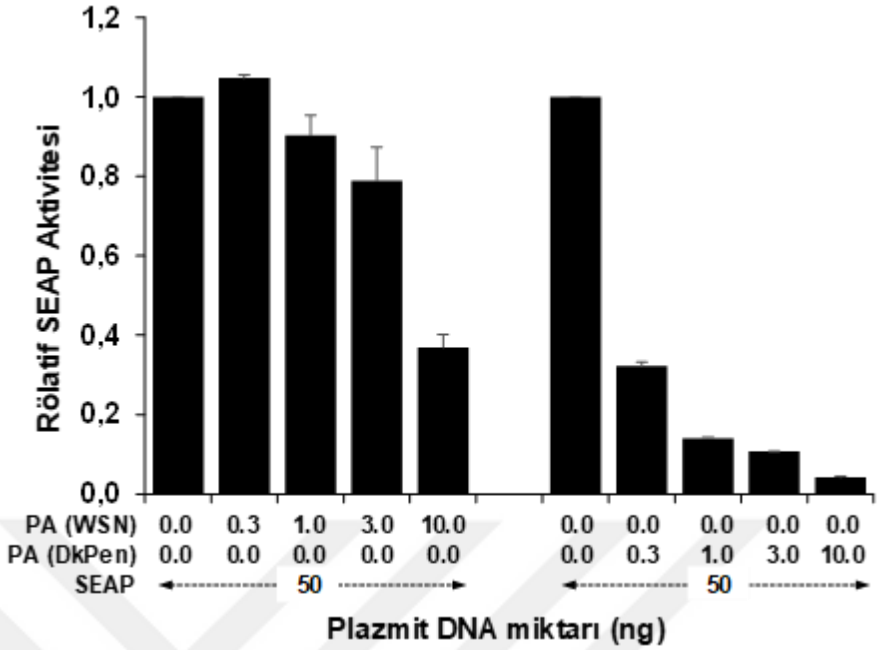
Şekil 6-18. HEK-293 hücrelerinde artan miktarlarda CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1 proteinlerinin kuş tipi influenza A(DkPen) virüsü üzerine etkileri.

6.7. İnfluenza A virüsü RNA Polimeraz Enzimi PA Alt Ünitesinin Transkripsiyon ve/veya Translasyon Üzerindeki Etkilerine İlişkin Veriler

Son yıllarda özellikle reverz genetik teknikleri ile yapılan araştırmalar İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden PA proteinin çok fonksiyonlu bir protein olduğunu, viral patogenez ve konak tercihi açısından da önem taşıdığını ortaya koymuştur (Hu ve Liu, 2015; Pham ve ark., 2018). Bu bakımdan tez çalışması kapsamında plazmit ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde diğer polimeaz alt birimlerinden bağımsız olarak tek başına sentez edilen PA proteinlerinin interferon ve interferon ile ilişkili genlerin ekspresyonuna etkileri araştırılmıştır (**bk. Şekil 6-9**). Bu araştırmalardan elde edilen önemli sonuçlardan biri de housekeeping genlerden ACTB geninin transkript düzeyinde görülen belirgin bir düşüş olmasıdır (**Şekil 6-2**, **Tablo 6-2**). Bir diğer çarpıcı sonuç, insan ve kuş tipi influenza A virüsü PA proteinleri ile yapılan testler sonucu elde edilen ekspresyon farklılıklarıdır. DkPen tipi İnflueza A virüsü PA proteininin WSN tipi PA proteinine göre çok daha yüksek oranlarda transkript düzeyinde azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar virüs ile enfekte olan hücrelerde de göze çarpmaktadır (**Şekil 6-10**). Bu bulgulardan yola çıkarak iki farklı İnfluenza A virüsü PA proteininin HEK293 hücrelerinde transkripsiyon ve/veya translasyon üzerindeki etkileri araştırıldı. Bunun için aşağıda sonuçları verilen iki farklı yol izlendi.

6.7.1. İnfluenza A Virüsü PA Proteinlerinin Belirteç SEAP Ekspresyonuna Etkileri ile İlgili Veriler

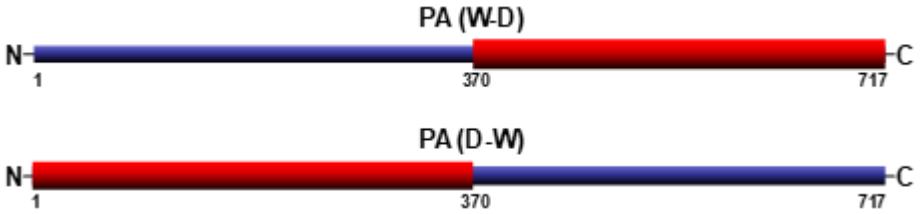
Bu testlerde $SV40_e$ promotörü kontrolünde SEAP belirteç geni taşıyan pSEAP plazmitinden yararlanıldı. Belirli miktarda pSEAP plazmit DNA'sı artan miktarlarda İnfluenza A virüsü PA proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 24 saat sonra besiyerine salgılanan SEAP enzimi aktivitesi belirlendi. Elde edilen sonuçlar, PA proteinlerindeki artışın SEAP enzimi ekspresyonunu inhibe ettiğini, WSN PA proteinindeki artışın % 60'ın üzerinde inhibisyona (10 ng plazmit DNA); DkPen PA proteinindeki artışın ise % 95'in üzerinde inhibisyona neden olduğunu ortaya koydu (**Şekil 6-19**).



Şekil 6-19. HEK293 hücrelerinde artan miktarlarda sentez edilen İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri. Hücreler 24-kuyulu plaklarda üretildi ve transfeksiyonda her bir kuyu için şekil üzerinde belirtilen miktarlarda plazmit DNA'ları kullanıldı. Her bir kuyu için kullanılan total plazmit DNA miktarı pCAGGS plazmit DNA'sı ile 250 ng'a tamamlandı. Transfeksiyondan 24 saat sonra kültür besiyerlerinden alınan örneklerde, ticari *SEAP assay* kiti kullanılarak SEAP aktiviteleri belirlendi. SEAP aktiviteleri, PA proteini kodlayan plazmit ile transfekte olmamış HEK293 hücrelerindeki aktivitelere oranlanarak rölatif olarak verildi.

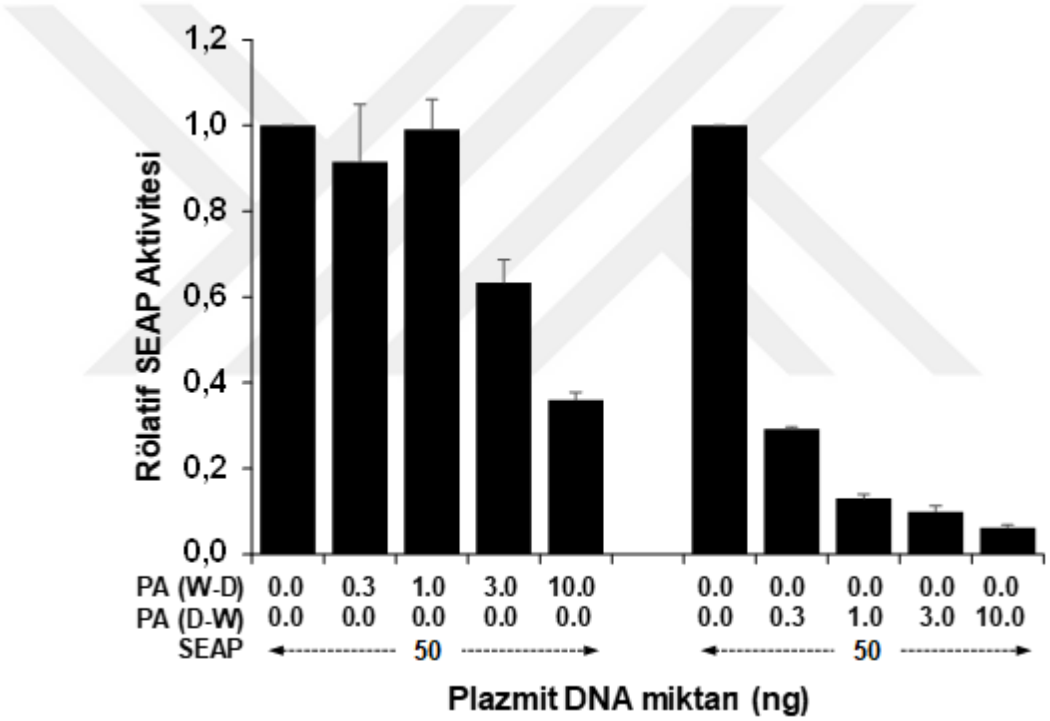
Şekil 6-19'da verilen sonuçlar DkPen tipi virüse ait PA proteinin HEK293 hücrelerinde WSN PA proteinine göre en az 30 kat (0.3 ng DkPen PA proteini 10 ng WSN PA proteinine yakın değerde inhibisyona yapmıştır) daha fazla SEAP enzimi ekspresyonunu inhibe ettiğini ortaya koydu.

PA proteininde saptanan bu inhibisyon etkisinin proteinin hangi bölgesinden kaynaklandığını saptamak amacıyla **Şekil 6-20**'de verilen DkPen ve WSN PA proteinlerinin kimerik formlarını kodlayan plazmit vektörler elde edildi.



Şekil 6-20. WSN ve DkPen tipi İnfluenza A virüsü PA proteinlerinden oluşan kimerik PA proteinlerinin şekilsel görünümü.

Kimerik PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkilerini ile ilgili veriler **Şekil 6-21'**de verildi. Elde edilen sonuçlar, HEK293 hücrelerinde SEAP geni ekspresyonu üzerinde görülen inhibisyondan PA proteinin amino-terminal bölgesinin sorumlu olduğunu ortaya koydu.

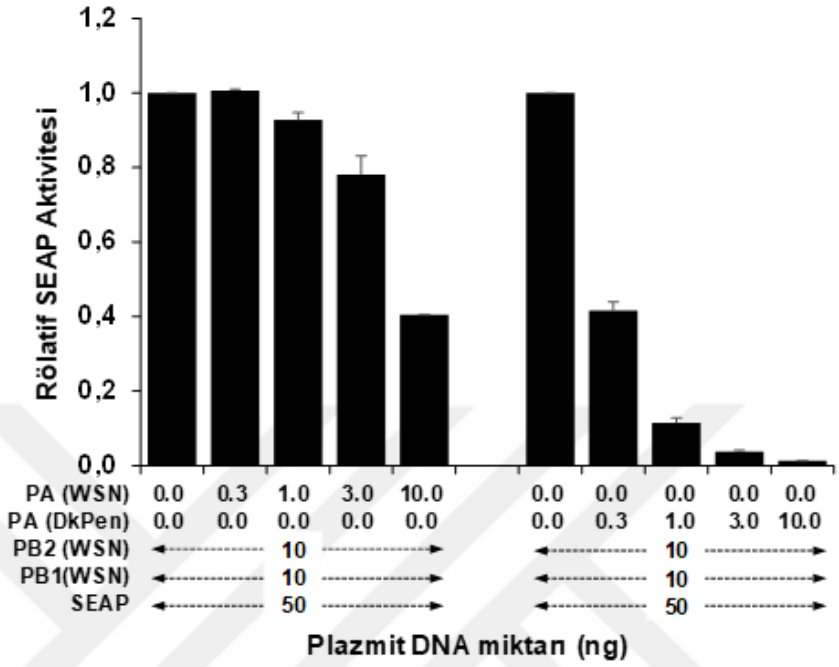


Şekil 6-21. WSN ve DkPen tip İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin karışımı olan kimerik PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri. Deney **Şekil 6-19'**da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

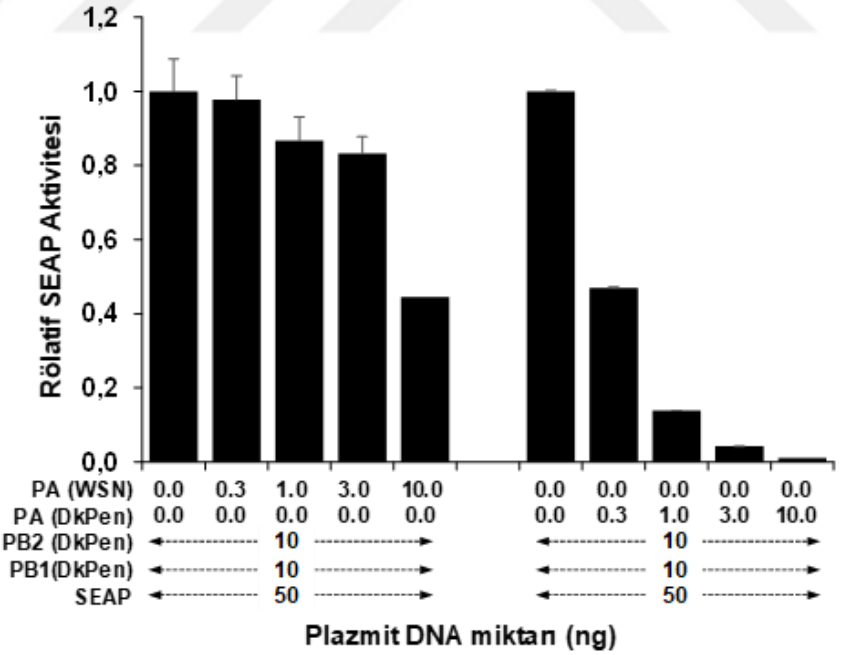
İnfluenza A virüsü proteini RNA polimeraz enzimi PB2, PB1 ve PA alt üniteleri trimerik kompleks halinde aktif bir enzimdir. Bu bakımdan HEK293 hücrelerinde PA proteininin PB2 ve PB1 proteinleri ile birlikte sentez edilmesi belirteç SEAP gen ekspresyonunu farklı şekilde etkileyebilir. Bu soruya yanıt bulmak için HEK293 hücreleri PB2, PB1 ve PA proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte

edildi. Artan miktarlarda PA sentez edilen hücrelerde SEAP aktiviteleri belirlendi. (**Şekil 6-22**).

A



B

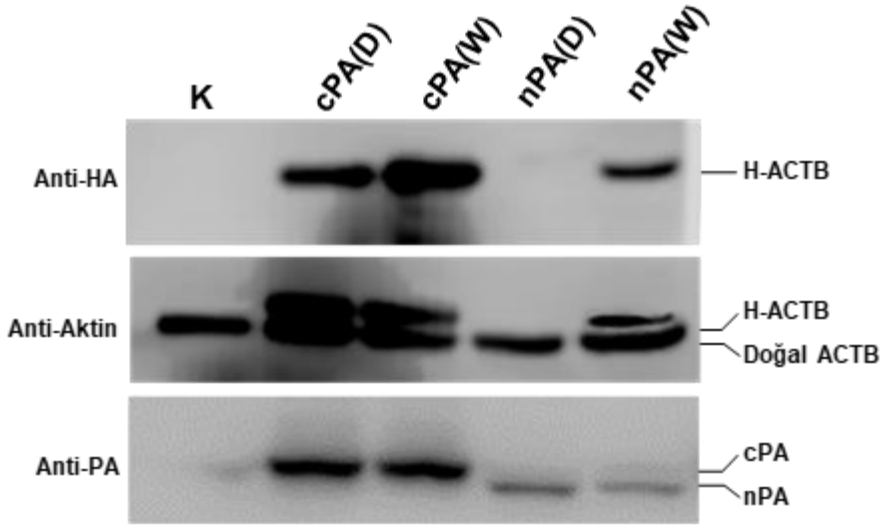


Şekil 6-22. HEK293 hücrelerinde İnfluenza A virüsü WSN (A) ya da DkPen (B) RNA polimeraz enzimi alt üniteleri PB2, PB1 ve PA ile birlikte sentez edilen PA proteinlerinin belirteç SEAP enzimi sentezine etkileri. Deney Şekil 6-19'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Elde edilen sonuçlar özellikle DkPen tipi PA proteinin, gerek WSN PB2 ve PB1 ile birlikte gerekse DkPen PB2 ve PB1 proteinleri ile birlikte sentez edildiğinde SEAP enzimi sentezini çok daha ileri düzeyde inhibe ettiğini ortaya koydu. Buna karşın WSN PA proteininin DkPen PA kadar SEAP enzimi sentezini üzerinde inhibe edici etki yapmadığı saptandı.

6.7.2. İnfluenza A Virüsü PA Proteinlerinin HEK293 Hücrelerinde ACTB Proteini Sentezine Etkileri ile İlgili Veriler

İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin HEK293 hücrelerinde belirteç SEAP geni ekspresyonuna etkilerini saptamak için yapılan deneyler özellikle DkPen tipi virüs PA proteinin amino-terminal yarımının transkripsiyon ve/veya translasyon üzerinde negatif etki yaptığını ortaya koydu. Benzer bir amaç için, daha önce farklı bir proje çalışmasında oluşturulan ve influenza A virüsü PA proteinlerinin sadece amino-terminal ya da karboksil-terminal yarımlarını kodlayan plazmitler kullanılarak, delesyonlu PA proteinlerinin HEK293 hücrelerinde doğal (endojen) ACTB ve pCHA-ACTB plazmit DNA'sı üzerinden kodlanan HA uzantılı ACTB (H-ACTB) sentezine etkileri Western melezleme tekniği ile araştırıldı. pCHA-ACTB plazmiti ile delesyonlu PA proteini kodlayan plazmit HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerden hazırlanan lizatlarda doğal ACTB ve H-ACTB proteinleri SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, karboksil-terminal yarımı delesyona uğratılmış DkPen PA (sadece amino terminal yarımdan oluşan PA / nPA) proteininin, pCHA-ACTB plazmiti üzerinden H-ACTB proteininin sentez edilmesini Western melezleme ile belirlenemeyecek düzeyde inhibe ettiğini gösterdi (**Şekil 6-23**). WSN virüsü nPA proteini sınırlı düzeyde H-ACTB protezini negatif yönde etkilerken, amino-terminal yarımları bulunmayan cPA (D) ve cPA(W) proteinlerinin bir etkisinin olmadığı ortaya kondu. Diğer taraftan endojen ACTB protein düzeyinin nPA(D) proteini ve diğer delesyonlu PA proteinlerinden etkilenmediği görüldü. Bu sonuç influenza A virüsü PA proteinlerinin özellikle yeni sentez edilmekte olan mRNA'lar üzerinde etkili olabileceği sonucunu verdi.



Şekil 6-23. HA uzantılı ACTB proteini kodlayan plazmit (pCHA-ACTB) ve delesyonlu PA proteini kodlayan bir plazmit (pCAGGS-cPA/D, pCAGGS-nPA/WSN, pCAGGS-cPA/DkP ya da pCAGGS-nPA/(WSN) ile birlikte transfekte edilen HEK293 hücrelerinde, doğal ACTB ve HA uzantılı ACTB protein ekspresyonunun Western melezleme ile analizi. HEK293 hücreleri 12-kuyulu plaklarda üretildi ve Metot kısmında (bkz.5.18.2) belirtildiği şekilde plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve ACTB proteinleri Western melezleme ile analiz edildi. Elektroforez işlemleri Şekil 6-15'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. **K**. Plazmit ile transfekte olmamış HEK293 hücre lizatını göstermektedir.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnfluenza A virüsleri, insanlarda solunum yolu hastalıklarının en önemli nedenlerinden biridir ve büyük ekonomik etkileri olan tekrarlayan mevsimsel salgınlardan sorumludur. İnsan influenza virüsleri ile diğer türleri enfekte eden virüsler arasında genom parçalarının karışması ve farklı kombinasyonlarda yeniden bir araya gelme (reassortment) potansiyeli, bu virüsleri olası bir pandemi için büyük bir tehdit haline getirmektedir (Horimoto ve Kawaoka, 2001; Webby ve Webster, 2003; Morens ve ark., 2009; Lowen, 2017; Sobel Leonard ve ark., 2017). İnfluenza virüsleri, etkin enfeksiyon oluşturmak ve dolayısıyla hastalığa neden olmak için, enfeksiyonlar sırasında çok hızlı aktive olan konak doğal bağışıklık tepkilerinin üstesinden gelmek zorundadır. Antiviral özellik gösteren sitokinlerin içerisinde yer alan interferonlar (IFN'lar), bu yanıtlarda önemli bir rol üstlenir ve adaptif immün yanıtın ortaya çıkmasından önce virüs enfeksiyonlarının erken aşamalarda sınırlanmasında kritik öneme sahiptir. IFN'lar ve diğer doğuştan gelen immün yanıt sistemi bileşenleri, influenza virüsü enfeksiyonları sonucu ortaya çıkan hastalık tablosunun şiddetini ve sonucu etkileyen temel faktörlerdir (Kash ve ark., 2006)

İnterferonlar ilk olarak 1957 yılında keşfedilen, antiviral etki gösteren çözünür formda glikoproteinlerdir (Isaacs ve Lindenmann, 1957; Isaacs ve ark., 1957). Bu glikoproteinler yapısal ve işlevsel özelliklerine ve hücre yüzeyi reseptörlerine göre, tip I, tip II ve tip III interferonlar olarak sınıflandırılmıştır (Pestka ve ark., 2004b; Stark, 2007; Zhou ve ark., 2014). İnterferonlar, viral veya bakteriyel enfeksiyonlara karşı konakçı tepkisinde antiviral, antiproliferatif ve immünomodülatör etkiler gösterirler. Dolayısıyla, interferon indüksiyonu viral enfeksiyonlara karşı konak organizmayı koruyan güçlü bir araçtır (Pitini ve ark., 2010). İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarında birincil hedef hücreler, üst solunum yolunun epitel hücreleridir. Viral enfeksiyon ile proinflamatuar sitokinler interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-2 (IL-2), çeşitli kemokinler, alfa tümör nekrozu faktör (TNFα), interlökin-8 (IL-8) ve sınırlı miktarlarda tip I interferon α/β ekspresyonu uyarılır (Matikainen ve ark., 2000). Diğer taraftan influenza A virüsü ile enfekte dendritik hücreler (Dendritic cell; DC), özellikle plazmasitoid DC'ler, influenza virüsü enfeksiyon dozuna bağlı olarak yanıt verir, düşük titreli H1N1 influenza virüsü enfeksiyonu durumunda bile yüksek oranda

IFNα/ß ekspresyonunu indükler (Cella ve ark., 2000; Matikainen ve ark., 2000). IFN'lar, enfekte hücrelerde viral bileşenlerin ortaya çıkmasından hemen sonra sentez edilir ve salgılanırlar. Bu proteinlerin hücre membranında yer alan kendileri için özgün reseptörlere bağlanması, virüsün daha fazla çoğalmasını ve yayılmasını sınırlayacak bir "antiviral durum"oluşturan yüzlerce farklı interferon ile uyarılan genin (interferon-stimulated genes; ISG) up-regüle olmasına neden olur (Randall ve Goodbourn, 2008). Bu genlerden bazılarının doğrudan anti-influenza virüsü aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. İnterferonlar tarafından sentezi uyarılan Mx ailesi GTPaz proteinleri viral nükleokapsidler ile etkileşime girerek bunların nükleo-sitoplazmik transportunu ve/veya viral genomun replikasyon/transkripsiyonunu inhibe ederek etkilerini gösterirler (Haller ve ark., 1980; Pavlovic ve ark., 1992; Turan ve ark., 2004; Xiao ve ark., 2013). Benzer şekilde IFN'lar ile ilişkili genler tarafından kodlanan viperin, virüslerin hücre membranından tomurcuklanmasını etkileyerek enfekte hücrelerden viral partiküllerin serbest kalmalarını sınırlarken (Wang ve ark., 2007); IFN ile indüklenen proteinlerden transmembran (IFITM) ailesi proteinler, özellikle IFITM3, viral ve endozomal membranların füzyonunu zorlaştırarak, virüs genomlarının hücre içerinde serbest kalmasını engeller ve virüsün hücreye girişini önemli ölçüde sınırlar (Brass ve ark., 2009; Li ve ark., 2013; Desai ve ark., 2014).

Yukarıda da değinildiği gibi özellikle influenza virüsleri gibi RNA genomu taşıyan virüsler, interferonlar aracılığıyla ya da virüse ait bileşenlerinin hücre içerisinde sentez edilmesi sonucunda birçok konak geninin ekspresyon profilinde değişikliğe yol açar. Bunun nedenleri arasında, nükleotid trifosfatlar gibi hücresel metabolitlerin ağırlıklı olarak virüs bileşenlerinin sentezinde kullanılması ve/veya çeşitli viral proteinleri transkripsiyon aşamasında ya da transkripsiyon sonrasında konak hücre genlerinin işleyişini regüle etmesidir. Bu çalışmada da insanlar için büyük bir sağlık sorunu olan ve ciddi riskler barındıran influenza A virüsleri ile enfekte olmuş ya da sadece viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini sentez eden hücrelerde interferon cevabı ile ilişkili sınırlı sayıda genin ekspresyon profillerinin nasıl etkilendiği; seçilen belirli sayıda gen üzerinden kodlanan proteinlerin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri araştırıldı. İki farklı tipte influenza A virüsü (WSN ve DkPen) ile enfekte edilen ya da viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmit DNA'lar ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde interferon ve interferonlar ile

ilişkili genlerin transkript düzeyleri gerçek zamanlı qPZR ile belirlendi. Çalışmada Qiagen şirketi (Qiagen, Hilden, Almanya) tarafından 96 kuyulu plaklar halinde tasarlanan, interferonlar ve interferonlar ile ilişkili 84 farklı gen, 5 housekeeping gen (ACTB, B2M, GAPDH, HPRT1 ve RPLP0), 3 pozitif kontrol, 3 reverz transkripsiyon kontrolü ve 1 genom DNA kontaminasyon kontrolü içeren "*RT² Profiler PCR Array*" kiti kullanıldı (**Şekil 6-3, Tablo 6-1**).

Çalışmaya insan ve kuş tipi influenza A virüsleri (WSN ve DkPen) ile enfekte edilen ya da viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden total RNA ekstraksiyonu ile başlandı. İzole edilen RNA moleküllerinin kalite ve kantite açısından uygunluğu agaroz jel elektroforezi analizleri ile belirlendi (**Şekil 6-1**). RNA'ların kalitesi kadar çalışmada sonucu etkileyecek aşamalardan biri de cDNA'ların hazırlanması aşamasıdır. Elde edilen total RNA molekülleri üzerinden oligo dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA'lar hazırlandı. Reverz transkripsiyon reaksiyonun beklenen şekilde gerçekleşdiği, housekeeping genlerden ACTB ve PBGD geni cDNA'larının özgün oligonukleotid primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılması ve PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi analizleri sonucunda ortaya kondu (**Şekil 6-2**).

İki farklı tipte influenza A virüsü (WSN ve DkPen) ile enfekte edilen HEK293 hücreleri için hazırlanan cDNA'larda interferon yanıtı ile ilgili 84 farklı gen ve 5 farklı housekeeping gene ait transkript düzeyleri gerçek zamanlı qPZR ile belirlendi ve sonuçlar Bio-Rad gerçek zamanlı PZR analiz programı ile değerlendirildi. Ele alınan tüm genlerin transkript düzeyleri, STAT3 geninin transkript düzeyi ile normalize edildi ve her bir gen için rölatif ekspresyon değerleri ortaya kondu (**Şekil 6-4 ve Şekil 6-5**). STAT3 geni ekspresyon düzeyi temel alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda WSN ile enfekte olan hücrelerde 32 genin, DkP ile enfekte olan hücrelerde 18 genin up-regüle olduğu, bunlardan 15 genin ortak olduğu saptandı (**Şekil 6-5**). Buna karşın WSN ile enfekte hücrelerde 19 genin, DkPen ile enfekte hücrelerde ise 32 genin down-regüle olduğu ve 17 genin ekspresyon düzeyin birbirine yakın olduğu belirlendi.

İnfluenza A virüsleri birçok kuş ve memeli organizma türlerinde enfeksiyon yapabilen, geniş bir konak yelpazesine sahip virüslerdir (Cauldwell ve ark., 2014; Long ve ark.,

2019). Farklı virüs tiplerinin konaklar arası geçişlerinde, gerek virüsün genetik özelliklerinden kaynaklanan nedenlere bağlı olarak gerekse konak hücrelere ait çeşitli faktörlerin etkisi ile çeşitli bariyerler ile karşılaşılmaktadır. Kuş türleri tüm influenza A virüsü tipleri için rezervuar görevi görmekle birlikte, kuş tipi influenza A virüsleri zaman zaman memeli türlerini enfekte edebilecek şekilde adaptasyon geçirebilmektedir (Webster ve ark., 1992; Yoon ve ark., 2014; Wille ve Holmes, 2020). Hücresel bariyerler arasında konak hücrelere ait interferon savunma mekanizmaları çok önemli bir yer tutmaktadır. Dolayısıyla farklı virüs tipleri ile enfekte olan hücrelerde hücresel gen ekspresyon profillerinin değişmesi ve farklılıklar göstermesi beklenen bir durumdur. Yapılan bu çalışmada, insan tipi İnfluenza A/WSN ve kuş tipi influeza A/DkPen tipi virüslerin HEK293 hücrelerinde interferonlar ve interferonlar ilişkili gen profillerinde önemli farklılıklara neden olduğu görüldü. Genel bir değerlendirme yapıldığında İnfluenza A/DkPen virüslerinin, WSN tipi virüslere göre konak hücrelerde daha fazla sayıda genin ekspresyon düzeyinde negatif regülasyona neden olduğu saptandı. Kuş tipi influenza A virüslerinin, insan tipi virüslere göre memeli hücrelerinde daha düşük replikasyon profiline sahip olduğu bilinmektedir (Slepushkin ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2013; Wille ve Holmes, 2020). Bunun nedenleri arasında, DkPen tipi influenza A virüsü RNA polimeraz enziminin memeli hücrelerinde WSN tipi virüs RNA polimeraz enzimine göre çok daha düşük aktiviteye sahip olmasıdır (Pham ve ark., 2018). Bazı durumlarda İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini kodlayan genlerde meydana gelen nokta mutasyonları enzimin memeli hücrelerinde aktivitesinin etkin bir şekilde artmasına ve virüsün patojen hale gelmesine neden olabilmektedir. Yapılan çalışmalarda farelerde düşük patojeniteye sahip H5N2 tipi İnfluenza A/aquatic bird/Korea/WI81/2005 virüsünde PA proteinindeki PA-T97I mutasyonu adaptasyon için kritik olduğu saptanmıştır (Song ve ark., 2009; Taft ve ark., 2015). Minireplikon testleri ile yapılan çalışmalarda da viral RNA polimeraz enzimi PB2 alt ünitesinde meydana gelen PB2-E192K mutasyonunun virüsün hem memeli hem de kuş hücrelerinde replikasyon yeteneğini arttırdığı gösterilmiştir (Taft ve ark., 2015). Chakrabarti ve ark. (Chakrabarti ve ark., 2010) kuşlarda yüksek patojeniteye sahip İnfluenza A (H5N1) virüsü ile enfekte edilen insan akciğer hücrelerinde (A549) hücresel gen ekspresyon profillerini mikroçip (microarray) platformu üzerinde değerlendirmişler reverz genetik teknikler ile

modifiye edilmiş rekombinant bir influenza A (H5N1) virüsü ile karşılaştırmışlardır. Daha çok apoptoz yolakları ile ilişkili genlerin ve sınırlı sayıda interferon yolaklar ile ilişkili genin ele alındığı bu çalışmada, virüsün konak organizmada apaptoz ve immün yanıtlarda yol açtığı küçük değişikliklerin patojenik virüsleri daha virülan hale getirdiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, interferon ya da interferonlar ile ilişkili genler tarafından kodlanan proteinlerin İnfluenza A virüsü replikasyonuna etki mekanizmasını saptamaya yönelik bir araştırma hedeflenmiş olmakla birlikte, *CCL5* (Chemokine :C-C motif: ligand 5), *HLA-G* (Major histocompatibility complex, class I, G), *IFIT2* (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2), IFNB1, (Interferon, beta 1), *IFNW1* (Interferon, omega 1) ve *OAS1* (2'-5'-oligoadenylate synthetase 1) genlerinin özellikle artan ekspresyon düzeylerine göre öne çıktığı görüldü. *CCL5, HLA-G, IFNB1, IFNW1* ve *OAS1*genlerinin hem DkPen hem de WSN için ortak olması, virüsün tipine bağlı olmaksızın bu genlerin viral replikasyon için daha önemli olabileceğini düşündürdü. Virüs ile enfekte hücrelerde en çok azalma *SOCS1* (Suppressor of cytokine signaling 1) ve OAS2 (2'-5'-oligoadenylate synthetase 2) genleri transkript düzeylerinde görüldü. *SOCS1* geni düzeyinin her iki virüs tipinde de negatif yönde regüle olduğu belirlendi. *OAS2* ise sadece DkPen ile enfekte hücrelerde en çok azalma gösterdi.

CCL5 geni, yedi-transmembran domaini taşıyan G-protein-bağlı bir reseptör proteini kodlamaktadır. CCL5 proteini, CCL3 ve CCL4 reseptörleri ile birlikte C-C kemokin ailesi içerisinde yer alır (Soria ve Ben-Baruch, 2008). CCR5 reseptörü çeşitli sinyal kaskadlarına aracılık eder ve HIV için majör koreseptör görevi görür (Oppermann, 2004). Bu proteinin virüsler ile ilişkisi hakkında fazla veri bulunmamaktadır. Yapılan bir çalışmada İnfluenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerinde transkript düzeyi up-regüle olan CCL5 geninin virüsü replikasyonunu negatif yönde etkilediği, bu gen bakımından mutant farelerin virüs enfeksiyonuna çok duyarlı olduğu bildirilmiştir (Tyner ve ark., 2005). Bu çalışmada da hem WSN henm de DkPen tipi virüs ile enfekte edilen HEK293 hücrelerine *CCL5* geni transkript düzeyinin arttığı saptanmıştır. WSN tipi virüslerde DkPen tipi virüslere göre ortalama 5 kat daha fazla artış görülmüştür. Bu farklılığın virüs-konak spesifikliği açısından önemli olup olmadığı bilinmemektedir.

HLA-G proteini ilk olarak Geraghty ve ark. tarafından HLA-E ve HLA-F'yi de kapsayan klasik olmayan insan lökosit antijeni (HLA) ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmıştır (Geraghty ve ark., 1987). HLA-G proteini ekspresyonu ile birçok bakteri ve virüs kaynaklı enfeksiyon ilişkilendirilmiştir (Amiot ve ark., 2014). HLA-G proteini insanlarda, HIV (human immunodeficiency virus), HPV (human papillomavirus) ve human cytomegalovirus virus (HCMV) enfeksiyonlarında önemli bir genetik duyarlılık faktörü olduğu bilinmektedir. Virüs ile enfekte hastalarda ya da hücrelerde hem çözünür formda hem de membran bağlı HLA-G düzeyinin arttığı saptanmıştır (Fainardi ve ark., 2011; Amiot ve ark., 2014; Segat ve ark., 2014). HLA-G düzeyindeki artış influenza A virüsleri ile enfekte hastalarda gösterilmiştir (LeBouder ve ark., 2009; Chen ve ark., 2011). Bu çalışmada da hem insan tipi hem de kuş tipi influenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerde *HLA-G* geninin transkript düzeyi en çok artan genler arasında olduğu saptanmıştır. *HLA-G* geni transkript düzeyinde oransal olarak DkPen tipi virüsler ile enfekte olan hücrelerde WSN tipi virüslere göre ortalama 3-4 kat daha yüksek bir artış görülmüştür.

Virüs ile enfekte HEK293 hücrelerinde enfekte olmamış hücreler göre transkript düzeyindeki artış ile göze çarpan genlerden biri de *OAS1* geni olmuştur. İnsan *OAS1* geni; *OAS2*, *OAS3* ve *OASL* genlerini de içine alan *OAS* gen ailesi içerinde yer alır (Hovanessian, 2007). Bu genler interferonların tarafından uyarılan genler arasında yer alır. *OAS* genler tarafından kodlanan 2'-5 'oligoadenilat sentetaz enzimleri, enfekte olmuş hücrelerde RNA virüslerinin replikasyonu/transkripsiyonu oluşan çift zincirli RNA molekülleri ya da sekonder yapıda RNA molekülleri varlığında aktive olurlar ve ATP moleküllerinin 2'-5' oligoadenilat şeklinde oligomerize olmasını kataliz ederler (Kodym ve ark., 2009; Melchjorsen ve ark., 2009). Oluşan moleküllerinin 2'-5' oligoadenilat molekülleri hücrelerde inaktif halde bulunan RNaz L enzimlerine bağlanarak onları aktive ederler. Dimer halinde etkinleştirilmiş olan RNase L enzimi hem viral ve hem de hücresel RNA moleküllerini yıkarak protein sentezini engeller (Castelli ve ark., 1997; Zhou ve ark., 1997; Chakrabarti ve ark., 2012). Dolayısıyla OAS–RNase L system, İnfluenza A virüsleri gibi negatif polarite gösteren RNA genomuna sahip virüsler ile birlikte *picornavirus*, *flavivirus* ve *alphavirus* gibi pozitif polariteye sahip RNA virüslerinin de replikasyonunu önemli ölçüde sınırlar (Silverman, 2007). Bu çalışmada da İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen HEK293

hücrelerinde OAS1 transkript seviyesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Bu artışın viral enfeksiyona bağlı interferon sistemin aktive olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

İnfluenza virüsleri enfekte ettikleri hücrelerde interferon savunma sistemini güçlü bir şekilde uyarırlar (Osterlund ve ark., 2012; Davidson ve ark., 2015; Killip ve ark., 2015; Shim ve ark., 2017). Bu uyarıda en önemli aktörler interferonlardır. Bunlardan biri olan interferon beta 1 proteini, *IFNB1* geni tarafından kodlanmaktadır. Birçok çalışmada İnfluenza A virüsleri ile enfekte olan hücrelerde IFNB1 düzeyinde önemli ölçülerde artış olduğu saptanmıştır (Wang ve ark., 2011a; Wang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2019). Yaptığımız bu çalışmada da iki farklı tipte İnfluenza A virüsü ile enfekte HEK293 hücrelerinde IFNB1 geni transkript düzeyi belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Bununla birlikte IFNB1 transkript düzeyinin WSN tipi virüsleri ile enfekte olan hücrelerde DkPen ile enfekte hücrelere oranla iki kat daha yüksek olduğu saptandı.

İnfluenza A virüsleri ile enfekte HEK293 hücrelerinde Sitokin Sinyal Baskılayıcı 1 (*Suppressor of Cytokine Signaling 1*) proteinini kodlayan *SOCS1* geni (Minamoto ve ark., 1997) transkript düzeyindeki önemli oranda azalma ile dikkat çekmiştir. *SOCS1* geni trankript düzeyi WSN tipi virüsler ile enfekte olan hücrelerde DkPen tipi virüsler ile enfekte hücrelere göre ortalama 35-40 kat daha fazla olmuştur. Bu bakımdan *SOCS1* geni tarafından kodlanan proteinin kuş tipi influenza A/DkPen virüslerinin memeli hücrelerinde replikasyon için önemli bir bariyer olabileceği düşünülmüştür. Viral enfeksiyonlara yanıt olarak, IFN'lar gibi sitokinler ile birlikte, indüklenebilen sitokin düzenleyici sistem olarak bilinen sitokin sinyal baskılayıcıları (SOCS) da aktive edilir. Şu ana kadar bu protein ailesi içerisinde SOCS1-SOCS7 ve sitokinle indüklenebilir Src homoloji 2 proteini olmak üzere sekiz farklı protein tanımlanmıştır (Yoshimura ve ark., 2007). SOCS1 proteini, JAK/STAT sinyal yolağını engelleyerek IFN sinyal düzenlenmesinde önemli bir rol üstlenir (Dimitriou ve ark., 2008; Liau ve ark., 2018). SOCS1, amino-terminalinde SH2 domaini taşır ve amino-terminalde SH2 bölgesini bir kinaz inhibitör bölgesi izler. SOCS1 proteininin bu domaini JAK2 proteinin aktivasyon ve katalitik bölgelerine bağlanarak JAK2 proteinini bloke eder (Ahmed ve ark., 2015). Bu da IFN regülasyonu açısından önemlidir. Bu çalışmada,

influenza A virüsü ile enfekte hücrelerde *SOCS1* transkript düzeyinde önemli ölçüde azalma saptanmış olmakla birlikte bu durumun enfeksiyon açısından önemini gösteren yeterli veri bulunmamaktadır. SOCS1 ve aynı protein ailesi içerisinde yer alan SOCS3 proteinlerinin influenza A virüsü enfeksiyonuna bağlı akciğer mukozasında doğuştan gelen bağışıklık yanıtı için negatif regülatör olarak işlev gördükleri gösterilmiştir (Pothlichet ve ark., 2008).

Viral enfeksiyon sırasında konak hücre gen transkriptlerindeki artış ya da azalış her zaman transkripsiyon düzeyinde gerçekleşmez. Bazı viral proteinler konak hücre transkriptlerinin destabilize olmasına ya da yıkılmasına da neden olabilir. İnfluenza A virüsü NS1 proteinleri konak hücre proteinlerinin poliadenilasyonunu bloke ederek destabilize olmasına neden olur. Oysa viral mRNA'ların poliadenilasyonu virüsün RdRP enzimi ile gerçekleştirilir ve bu durumdan etkilenmez (Qiu ve Krug, 1994). NS1 proteinin bir diğer önemli etkisi de konak hücre mRNA'lanın kırpılması (splicing) üzerinedir. Kırpılma sırasında insan U6 snRNA'nın spesifik bölgelerine bağlanarak U6-U2 and U6-U4 snRNA etkileşimini engeller (Qiu ve ark., 1995). Konak hücre transkriptlerinin stabilitesini etkileyen en önemli viral faktörlerinden biri de influenza virüsü RNA polimeraz enzimidir. Bu enzim konak hücrelerde özellikle yeni sentez edilmekte olan mRNA'ların 7-metil guanozin şapka (CAP) yapısını kesme (CAP-snaching) aktivitesine sahiptir. Viral RNA polimeraz enzimi mRNA'lardan koparttığı bu yapıları primer olarak kullanır (De Vlugt ve ark., 2018). CAP yapısı mRNA'ların hem stabilitesi bakımından önemlidir hem de mRNA'ların sitoplazmaya taşınmasında etkilidir. Bir diğer önemli işlevi de translasyon olayında başlangıç komplekslerinin kurulmasına yardımcı olmaktır (Ramanathan ve ark., 2016). Dolayısıyla enfeksiyon sırasında influenza virüsü RNA polimeraz enziminin konak hücrelerde mRNA'ların CAP yapılarını koparması hem transkript düzeyini etkilemekte hem de konak hücre proteinlerinin translasyonunu önemli ölçüde yavaşlatmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden PA proteinin nükleaz aktivitesine sahip olduğu ve CAP-snaching olayında da ana aktör olduğu ortaya konmuştur (Dias ve ark., 2009; De Vlugt ve ark., 2018). Bu nedenlerden dolayı bu çalışmada influenza virüsü RNA polimeraz enzimi alt üniteleri (PB2, PB1 ve PA) birlikte sentez edilen ya da sadece PA alt birimi sentez edilen HEK293 hücrelerinde

de interferon ve interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeyleri de analiz edilmiştir.

İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi heterotrimerik yapıda bir enzimdir. PB2, PB1 ve PA proteinlerinin bir araya gelmesi ile oluşan bu enzim hem viral RNA'ların replikasyonunu hem de viral genlerin transkripsiyonunu kataliz eder. Bu çalışmada enzdonükleaz aktivitesi nedeniyle viral RNA polimeraz enzimi PA alt biriminin HEK293 hücrelerinde tek başına sentez edilmesinin interferon yolakları ile ilişkili genlerin transkript düzeylerinin nasıl etkileyeceği sorusuna öncelik verilmekle birlikte, diğer alt üniteler ile kompleks halinde bulunduğunda nasıl bir gen ekspresyon profilinin ortaya çıkacağı da araştırılmıştır. Viral RNA polimeraz enzim kompleksini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HEK293 hücrelerinde ele alınan genlerin transkripsiyonu ile ilgili veriler bar grafiği olarak ve Venn diyagramları şeklinde **Şekil 6-7 ve 6-8**'de verilmiştir. **Şekil 6-8**'de verilen Venn diyagramına bakıldığında genel olarak, enfekte HEK293 hücrelerinde olduğu gibi bu deneyde de DkPen tipi influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi sentezinin WSN tipi virüs enzimine göre daha fazla sayıda genin transkript düzeyinde bir azalma saptanmıştır. Buna karşın viral RNA polimeraz enziminin üç alt birimini (3P) aynı anda eksprese eden HEK293 hücrelerindeki genlerin ekspresyon profillerinin virüsler ile enfekte hücrelerdeki genlerin ekspresyon profillerine göre bazı farklılıklar gözlendi. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde WSN tipi virüs ile enfekte hücrelerde, enfekte olmamış hücrelere kıyasla 32 genin; WSN tipi viral RNA polimeraz enzimi (3P) sentez edilen hücrelerde 26 genin up-regüle olduğu saptandı. Bu genlerden 12 genin (*CXCL10, IFIT1, IFNA1, IFNA4, IFNB1, IL6, IRF5, MNDA, MX1, MX2, MYD88, TLR9*) her iki grupta da up-regüle olduğu görüldü. Diğer taraftan her iki deney grubunda da 11 genin (*ADAR, CAV1, CCL2, CD80, IFI16, ISG15, JAK1, JAK2, SOCS1, TICAM1, TYK2*) down-regüle olduğu belirlendi. DkPen tipi virüs ile enfekte olmuş hücrelerde, enfekte olmamış hücrelere kıyasla 18 gen up-regüle olurken, bu virüse ait RNA polimeraz enzimi (3P) sentez edilen transfekte hücrelerde 21 genin up-regüle olduğu saptandı. Bunlardan 8 genin (*IFIT1, IFNA1, IFNB1, IL10, IL15, MX1, MX2, MYD88*) her iki grup için ortak genler olduğu belirlendi. DkPen tipi RNA polimeraz enzimi kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde aynı virüs ile enfekte olan hücreler göre çok daha fazla sayıda genin down-regüle olduğu belirlendi.

Enfekte hücrelerde down-regüle olan gen sayısı 32 iken, transfekte hücrelerde 44 genin down-regüle olmuştur. Bu genlerden 18 genin (*ADAR, BAG3, CCL2, CD80, CD86, CDKN1B, IRF9, ISG15, JAK1, JAK2, PML, SOCS1, STAT2, TAP1, TICAM1,TLR3, TLR7, TYK2*) her iki grupta da ortak olduğu saptandı. Bu veriler gerek WSN tipi gerekse DkPen tipi virüsler ile enfekte olan hücrelerde viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinin konak hücre genlerinin ekspresyon profillerinin değişmesinde önemli bir ağırlığa sahip olduğunu ortaya koymuştur.

İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enziminin üçüncü alt birimi olan PA proteinin işlevinin ne olduğu sorusu uzun süre belirsizliğini korudu. Son yıllarda, artan veriler, bu proteinin influenza A virüslerinin yaşam döngüsünde ve konak organizmaya adaptasyonlarında büyük önem taşıdığını ortaya koydu (Shinya ve ark., 2007). Protein ekspresyonu metotlarındaki gelişmeler ve kristalografi teknolojileri, PA proteininin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu yapısının belirlenmesine olanak tanıdı (He ve ark., 2008b; Dias ve ark., 2009; Yuan ve ark., 2009a). Bu çalışmalar sonucunda PA alt biriminin endonükleaz aktivitesine sahip olduğu ve karboksi-terminal bölgesi ile PB1 alt biriminin amino-terminal bölgesine bağlandığı belirlendi (He ve ark., 2008a; Yuan ve ark., 2009b). Diğer taraftan PA proteininin, birçok konak proteini ile de etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir. MCM (Kawaguchi ve Nagata, 2007), HAX1 (Hsu ve ark., 2013; Uğurlu, 2016), hCLE (Huarte ve ark., 2001; Rodriguez ve ark., 2011) ve RanBP5 (Deng ve ark., 2006) İnfluenza A virüsü PA proteini ile ilişkisi saptanan proteinler arasında yer almaktadır. Dolayısıyla İnfluenza A virüsü ile enfekte hücrelerde viral PA proteinin konak gen ekspresyonu regülasyonunda önemli bir etkiye sahip olacağı tahmin edilebilir bir durumdur. Bu tez çalışması kapsamında da diğer viral bileşenlerden bağımsız olarak sadece PA proteininin sentez edildiği konak hücrelerde interferonlar ile ilişkili genlerin transkript düzeylerinin nasıl etkileneceği araştırıldı. Sadece PA proteinin kodlayan pCAGGS-PA plazmiti ile transfekte edilen HEK293 hücrelerde transfekte olmamış hücrelerine göre interferonlar ile ilişkili gen transkript düzeylerinde enfekte olan hücrelere göre daha agresif farklılaşmalar saptandı. Özellikle kuş tipi influenza A/DkPen virüsü PA proteininin bazı genlerin transkripsyon düzeyini ileri düzeyde down-regüle ederken bazılarında da dikkat çekici düzeyde artışına neden oldu (**Şekil 6-9 ve 6-10**). İnsan tipi influenza A virüsü (WSN) PA proteini sentez edilen hücrelerde kontrol hücrelere göre 16 genin up-regüle

oldurduğu, 28 genin ise down-regüle olduğu saptandı. Buna karşın kuş tipi influenza A (DkPen) virüsü PA proteini sentez edilen hücrelerde 42 genin up-regüle olduğu, 11 genin ise down-regüle olduğu bulundu.

Elimizde yeterli veri bulunmamakla birlikte PA proteinlerinin tercihen yeni sentez edilmekte olan konak hücre transkriptlerinin desitabilizayonunda önemli rolü olabileceği düşünülmektedir. Viral RNA polimeraz enzimi PA alt biriminin endonükleaz aktivitesine sahip olması, bu düşünce için temel oluşturmaktadır. PA proteininin endonükleaz aktivitesi ile konak mRNA'larının CAP yapılarının kesilmesi doğal olarak mRNA'ların stabilitesini önemli ölçüde azalatacaktır. Bu düşünceyi desteklemek amacıyla, doğal, kimerik ya da delesyonlu PA proteinlerinin RNA Pol-II transkript düzeylerine etkileri, belirteç SEAP aktivitesi (**Şekil 6-19, 6-21 ve 6-22**) ve plazmit vektör üzerinden kodlanan aktin beta protein düzeyi (**Şekil 6-23**) üzerinden indirekt olarak belirlenmiştir. Belirli miktarda pSEAP plazmit DNA'sı ile artan miktarlarda PA proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HEK293 hücrelerinde belirteç SEAP enzimi sentezinin PA dozu artışına paralel olarak artan düzeylerde inhibe olduğu saptandı (**Şekil 6-19**). Kuş tipi influenza A/DkPen virüsü PA proteinin influenza A/WSN PA proteinine göre çok daha yüksek düzeylerde SEAP ekspresyonunu inhibe ettiği, bu inhibisyonun enzimin diğer alt birimlerinden bağımsız olduğu ortaya kondu (**Şekil 6-19 ve 6-22**). İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin hangi bölgesinin belirteç SEAP gen ekspresyonunda etkili olduğunu saptamak için oluşturulan kimerik PA genleri ile yapılan testlerde ise amino-terminal yarımı DkPen PA'dan oluşan kimerik PA(D-W) proteininin transkripsiyon üzerinde yüksek düzeyde inhibisyon etkisine sahip olduğu ortaya kondu (**Şekil 6-21**). Amino-terminal yarımı WSN tipi virüs PA proteinine ait olan kimerik PA(W-D) proteininin etkisi ise PA(D-W) proteinine göre çok düşük düzeylerde kaldı. Bu sonuçlar, konak hücre genlerinin transkript düzeylerinin azalmasında influenza A virüsü PA proteininin önemli bir role sahip olduğunu, bu etkide proteinin amino-terminal yarımın büyük önem taşıdığını ve kuş tipi influenza A/DkPen PA proteininin insan tipi WSN virüsü PA proteinine göre çok daha etkili olduğunu ortaya koydu. Daha önce yapılan çalışmalar influenza PA proteininin amino-terminal bölgesinin endonükleaz aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir (Dias ve ark., 2009). Dolayısıyla literatür verileri elde edilen bu sonuçları destekler niteliktedir.

İnfluenza A virüsü PA proteinlerinin HEK293 hücrelerinde belirteç SEAP geni ekspresyonuna etkilerine paralel sonuçlar, transfekte hücrelerde PZR dizin analizi tekniği ile incelenen housekeeping genlerde de gözlenmiştir. Gerek sadece PA proteini gerekse viral RNA polimeraz enziminin her üç alt ünitesinin birlikte sentez edildiği HEK293 hücrelerinde aktin beta transkript düzeyinin ileri düzeyde down-regüle olduğu saptanmıştır (**Şekil 6-8 ve 6-10**). Bu deneylerde de DkPen tipi virüs proteinlerinin etkileri WSN tipi virüs proteinlerine göre çok daha yüksek olmuştur. PZR dizin analizi ile elde edilen bu sonuçlar; PA proteinleri ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde, endojen aktin beta ve plazmit DNA'sı üzerinden kodlanan HA uzantılı aktin beta protein miktarlarının Western melezleme tekniği ile belirlenmesi ile de desteklendi. Bu deneylerde delesyonlu PA proteini kodlayan plazmitler kullanıldı. DkPen tipi PA proteininin amino-terminal yarımının sentez edildiği HEK293 hücrelerinde plazmit vektör üzerinden kodlanan HA uzantılı aktin beta proteini sentezinin nerdeyse tamamen inhibe olduğu saptandı (**Şekil 6-23**). Buna karşın endojen aktin beta protein miktarında önemli bir değişiklik görülmedi. Karboksi-terminal yarımdan oluşan delesyonlu PA proteinlerinin aktin beta proteinin sentezi üzerinde önemli bir etkisi görülmedi.

PA proteinlerinin belirteç SEAP geni ve aktin beta geni ekspresyonuna etkilerini saptamaya yönelik yapılan deneylerin sonuçları, DkPen PA proteinin WSN PA proteinine göre daha yüksek endonükleaz aktivitesine sahip olduğunu düşündürdü. In vitro koşullarda yapılan, CAP-snatching aktivite testleri WSN virüsü PA proteinin daha yüksek aktiviteye sahip olduğunu gösterse de (Pham ve ark., 2018), hücre içerisinde doğal ortamda bu durumun farklılık gösterebileceği düşünülmektedir.

İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen ya da viral proteinleri kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde, interferonlar savunma mekanizması ile ilişkili genlerin transkript düzeyi göz önünde bulundurularak seçilen bir kısım genler, bu genlerin viral replikasyon üzerindeki rolüne ışık tutacak veriler elde etmek amacıyla pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlandı. PZR dizin analizlerinde farklı gruplardan elde edilen sonuçlar ve mevcut literatür bilgilerinden yola çıkarak önemli olabileceği düşünülen *CCL5, CDKN1B, HLA-B, IFNA5, IFI27, IFIT1, IFIT3, IFITM3, IFNE ve OAS1* genleri, HEK293 hücrelerinde hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltıldı ve

pCHA plazmitinde EcoRV kesim noktasına klonlanarak **Şekil 6-12**'de haritaları verilen bir dizi ekspresyon vektörü elde edildi. Oluşturulan plazmit vektörlerin ön kontrolleri, uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek yapıldı (**Şekil 6-13**). cDNA'ların PZR ile çoğaltılmasında kullanılan oligonukleotid primerlerde bulunabilecek olası nükleotid dizi hataları ya da ligasyon ve enzimatik kesim işlemler sırasında ortaya çıkabilecek hatalar DNA dizi analizleri ile incelendi ve tüm plazmitlerin tasarlanan şekliyle doğru cDNA'lar taşıdıkları ortaya kondu (**Şekil 6-14**). Bu plazmitler HEK293 ve HeLa hücrelerinde ilgili genler tarafından kodlanan proteinlerin geçici olarak sentez edilmesinde kullanıldı. Hücrelerde, dışarıdan verilen plazmit vektörler üzerinden proteinlerin etkin bir şekilde sentez edilmesinde genlerin kontrolünü sağlayan cis-etkili elemanlar (promotör, arttırıcı Kozak dizisi ve polyA sinyali gibi) kadar, gen transkriptinin yarılanma ömrü ve kodlanan proteinin özellikleri ve diğer konak hücre proteinleri ile ilişkisi belirleyici faktörlerdir (Juven-Gershon ve Kadonaga, 2010; Khan, 2013). Bu bakımdan plazmit vektörlere klonlanan genlerin ekspresyon düzeylerinin saptanması kadar, genler üzerinde kodlanan proteinlerin hücre içerisindeki lokalizasyonlarının saptanması büyük önem taşımaktadır. Dolaysıyla pCHA plazmit vektörlerine klonlanan genlerin HEK293 hücrelerinde ekspresyon düzeyleri Western melezleme tekniği ile analiz edildi (**Şekil 6-15**).

Ele alınan genlerden *IFNA5, IFIT1, IFIT3, CDKN1B, IFNE ve IFITM3* genlerinin transfekte hücrelerde daha etkin düzeyde ekspresyon yaptığı saptandı. *IFI27* ve *OAS1* genleri ise çok düşük düzeyde ekspresyon gösterdi. Buna karşın, plazmit vektörüne klonlanan genlerden, *CCL5* geninin ekspresyonu Western melezle tekniği ile belirlenemedi. Bunun nedeni CCL5 proteinin çok düşük düzeylerde sentez edilmesi ya da küçük molekül ağırlıklı protein olması sebebiyle Western melezleme tekniğinde membrana tutunamama durumundan kaynaklanabilir. pCHA plazmitine klonlanan genler tarafından kodlanan proteinlerin HeLa hücrelerinde hücre içi lokalizasyonları immunofloresans testler ile saptandı. Western melezleme çalışmalarının aksine immunofloresans testler ele alınan 10 genin tümünün HeLa hücrelerinde ekspresyon yaptığını ortaya koydu (**Şekil 6-16**). Plazmitler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde geçici olarak sentez edilen tüm hücre içi lokalizasyon biçimleri bakımından bazı farklılıklar gösterse de sitoplazma ya da sitoplazmik organellerde lokalize oldukları belirlendi.

Western melezleme ve/veya immunofloresans teknikleri ile pCHA plazmit vektörüne klonlanan genlerin memeli hücrelerinde ekspresyon yaptıkları belirlendikten sonra, bu genler tarafından kodlanan proteinlerin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi aktivitesini nasıl etkiledikleri bu virüsler için geliştirilen minireplikon modelleri (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018) ile araştırıldı.

Turan ve ark.'nın (Turan ve ark., 2004; Pham ve ark., 2018) geliştirdiği influenza A virüsü minireplikon modeli, dört farklı viral proteini (PB2, PB1, PA ve NP) kodlayan plazmit vektörü ve İnfluenza A virüsünün 8. segmentine ait regülasyon bölgeleri arasına ters oryantasyonda lusiferaz geni kodlayan bir belirteç (reporter) vektörden oluşmaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilerden de anlaşıldığı gibi memeli hücrelerinde viral proteinlerin sentez edilmesi konak hücre transkripsiyon/translasyon sistemini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu durum minireplikon sistemleri için de önemli dezavantaj oluşturmaktadır. Bu nedenle minireplikon ve benzeri yapay model sistemlerde kontrol (normalizasyon) amaçlı belirteç gen (Renilla lüsüferaz ve SEAP gb.) taşıyan plazmit vektörler de sisteme dahil edilmektedir. Dolayısıyla İnfluenza A virüsü minireplikon sistemi hücre içi ya da hücre dışı ortamda meydana gelen değişmelerin virüs RNA polimeraz enzimine etkilerini saptamak için kullanışlı bir araçtır. Bu çalışmada HEK293 hücreleri; belirlenen sabit miktarlarda minireplikon plazmitleri, artan miktarlarda interferon ya da interferonlar ile ilişkili genleri taşıyan plazmit vektörler birlikte transfekte edildi ve hücrelerde viral RNA polimeraz enzimi aktivitesinin belirteci olan lusiferaz enzimi aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, ele alınan *IFIT1, IFIT3, CDKN1B, IFNE, IFITM3 IFNA5, CCL5, HLA-B, IFI27* ve *OAS1* genleri tarafından kodlanan proteinlerin çoğunun hem WSN hem de DkPen tipi viral RNA polimeraz aktivitesini negatif yönde etkilediği saptandı (**Şekil 6-17 ve 6-18**). Buna karşın hücrelerde HLA-B ve OAS1 minireplikon plazmitleri üzerinden kodlanan WSN ve DkPen tipi virüslere ait RNA polimeraz enzimleri üzerinde farklı etki gösterdi. HLA-B proteini WSN tipi virüs polimerazını negatif yönde etkilerken, DkPen tipi polimeraz enzim aktivitesini arttırıcı yönde etkiledi. HLA antijenlerinin İnfluenza A virüslerinin patogenezi ve yayılması açısından önemli olduğu düşünülmektedir (Dutta ve ark., 2018). Buna karşın, bu antijenler arasında yer alan HLA-B'nin İnfluenza A virüsü replikasyonu açısından önemi bilinmemektedir. HLA-B proteinin farklı tipte viral polimeraz enzimleri üzerinde farklı etki göstermesi,

DkPen tipi virüslerin memeli hücrelerine zor adapte olmalarınının nedenlerinden biri olabilir. *OAS1* geni tarafından kodlanan 2'-5'-oligoadenilat sentaz 1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase) proteinin denenen konsantrasyonlara WSN tipi virüs RNA polimeraz enzimi üzerinde anlamlı bir ekti yapmadığı, buna karşın DkPen tipi virüs RNA polimeraz enziminin ortalama %55-60 oranında inhibe olduğu gözlenmiştir. Yukarıda da değinildiği gibi interferon savunma mekanizmasının önemli bileşeni olan 2'-5' oligoadenilat sentaz molekülleri hücrelerde inaktif halde bulunan RNaz L enzimlerine aktive ederek viral replikasyon üzerinde negatif yönde baskı oluşmasını sağlarlar (Kodym ve ark., 2009). Doğal enfeksiyon koşullarının gerçekleşmediği minireplikon sistemlerinde 2'-5' oligoadenilat sentaz enziminin WSN ve DkPen tipi virüs RNA polimeraz enzimleri üzerinde farklı etki göstermesinin nedeni yanıt bekleyen bir soru olarak karşımıza çıkmaktadır. DkPen tip virüs RNA polimeraz enziminin 2'-5' oligoadenilat sentaz enziminden negatif yönde etkilenmesi, bu virüs tipinin memeli hücrelerinde yavaş replike olmasının nedenlerinden biri olabilir. Sadece *OAS1* geni tarafından kodlanan protein değil, viral RNA polimeraz enzimi üzerinde negatif etkileri saptanan diğer proteinlerin her birinin moleküler düzeyde etki mekanizmalarını ortaya konması, farklı tipte influenza A virüslerinin patogenezi açısında bu proteinlerinin öneminin belirlenmesi ileriye dönük yapılacak çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında farklı tipte İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen, ya da influenza virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen insan orijinli HEK293 hücrelerinde interferonlar ve interferon yolakları ile ilişkili genlerin ekpresyonlarının nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Ele alınan genlerin ekspresyonları arasındaki farklılıkların viral patogenez açısından önemli olup olmadıkları irdelenmiştir. Çalışmada insan ve kuş tipi İnfluenza A virüslerinin insan hücrelerinde farklı düzeylerde replikasyon yapmalarında, virüslerin kendilerinden kaynaklanan faktörlerin ve konak hücre kaynaklı interferon yolakları ile ilgili protein faktörlerin önemi tartışılmıştır. Elde edilen veriler viral enfeksiyonun ya da diğer viral bileşenlerden bağımsız sentez edilen viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinin HEK293 hücrelerinde çok sayıda genin transkript düzeyini etkilediğini, bu etkinin virüs tipine göre değişebilidğini ortaya koymuştur. Viral patogenezi etkileyen faktörler arasında RNA polimeraz enzimi alt

ünitelerinden PA proteinin önemli olduğu saptanmışır. Enfeksiyonda kullanıan virüs tipine göre ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılıklar gösteren genler üzerinden kodlanan proteinlerin moleküler düzeyde İnfluenza A virüsü replikasyonuna etki mekanizmalarının aydınlatılması daha ayrıntılı ve kapsamlı bir araştırma gerektirmektedir. Dolayısıyla bu çalışma sonucunda virüs tipine göre ekspresyon düzeyinde farklılık saptanan genler tarafından kodlanan proteinler yeni araştırma projelerine ve lisansüstü tez çalışmalarına temel oluşturacaktır.

8. KAYNAKLAR

Aaronson DS, Horvath CM. A road map for those who don't know JAK-STAT. Science. 2002; 296: 1653-5.

Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. Science. 2002; 296: 1270-3.

Ahmed CM, Dabelic R, Bedoya SK, Larkin J, 3rd, Johnson HM. A SOCS1/3 Antagonist Peptide Protects Mice Against Lethal Infection with Influenza A Virus. Front Immunol. 2015; 6: 574.

Alcami A, Symons JA, Smith GL. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. J Virol. 2000; 74: 11230-9.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature. 2001; 413: 732-8.

Amiot L, Vu N, Samson M. Immunomodulatory properties of HLA-G in infectious diseases. J Immunol Res. 2014; 2014: 298569.

Amorim MJ, Bruce EA, Read EK, Foeglein A, Mahen R, Stuart AD, Digard P. A Rab11- and microtubule-dependent mechanism for cytoplasmic transport of influenza A virus viral RNA. J Virol. 2011; 85: 4143-56.

Antonelli G, Simeoni E, Turriziani O, Tesoro R, Redaelli A, Roffi L, Antonelli L, Pistello M, Dianzani F. Correlation of interferon-induced expression of MxA mRNA in peripheral blood mononuclear cells with the response of patients with chronic active hepatitis C to IFN-alpha therapy. J Interferon Cytokine Res. 1999; 19: 243-51.

Apostolov K, Flewett TH. Further observations on the structure of influenza viruses A and C. J Gen Virol. 1969; 4: 365-70.

Aranda PS, Lajoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis. 2012; 33: 366-9.

Arnheiter H, Frese M, Kambadur R, Meier E, Haller O. Mx transgenic mice--animal models of health. Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 206: 119-47.

Arranz R, Coloma R, Chichon FJ, Conesa JJ, Carrascosa JL, Valpuesta JM, Ortin J, Martin-Benito J. The structure of native influenza virion ribonucleoproteins. Science. 2012; 338: 1634-7.

Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. J Exp Med. 2005; 202: 461-5.

Bailey CC, Zhong G, Huang IC, Farzan M. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. Annu Rev Virol. 2014; 1: 261-83.

Bancroft CT, Parslow TG. Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza a virus genome. J Virol. 2002; 76: 7133-9.

Barman S, Ali A, Hui EK, Adhikary L, Nayak DP. Transport of viral proteins to the apical membranes and interaction of matrix protein with glycoproteins in the assembly of influenza viruses. Virus Res. 2001; 77: 61-9.

Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, Desalle R, Racaniello VR, Fisher PB. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. Pharmacol Ther. 2009; 124: 219-34.

Basler CF, Garcia-Sastre A. Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. Int Rev Immunol. 2002; 21: 305-37.

Basu D, Walkiewicz MP, Frieman M, Baric RS, Auble DT, Engel DA. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. Journal of virology. 2009; 83: 1881-91.

Baum A, Garcia-Sastre A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. Amino Acids. 2010; 38: 1283-99.

Baxter R, Patriarca PA, Ensor K, Izikson R, Goldenthal KL, Cox MM. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok(R) trivalent recombinant baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy adults 50-64 years of age. Vaccine. 2011; 29: 2272-8.

Bazzigher L, Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Mx genes show weaker primary response to virus than other interferon-regulated genes. Virology. 1992; 186: 154-60.

Beare AS, Webster RG. Replication of avian influenza viruses in humans. Arch Virol. 1991; 119: 37-42.

Belshe RB. The origins of pandemic influenza--lessons from the 1918 virus. N Engl J Med. 2005; 353: 2209-11.

Bergmann M, Garcia-Sastre A, Carnero E, Pehamberger H, Wolff K, Palese P, Muster T. Influenza virus NS1 protein counteracts PKR-mediated inhibition of replication. J Virol. 2000; 74: 6203-6.

Berton MT, Naeve CW, Webster RG. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies. Journal of virology. 1984; 52: 919-27.

Biondo C, Lentini G, Beninati C, Teti G. The dual role of innate immunity during influenza. Biomed J. 2019; 42: 8-18.

Bloom JD, Gong LI, Baltimore D. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. Science. 2010; 328: 1272-5.

Boivin S, Cusack S, Ruigrok RW, Hart DJ. Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms. J Biol Chem. 2010; 285: 28411-7.

Bouloy M, Morgan MA, Shatkin AJ, Krug RM. Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. J Virol. 1979; 32: 895-904.

Bouloy M, Plotch SJ, Krug RM. Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980; 77: 3952-6.

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

Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, Van Der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. Cell. 2009; 139: 1243-54.

Canaday DH, Amponsah NA, Jones L, Tisch DJ, Hornick TR, Ramachandra L. Influenza-induced production of interferon-alpha is defective in geriatric individuals. J Clin Immunol. 2010; 30: 373-83.

Castelli JC, Hassel BA, Wood KA, Li XL, Amemiya K, Dalakas MC, Torrence PF, Youle RJ. A study of the interferon antiviral mechanism: apoptosis activation by the 2-5A system. J Exp Med. 1997; 186: 967-72.

Cauldwell AV, Long JS, Moncorge O, Barclay WS. Viral determinants of influenza A virus host range. J Gen Virol. 2014; 95: 1193-210.

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. Nat Immunol. 2000; 1: 305-10.

Centers for Disease C, Prevention. Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2009; 58: 826-9.

Chakrabarti A, Ghosh PK, Banerjee S, Gaughan C, Silverman RH. RNase L triggers autophagy in response to viral infections. J Virol. 2012; 86: 11311-21.

Chakrabarti AK, Vipat VC, Mukherjee S, Singh R, Pawar SD, Mishra AC. Host gene expression profiling in influenza A virus-infected lung epithelial (A549) cells: a comparative analysis between highly pathogenic and modified H5N1 viruses. Virol J. 2010; 7: 219.

Chang HW, Watson JC, Jacobs BL. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89: 4825-9.

Chang RY, Hsu TW, Chen YL, Liu SF, Tsai YJ, Lin YT, Chen YS, Fan YH. Japanese encephalitis virus non-coding RNA inhibits activation of interferon by blocking nuclear translocation of interferon regulatory factor 3. Vet Microbiol. 2013; 166: 11-21.

Chao DL, Bloom JD, Kochin BF, Antia R, Longini IM, Jr. The global spread of drug-resistant influenza. J R Soc Interface. 2012; 9: 648-56.

Chen HX, Chen BG, Shi WW, Zhen R, Xu DP, Lin A, Yan WH. Induction of cell surface human leukocyte antigen-G expression in pandemic H1N1 2009 and seasonal H1N1 influenza virus-infected patients. Hum Immunol. 2011; 72: 159-65.

Chen N, Xia P, Li S, Zhang T, Wang TT, Zhu J. RNA sensors of the innate immune system and their detection of pathogens. IUBMB Life. 2017; 69: 297-304.

Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. EMBO J. 1999; 18: 2273-83.

Chou YY, Heaton NS, Gao Q, Palese P, Singer RH, Lionnet T. Colocalization of different influenza viral RNA segments in the cytoplasm before viral budding as shown by single-molecule sensitivity FISH analysis. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003358.

Colonna M, Krug A, Cella M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. Curr Opin Immunol. 2002; 14: 373-9.

Couceiro JN, Paulson JC, Baum LG. Influenza virus strains selectively recognize sialyloligosaccharides on human respiratory epithelium; the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. Virus Res. 1993; 29: 155-65.

Couch RB. Orthomyxoviruses. In: S. Baron, editor. 4th ed, Medical Microbiology. Galveston (TX); 1996.

Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. Annual review of medicine. 2000; 51: 407-21.

Crescenzo-Chaigne B, Barbezange C, Van Der Werf S. Non coding extremities of the seven influenza virus type C vRNA segments: effect on transcription and replication by the type C and type A polymerase complexes. Virol J. 2008; 5: 132.

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

Crotty S, Cameron CE, Andino R. RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 6895-900.

Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. Mol Cell. 2008; 29: 169-79.

Cummings MJ, Bakamutumaho B, Yang W, Wamala JF, Kayiwa J, Owor N, Namagambo B, Byaruhanga T, Wolf A, Lutwama JJ, Shaman J, O'donnell MR. Emergence, Epidemiology, and Transmission Dynamics of 2009 Pandemic A/H1N1 Influenza in Kampala, Uganda, 2009-2015. Am J Trop Med Hyg. 2018; 98: 203-6.

David M. Signal transduction by type I interferons. Biotechniques. 2002; Suppl: 58-65.

Davidson S, Maini MK, Wack A. Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections. J Interferon Cytokine Res. 2015; 35: 252-64.

Davies WL, Grunert RR, Haff RF, Mcgahen JW, Neumayer EM, Paulshock M, Watts JC, Wood TR, Hermann EC, Hoffmann CE. Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). Science. 1964; 144: 862-3.

De Veer MJ, Holko M, Frevel M, Walker E, Der S, Paranjape JM, Silverman RH, Williams BR. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J Leukoc Biol. 2001; 69: 912-20.

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

Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. J Neurol. 2004; 251 Suppl 2: II31-9.

Deng T, Engelhardt OG, Thomas B, Akoulitchev AV, Brownlee GG, Fodor E. Role of ran binding protein 5 in nuclear import and assembly of the influenza virus RNA polymerase complex. J Virol. 2006; 80: 11911-9.

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 15623-8.

Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. IFITM3 restricts influenza A virus entry by blocking the formation of fusion pores following virus-endosome hemifusion. PLoS Pathog. 2014; 10: e1004048.

Dias A, Bouvier D, Crepin T, Mccarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. Nature. 2009; 458: 914-8.

Dietrich N, Lienenklaus S, Weiss S, Gekara NO. Murine toll-like receptor 2 activation induces type I interferon responses from endolysosomal compartments. PLoS One. 2010; 5: e10250.

Dimitriou ID, Clemenza L, Scotter AJ, Chen G, Guerra FM, Rottapel R. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. Immunol Rev. 2008; 224: 265-83.

Domanski P, Fish E, Nadeau OW, Witte M, Platanias LC, Yan H, Krolewski J, Pitha P, Colamonici OR. A region of the beta subunit of the interferon alpha receptor different from box 1 interacts with Jak1 and is sufficient to activate the Jak-Stat pathway and induce an antiviral state. J Biol Chem. 1997; 272: 26388-93.

Dong B, Silverman RH. 2-5A-dependent RNase molecules dimerize during activation by 2-5A. J Biol Chem. 1995; 270: 4133-7.

Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. Emerg Infect Dis. 2015; 21: 368-71.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. Nat Genet. 2003; 33: 388-91.

Dutta M, Dutta P, Medhi S, Borkakoty B, Biswas D. Polymorphism of HLA class I and class II alleles in influenza A(H1N1)pdm09 virus infected population of Assam, Northeast India. J Med Virol. 2018; 90: 854-60.

Ehrhardt C, Ludwig S. A new player in a deadly game: influenza viruses and the PI3K/Akt signalling pathway. Cell Microbiol. 2009; 11: 863-71.

Elena SF, Sanjuan R. Adaptive value of high mutation rates of RNA viruses: separating causes from consequences. J Virol. 2005; 79: 11555-8.

Enami M, Sharma G, Benham C, Palese P. An influenza virus containing nine different RNA segments. Virology. 1991; 185: 291-8.

Engelhardt OG, Smith M, Fodor E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. J Virol. 2005; 79: 5812-8.

Everitt AR, Clare S, Pertel T, John SP, Wash RS, Smith SE, Chin CR, Feeley EM, Sims JS, Adams DJ, Wise HM, Kane L, Goulding D, Digard P, Anttila V, Baillie JK,

Walsh TS, Hume DA, Palotie A, Xue Y, Colonna V, Tyler-Smith C, Dunning J, Gordon SB, Gen II, Investigators M, Smyth RL, Openshaw PJ, Dougan G, Brass AL, Kellam P. IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza. Nature. 2012; 484: 519-23.

Ezelle HJ, Malathi K, Hassel BA. The Roles of RNase-L in Antimicrobial Immunity and the Cytoskeleton-Associated Innate Response. Int J Mol Sci. 2016; 17.

Fainardi E, Castellazzi M, Stignani M, Morandi F, Sana G, Gonzalez R, Pistoia V, Baricordi OR, Sokal E, Pena J. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. Cell Mol Life Sci. 2011; 68: 433-51.

Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. Biofactors. 2009; 35: 14-20.

Ferguson L, Eckard L, Epperson WB, Long LP, Smith D, Huston C, Genova S, Webby R, Wan XF. Influenza D virus infection in Mississippi beef cattle. Virology. 2015; 486: 28-34.

Fiore A.E. Fa SD, Gubareva L., Bresee J.S., Uyeki T.M. Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports/Centers for Disease Control; in: MMWR Recommendations and reports. Antiviral Agents For The Treatment and Chemoprophylaxis Of İnfluenza- Recommendations Of The Advisory Committee On Immunization Practices (ACIP),. 2011; 60: 1-24.

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; 24: 389-91.

Fodor E, Seong BL, Brownlee GG. Photochemical cross-linking of influenza A polymerase to its virion RNA promoter defines a polymerase binding site at residues 9 to 12 of the promoter. J Gen Virol. 1993; 74 (Pt 7): 1327-33.

Forbes RL, Wark PA, Murphy VE, Gibson PG. Pregnant women have attenuated innate interferon responses to 2009 pandemic influenza A virus subtype H1N1. J Infect Dis. 2012; 206: 646-53.

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. Nat Immunol. 2006; 7: 1250-7.

Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 2002-7.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature. 2007; 446: 916-20.

Gambotto A, Barratt-Boyes SM, De Jong MD, Neumann G, Kawaoka Y. Human infection with highly pathogenic H5N1 influenza virus. Lancet. 2008; 371: 1464-75.

Garcia-Sastre A. Inhibition of interferon-mediated antiviral responses by influenza A viruses and other negative-strand RNA viruses. Virology. 2001; 279: 375-84.

Gelmez N. İnsan Beta Aktin Proteini İle İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2019, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. K Turan).

Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84: 9145-9.

Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, Distefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive Shigella flexneri. EMBO Rep. 2001; 2: 736-42.

Gonzalez S, Ortin J. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. EMBO J. 1999; 18: 3767-75.

Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. J Gen Virol. 2000; 81: 2341-64.

Graef KM, Vreede FT, Lau YF, Mccall AW, Carr SM, 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. J Virol. 2010; 84: 8433-45.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. 1977; 36: 59-74.

Graham FL, Van Der Eb AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology. 1973; 52: 456-67.

Green N, Alexander H, Olson A, Alexander S, Shinnick TM, Sutcliffe JG, Lerner RA. Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. Cell. 1982; 28: 477-87.

Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. J Cell Biol. 2011; 195: 1071-82.

Gusho E, Baskar D, Banerjee S. New advances in our understanding of the "unique" RNase L in host pathogen interaction and immune signaling. Cytokine. 2020; 133: 153847.

Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. J Gen Virol. 2008; 89: 2359-76.

Hale BG, Steel J, Medina RA, Manicassamy B, Ye J, Hickman D, Hai R, Schmolke M, Lowen AC, Perez DR, Garcia-Sastre A. Inefficient control of host gene expression by the 2009 pandemic H1N1 influenza A virus NS1 protein. J Virol. 2010; 84: 6909-22.

Hall CB, Douglas RG, Jr., Simons RL, Geiman JM. Interferon production in children with respiratory syncytial, influenza, and parainfluenza virus infections. J Pediatr. 1978; 93: 28-32.

Haller O, Arnheiter H, Lindenmann J, Gresser I. Host gene influences sensitivity to interferon action selectively for influenza virus. Nature. 1980; 283: 660-2.

Haller O, Frese M, Kochs G. Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses. Rev Sci Tech. 1998; 17: 220-30.

Haller O, Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. Traffic. 2002; 3: 710-7.

Haller O, Kochs G. Human MxA protein: an interferon-induced dynamin-like GTPase with broad antiviral activity. J Interferon Cytokine Res. 2011; 31: 79-87.

Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. Virology. 2006; 344: 119-30.

Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, Wang D, Nelson EA, Li F. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. mBio. 2014; 5: e00031-14.

Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hoppe AD, Webby RJ, Simonson RR, Li F. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003176.

Havell EA, Berman B, Ogburn CA, Berg K, Paucker K, Vilcek J. Two antigenically distinct species of human interferon. Proc Natl Acad Sci U S A. 1975; 72: 2185-7.

He W, Zhao Y, Zhang C, An L, Hu Z, Liu Y, Han L, Bi L, Xie Z, Xue P, Yang F, Hang H. Rad9 plays an important role in DNA mismatch repair through physical interaction with MLH1. Nucleic Acids Res. 2008a; 36: 6406-17.

He X, Zhou J, Bartlam M, Zhang R, Ma J, Lou Z, Li X, Li J, Joachimiak A, Zeng Z, Ge R, Rao Z, Liu Y. Crystal structure of the polymerase PA(C)-PB1(N) complex from an avian influenza H5N1 virus. Nature. 2008b; 454: 1123-6.

Hefti HP, Frese M, Landis H, Di Paolo C, Aguzzi A, Haller O, Pavlovic J. Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. J Virol. 1999; 73: 6984-91.

Hermans D, Webby RJ, Wong SS. Atypical antibody responses to influenza. J Thorac Dis. 2018; 10: S2238-S47.

Horimoto T, Kawaoka Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 129-49.

Horimoto T, Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nat Rev Microbiol. 2005; 3: 591-600.

Horisberger MA, Staeheli P, Haller O. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983; 80: 1910-4.

Hovanec DL, Air GM. Antigenic structure of the hemagglutinin of influenza virus B/Hong Kong/8/73 as determined from gene sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies. Virology. 1984; 139: 384-92.

Hovanessian AG. On the discovery of interferon-inducible, double-stranded RNA activated enzymes: the 2'-5'oligoadenylate synthetases and the protein kinase PKR. Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18: 351-61.

Hovanessian AG, Brown RE, Kerr IM. Synthesis of low molecular weight inhibitor of protein synthesis with enzyme from interferon-treated cells. Nature. 1977; 268: 537-40.

Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM. Influenza pandemics: past, present and future. Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi. 2006; 105: 1-6.

Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84: 8140-4.

Hsu WB, Shih JL, Shih JR, Du JL, Teng SC, Huang LM, Wang WB. Cellular protein HAX1 interacts with the influenza A virus PA polymerase subunit and impedes its nuclear translocation. J Virol. 2013; 87: 110-23.

Hu J, Liu X. Crucial role of PA in virus life cycle and host adaptation of influenza A virus. Med Microbiol Immunol. 2015; 204: 137-49.

Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, Radoshitzky SR, Becker MM, Chiang JJ, Brass AL, Ahmed AA, Chi X, Dong L, Longobardi LE, Boltz D, Kuhn JH, Elledge SJ, Bavari S, Denison MR, Choe H, Farzan M. Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus. PLoS Pathog. 2011; 7: e1001258.

Huarte M, Sanz-Ezquerro JJ, Roncal F, Ortin J, Nieto A. PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. J Virol. 2001; 75: 8597-604.

Inohara, Chamaillard, Mcdonald C, Nunez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. Annu Rev Biochem. 2005; 74: 355-83.

Inohara N, Ogura Y, Fontalba A, Gutierrez O, Pons F, Crespo J, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Hashimoto M, Foster SJ, Moran AP, Fernandez-Luna JL, Nunez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem. 2003; 278: 5509-12.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene. 1990; 96: 23-8.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957; 147: 258-67.

Isaacs A, Lindenmann J, Valentine RC. Virus interference. II. Some properties of interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957; 147: 268-73.

Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. Nat Rev Immunol. 2014; 14: 36-49.

Jackson C. History lessons: the Asian flu pandemic. Br J Gen Pract. 2009; 59: 622-3.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. Annu Rev Immunol. 2002; 20: 197-216.

Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. J Virol. 2012; 86: 2900-10.

Jeong E, Lee JY. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. Yonsei Med J. 2011; 52: 379-92.

Jia H, Gong P. A Structure-Function Diversity Survey of the RNA-Dependent RNA Polymerases From the Positive-Strand RNA Viruses. Front Microbiol. 2019; 10: 1945.

Jones HW, Jr., Mckusick VA, Harper PS, Wuu KD. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. Obstet Gynecol. 1971; 38: 945-9.

Juven-Gershon T, Kadonaga JT. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. Dev Biol. 2010; 339: 225-9.

Kalie E, Jaitin DA, Podoplelova Y, Piehler J, Schreiber G. The stability of the ternary interferon-receptor complex rather than the affinity to the individual subunits dictates differential biological activities. J Biol Chem. 2008; 283: 32925-36.

Kanneganti TD, Lamkanfi M, Nunez G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. Immunity. 2007; 27: 549-59.

Karaaslan M, Turan K. In Vitro Characterization of Chitosan-Based Particles as Carrier of Influenza Viral Antigens. Eur J Biol. 2018; 77(1): 1-10.

Kash JC, Tumpey TM, Proll SC, Carter V, Perwitasari O, Thomas MJ, Basler CF, Palese P, Taubenberger JK, Garcia-Sastre A, Swayne DE, Katze MG. Genomic analysis of increased host immune and cell death responses induced by 1918 influenza virus. Nature. 2006; 443: 578-81.

Kawaguchi A, Nagata K. De novo replication of the influenza virus RNA genome is regulated by DNA replicative helicase, MCM. EMBO J. 2007; 26: 4566-75.

Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. Int Immunol. 2009; 21: 317-37.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010; 11: 373-84.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. Immunity. 2011; 34: 637-50.

Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. Nat Immunol. 2005; 6: 981-8.

Kawaoka Y, Neumann G. Influenza viruses: an introduction. Methods in molecular biology. 2012; 865: 1-9.

Kerr IM, Brown RE. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978; 75: 256-60.

Khan KH. Gene expression in Mammalian cells and its applications. Adv Pharm Bull. 2013; 3: 257-63.

Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 9-14.

Killip MJ, Fodor E, Randall RE. Influenza virus activation of the interferon system. Virus Res. 2015; 209: 11-22.

King JC, Jr., Cox MM, Reisinger K, Hedrick J, Graham I, Patriarca P. Evaluation of the safety, reactogenicity and immunogenicity of FluBlok trivalent recombinant

baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine administered intramuscularly to healthy children aged 6-59 months. Vaccine. 2009; 27: 6589-94.

Klein MI, Bergel E, Gibbons L, Coviello S, Bauer G, Benitez A, Serra ME, Delgado MF, Melendi GA, Rodriguez S, Kleeberger SR, Polack FP. Differential gender response to respiratory infections and to the protective effect of breast milk in preterm infants. Pediatrics. 2008; 121: e1510-6.

Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. J Virol. 2007; 81: 7011-21.

Kochs G, Haller O. GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). J Biol Chem. 1999; 274: 4370-6.

Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O. Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 3153-8.

Kodym R, Kodym E, Story MD. 2'-5'-Oligoadenylate synthetase is activated by a specific RNA sequence motif. Biochem Biophys Res Commun. 2009; 388: 317-22.

Konig R, Stertz S, Zhou Y, Inoue A, Hoffmann HH, Bhattacharyya S, Alamares JG, Tscherne DM, Ortigoza MB, Liang Y, Gao Q, Andrews SE, Bandyopadhyay S, De Jesus P, Tu BP, Pache L, Shih C, Orth A, Bonamy G, Miraglia L, Ideker T, Garcia-Sastre A, Young JA, Palese P, Shaw ML, Chanda SK. Human host factors required for influenza virus replication. Nature. 2010; 463: 813-7.

Krammer F, Smith GJD, Fouchier RaM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, Garcia-Sastre A. Influenza. Nat Rev Dis Primers. 2018; 4: 3.

Krug RM. Priming of influenza viral RNA transcription by capped heterologous RNAs. Curr Top Microbiol Immunol. 1981; 93: 125-49.

Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. Curr Opin Virol. 2015; 12: 1-6.

Kumar B, Asha K, Khanna M, Ronsard L, Meseko CA, Sanicas M. The emerging influenza virus threat: status and new prospects for its therapy and control. Arch Virol. 2018; 163: 831-44.

Kundu A, Avalos RT, Sanderson CM, Nayak DP. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. J Virol. 1996; 70: 6508-15.

Kurebayashi Y, Takahashi T, Tamoto C, Sahara K, Otsubo T, Yokozawa T, Shibahara N, Wada H, Minami A, Ikeda K, Suzuki T. High-Efficiency Capture of Drug Resistant-Influenza Virus by Live Imaging of Sialidase Activity. PloS one. 2016; 11: e0156400.

Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2000; 54: 188-95.

L'huillier AG, Abed Y, Petty TJ, Cordey S, Thomas Y, Bouhy X, Schibler M, Simon A, Chalandon Y, Van Delden C, Zdobnov E, Boquete-Suter P, Boivin G, Kaiser L. E119D Neuraminidase Mutation Conferring Pan-Resistance to Neuraminidase Inhibitors in an A(H1N1)pdm09 Isolate From a Stem-Cell Transplant Recipient. The Journal of infectious diseases. 2015; 212: 1726-34.

Lakadamyali M, Rust MJ, Zhuang X. Endocytosis of influenza viruses. Microbes Infect. 2004; 6: 929-36.

Lazo PA, Santos CR. Interference with p53 functions in human viral infections, a target for novel antiviral strategies? Rev Med Virol. 2011; 21: 285-300.

Lebouder F, Khoufache K, Menier C, Mandouri Y, Keffous M, Lejal N, Krawice-Radanne I, Carosella ED, Rouas-Freiss N, Riteau B. Immunosuppressive HLA-G molecule is upregulated in alveolar epithelial cells after influenza A virus infection. Hum Immunol. 2009; 70: 1016-9.

Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. Trends Cell Biol. 2014; 24: 360-9.

Lei X, Dong X, Ma R, Wang W, Xiao X, Tian Z, Wang C, Wang Y, Li L, Ren L, Guo F, Zhao Z, Zhou Z, Xiang Z, Wang J. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. Nat Commun. 2020; 11: 3810.

Lengyel P. Biochemistry of interferons and their actions. Annu Rev Biochem. 1982; 51: 251-82.

Leser GP, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. Virology. 2005; 342: 215-27.

Levy DE, Marie I, Prakash A. Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. Curr Opin Immunol. 2003; 15: 52-8.

Li K, Markosyan RM, Zheng YM, Golfetto O, Bungart B, Li M, Ding S, He Y, Liang C, Lee JC, Gratton E, Cohen FS, Liu SL. IFITM proteins restrict viral membrane hemifusion. PLoS Pathog. 2013; 9: e1003124.

Li S, Min JY, Krug RM, Sen GC. Binding of the influenza A virus NS1 protein to PKR mediates the inhibition of its activation by either PACT or double-stranded RNA. Virology. 2006; 349: 13-21.

Liau NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, Callaghan K, Nicola NA, Kershaw NJ, Babon JJ. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. Nat Commun. 2018; 9: 1558.

Lin RJ, Liao CL, Lin E, Lin YL. Blocking of the alpha interferon-induced Jak-Stat signaling pathway by Japanese encephalitis virus infection. J Virol. 2004; 78: 9285-94.

Lipatov AS, Govorkova EA, Webby RJ, Ozaki H, Peiris M, Guan Y, Poon L, Webster RG. Influenza: emergence and control. J Virol. 2004; 78: 8951-9.

Loeffen WL, De Vries RP, Stockhofe N, Van Zoelen-Bos D, Maas R, Koch G, Moormann RJ, Rottier PJ, De Haan CA. Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. Vaccine. 2011; 29: 1545-50.

Long JS, Mistry B, Haslam SM, Barclay WS. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. Nat Rev Microbiol. 2019; 17: 67-81.

Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). Methods in enzymology. 2013; 529: 227-40.

Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. Immunity. 2011; 34: 680-92.

Lowen AC. Constraints, Drivers, and Implications of Influenza A Virus Reassortment. Annu Rev Virol. 2017; 4: 105-21.

Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A, Flavell RA. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 5598-603.

Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. Nature. 2007; 448: 816-9.

Malmgaard L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. J Interferon Cytokine Res. 2004; 24: 439-54.

Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. EMBO J. 1998; 17: 6660-9.

Martin K, Helenius A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. J Virol. 1991; 65: 232-44.

Matikainen S, Pirhonen J, Miettinen M, Lehtonen A, Govenius-Vintola C, Sareneva T, Julkunen I. Influenza A and sendai viruses induce differential chemokine gene expression and transcription factor activation in human macrophages. Virology. 2000; 276: 138-47.

Matrosovich MN, Gambaryan AS, Teneberg S, Piskarev VE, Yamnikova SS, Lvov DK, Robertson JS, Karlsson KA. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. Virology. 1997; 233: 224-34.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 4620-4.

Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature. 2007; 449: 819-26.

Melchjorsen J, Kristiansen H, Christiansen R, Rintahaka J, Matikainen S, Paludan SR, Hartmann R. Differential regulation of the OASL and OAS1 genes in response to viral infections. J Interferon Cytokine Res. 2009; 29: 199-207.

Melendi GA, Coviello S, Bhat N, Zea-Hernandez J, Ferolla FM, Polack FP. Breastfeeding is associated with the production of type I interferon in infants infected with influenza virus. Acta Paediatr. 2010; 99: 1517-21.

Mendelman PM, Cordova J, Cho I. Safety, efficacy and effectiveness of the influenza virus vaccine, trivalent, types A and B, live, cold-adapted (CAIV-T) in healthy children and healthy adults. Vaccine. 2001; 19: 2221-6.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. Nature. 2006; 442: 39-44.

Miller JE, Samuel CE. Proteolytic cleavage of the reovirus sigma 3 protein results in enhanced double-stranded RNA-binding activity: identification of a repeated basic amino acid motif within the C-terminal binding region. J Virol. 1992; 66: 5347-56.

Minamoto S, Ikegame K, Ueno K, Narazaki M, Naka T, Yamamoto H, Matsumoto T, Saito H, Hosoe S, Kishimoto T. Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 237: 79-83.

Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. Organization of the influenza virus replication machinery. Science. 2012; 338: 1631-4.

Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. Clin Microbiol Rev. 2009; 22: 240-73, Table of Contents.

Momose F, Naito T, Yano K, Sugimoto S, Morikawa Y, Nagata K. Identification of Hsp90 as a stimulatory host factor involved in influenza virus RNA synthesis. J Biol Chem. 2002; 277: 45306-14.

Moraga I, Harari D, Schreiber G, Uze G, Pellegrini S. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities. Mol Cell Biol. 2009; 29: 4778-87.

Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. The persistent legacy of the 1918 influenza virus. N Engl J Med. 2009; 361: 225-9.

Mostafa A, Abdelwhab EM, Mettenleiter TC, Pleschka S. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses: A Comprehensive Overview. Viruses. 2018; 10.

Muller KH, Kakkola L, Nagaraj AS, Cheltsov AV, Anastasina M, Kainov DE. Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. Trends Pharmacol Sci. 2012; 33: 89-99.

Munoz-Fontela C, Mandinova A, Aaronson SA, Lee SW. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. Nat Rev Immunol. 2016; 16: 741-50.

Murphy BR, Hinshaw VS, Sly DL, London WT, Hosier NT, Wood FT, Webster RG, Chanock RM. Virulence of avian influenza A viruses for squirrel monkeys. Infect Immun. 1982; 37: 1119-26.

Murphy DG, Dimock K, Kang CY. Numerous transitions in human parainfluenza virus 3 RNA recovered from persistently infected cells. Virology. 1991; 181: 760-3.

Nagano Y, Kojima Y. [Immunizing property of vaccinia virus inactivated by ultraviolets rays]. C R Seances Soc Biol Fil. 1954; 148: 1700-2.

Nagano Y, Kojima Y, Sawai Y. [Immunity and interference in vaccinia; inhibition of skin infection by inactivated virus]. C R Seances Soc Biol Fil. 1954; 148: 750-2.

Nagata K, Saito S, Okuwaki M, Kawase H, Furuya A, Kusano A, Hanai N, Okuda A, Kikuchi A. Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. Exp Cell Res. 1998; 240: 274-81.

Navratil V, De Chassey B, Meyniel L, Pradezynski F, Andre P, Rabourdin-Combe C, Lotteau V. System-level comparison of protein-protein interactions between viruses and the human type I interferon system network. J Proteome Res. 2010; 9: 3527-36.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res. 2009; 143: 147-61.

Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. Virus Res. 2004; 106: 147-65.

Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. Nat Med. 1999; 5: 1157-63.

Nelson MI, Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. Nat Rev Genet. 2007; 8: 196-205.

Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. The EMBO journal. 2000; 19: 6751-8.

Nilsen TW, Maroney PA, Baglioni C. Double-stranded RNA causes synthesis of 2',5'-oligo(A) and degradation of messenger RNA in interferon-treated cells. J Biol Chem. 1981; 256: 7806-11.

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. Gene. 1991; 108: 193-9.

Noda T, Sagara H, Yen A, Takada A, Kida H, Cheng RH, Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. Nature. 2006; 439: 490-2.

Nogales A, Martinez-Sobrido L, Topham DJ, Dediego ML. Modulation of Innate Immune Responses by the Influenza A NS1 and PA-X Proteins. Viruses. 2018; 10.

Okamoto M, Tsukamoto H, Kouwaki T, Seya T, Oshiumi H. Recognition of Viral RNA by Pattern Recognition Receptors in the Induction of Innate Immunity and Excessive Inflammation During Respiratory Viral Infections. Viral Immunol. 2017; 30: 408-20.

Onoguchi K, Yoneyama M, Fujita T. Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors. J Interferon Cytokine Res. 2011; 31: 27-31.

Oppermann M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. Cell Signal. 2004; 16: 1201-10.

Osterlund P, Strengell M, Sarin LP, Poranen MM, Fagerlund R, Melen K, Julkunen I. Incoming influenza A virus evades early host recognition, while influenza B virus induces interferon expression directly upon entry. J Virol. 2012; 86: 11183-93.

Ozato K, Uno K, Iwakura Y. Another road to interferon: Yasuichi Nagano's journey. J Interferon Cytokine Res. 2007; 27: 349-52.

Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet. 2001; 357: 1777-89.

Pavlovic J, Arzet HA, Hefti HP, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, Haller O. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. J Virol. 1995; 69: 4506-10.

Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. J Virol. 1992; 66: 2564-9.

Payne S. Family Orthomyxoviridae. Viruses : From Understanding to Investigation. 1st ed. London: Academic Press; 2017, p: 197-208.

Pestka S. The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn. J Biol Chem. 2007; 282: 20047-51.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. Annu Rev Immunol. 2004a; 22: 929-79.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. Immunol Rev. 2004b; 202: 8-32.

Pflug A, Guilligay D, Reich S, Cusack S. Structure of influenza A polymerase bound to the viral RNA promoter. Nature. 2014; 516: 355-60.

Pham PTV, Turan K, Nagata K, Kawaguchi A. Biochemical characterization of avian influenza viral polymerase containing PA or PB2 subunit from human influenza A virus. Microbes Infect. 2018; 20: 353-9.

Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis E Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. Science. 2006; 314: 997-1001.

Pielak RM, Chou JJ. Influenza M2 proton channels. Biochim Biophys Acta. 2011; 1808: 522-9.

Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell. 1992; 69: 517-28.

Pinto LH, Lamb RA. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. J Biol Chem. 2006; 281: 8997-9000.

Pitini V, Arrigo C, Altavilla G. How cells respond to interferons. J Clin Oncol. 2010; 28: e439; author reply e40.

Plans-Rubio P. Prevention and control of influenza in persons with chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2007; 2: 41-53.

Plotch SJ, Bouloy M, Krug RM. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76: 1618-22.

Pornillos O, Garrus JE, Sundquist WI. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. Trends Cell Biol. 2002; 12: 569-79.

Pothlichet J, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting edge: innate immune response triggered by influenza A virus is negatively regulated by SOCS1 and SOCS3 through a RIG-I/IFNAR1-dependent pathway. J Immunol. 2008; 180: 2034-8.

Potter CW. A history of influenza. Journal of applied microbiology. 2001; 91: 572-9.

Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, Hergott D, Porter-Gill P, Mumy A, Kohaar I, Chen S, Brand N, Tarway M, Liu L, Sheikh F, Astemborski J, Bonkovsky HL, Edlin BR, Howell CD, Morgan TR, Thomas DL, Rehermann B, Donnelly RP, O'brien TR. A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. Nat Genet. 2013; 45: 164-71.

Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). J Virol. 1994; 68: 2425-32.

Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. RNA. 1995; 1: 304-16.

Ramanathan A, Robb GB, Chan SH. mRNA capping: biological functions and applications. Nucleic Acids Res. 2016; 44: 7511-26.

Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. J Gen Virol. 2008; 89: 1-47.

Refolo G, Vescovo T, Piacentini M, Fimia GM, Ciccosanti F. Mitochondrial Interactome: A Focus on Antiviral Signaling Pathways. Front Cell Dev Biol. 2020; 8: 8.

Reichelt M, Stertz S, Krijnse-Locker J, Haller O, Kochs G. Missorting of LaCrosse virus nucleocapsid protein by the interferon-induced MxA GTPase involves smooth ER membranes. Traffic. 2004; 5: 772-84.

Reid AH, Taubenberger JK. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. J Gen Virol. 2003; 84: 2285-92.

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. EMBO J. 2001; 20: 2140-51.

Riva L, Yuan S, Yin X, Martin-Sancho L, Matsunaga N, Pache L, Burgstaller-Muehlbacher S, De Jesus PD, Teriete P, Hull MV, Chang MW, Chan JF, Cao J, Poon VK, Herbert KM, Cheng K, Nguyen TH, Rubanov A, Pu Y, Nguyen C, Choi A,

Rathnasinghe R, Schotsaert M, Miorin L, Dejosez M, Zwaka TP, Sit KY, Martinez-Sobrido L, Liu WC, White KM, Chapman ME, Lendy EK, Glynne RJ, Albrecht R, Ruppin E, Mesecar AD, Johnson JR, Benner C, Sun R, Schultz PG, Su AI, Garcia-Sastre A, Chatterjee AK, Yuen KY, Chanda SK. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. Nature. 2020; 586: 113-9.

Rodriguez A, Perez-Gonzalez A, Nieto A. Cellular human CLE/C14orf166 protein interacts with influenza virus polymerase and is required for viral replication. J Virol. 2011; 85: 12062-6.

Roers A, Hochkeppel HK, Horisberger MA, Hovanessian A, Haller O. MxA gene expression after live virus vaccination: a sensitive marker for endogenous type I interferon. J Infect Dis. 1994; 169: 807-13.

Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. Virology. 2011; 411: 229-36.

Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, Xiang Y, Bose S. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. Nat Immunol. 2009; 10: 1073-80.

Sabbatani S, Fiorino S. [The Spanish influenza pandemic]. Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive. 2007; 15: 272-85.

Said EA, Tremblay N, Al-Balushi MS, Al-Jabri AA, Lamarre D. Viruses Seen by Our Cells: The Role of Viral RNA Sensors. J Immunol Res. 2018; 2018: 9480497.

Saito T, Gale M, Jr. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. J Exp Med. 2008; 205: 1523-7.

Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. Yale J Biol Med. 2009; 82: 153-9.

Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. Antiviral research. 2013; 98: 174-85.

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

Sanchez David RY, Combredet C, Najburg V, Millot GA, Beauclair G, Schwikowski B, Leger T, Camadro JM, Jacob Y, Bellalou J, Jouvenet N, Tangy F, Komarova AV. LGP2 binds to PACT to regulate RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Sci Signal. 2019; 12.

Sarkar D, Desalle R, Fisher PB. Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: independent evolution by domain grafting. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 17040-5.

Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010; 107: 1512-7.

Scheiffele P, Roth MG, Simons K. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. EMBO J. 1997; 16: 5501-8.

Schierhorn KL, Jolmes F, Bespalowa J, Saenger S, Peteranderl C, Dzieciolowski J, Mielke M, Budt M, Pleschka S, Herrmann A, Herold S, Wolff T. Influenza A Virus Virulence Depends on Two Amino Acids in the N-Terminal Domain of Its NS1 Protein To Facilitate Inhibition of the RNA-Dependent Protein Kinase PKR. J Virol. 2017; 91.

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. Annu Rev Immunol. 2014; 32: 513-45.

Scholtissek C. Stability of infectious influenza A viruses at low pH and at elevated temperature. Vaccine. 1985; 3: 215-8.

Segat L, Zupin L, Kim HY, Catamo E, Thea DM, Kankasa C, Aldrovandi GM, Kuhn L, Crovella S. HLA-G 14 bp deletion/insertion polymorphism and mother-to-child transmission of HIV. Tissue Antigens. 2014; 83: 161-7.

Sen GC. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol. 2001; 55: 255-81.

Sen GC, Lebleu B, Brown GE, Kawakita M, Slattery E, Lengyel P. Interferon, double-stranded RNA and mRNA degradation. Nature. 1976; 264: 370-3.

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

Seo SH, Hoffmann E, Webster RG. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. Nat Med. 2002; 8: 950-4.

Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. Cell. 2005; 122: 669-82.

Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. Int J Mol Sci. 2017; 18.

Shim JM, Kim J, Tenson T, Min JY, Kainov DE. Influenza Virus Infection, Interferon Response, Viral Counter-Response, and Apoptosis. Viruses. 2017; 9.

Shinya K, Watanabe S, Ito T, Kasai N, Kawaoka Y. Adaptation of an H7N7 equine influenza A virus in mice. J Gen Virol. 2007; 88: 547-53.

Short KR, Kroeze E, Fouchier RaM, Kuiken T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. Lancet Infect Dis. 2014; 14: 57-69.

Short KR, Richard M, Verhagen JH, Van Riel D, Schrauwen EJ, Van Den Brand JM, Manz B, Bodewes R, Herfst S. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. One Health. 2015; 1: 1-13.

Siddiqui MA, Malathi K. RNase L induces autophagy via c-Jun N-terminal kinase and double-stranded RNA-dependent protein kinase signaling pathways. J Biol Chem. 2012; 287: 43651-64.

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

Silverman RH. Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. J Interferon Res. 1994; 14: 101-4.

Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer biology. Biochemistry. 2003; 42: 1805-12.

Silverman RH. Viral encounters with 2',5'-oligoadenylate synthetase and RNase L during the interferon antiviral response. J Virol. 2007; 81: 12720-9.

Simon A, Fah J, Haller O, Staeheli P. Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. J Virol. 1991; 65: 968-71.

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

Slepushkin VA, Katz JM, Black RA, Gamble WC, Rota PA, Cox NJ. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. Vaccine. 1995; 13: 1399-402.

Slepushkin VA, Staber PD, Wang G, Mccray PB, Jr., Davidson BL. Infection of human airway epithelia with H1N1, H2N2, and H3N2 influenza A virus strains. Mol Ther. 2001; 3: 395-402.

Smith GL, Hay AJ. Replication of the influenza virus genome. Virology. 1982; 118: 96-108.

Sobel Leonard A, Mcclain MT, Smith GJ, Wentworth DE, Halpin RA, Lin X, Ransier A, Stockwell TB, Das SR, Gilbert AS, Lambkin-Williams R, Ginsburg GS, Woods CW, Koelle K, Illingworth CJ. The effective rate of influenza reassortment is limited during human infection. PLoS Pathog. 2017; 13: e1006203.

Song MS, Pascua PN, Lee JH, Baek YH, Lee OJ, Kim CJ, Kim H, Webby RJ, Webster RG, Choi YK. The polymerase acidic protein gene of influenza a virus contributes to pathogenicity in a mouse model. J Virol. 2009; 83: 12325-35.

Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. Cancer Lett. 2008; 267: 271-85.

Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences. 2012; 88: 226-49.

Staeheli P, Haller O, Boll W, Lindenmann J, Weissmann C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned Mx cDNA confers selective resistance to influenza virus. Cell. 1986; 44: 147-58.

Stark GR. How cells respond to interferons revisited: from early history to current complexity. Cytokine Growth Factor Rev. 2007; 18: 419-23.

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem. 1998; 67: 227-64.

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

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

Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. Emerg Infect Dis. 2004; 10: 693-9.

Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. Nat Med. 2009; 15: 277-84.

Taft AS, Ozawa M, Fitch A, Depasse JV, Halfmann PJ, Hill-Batorski L, Hatta M, Friedrich TC, Lopes TJ, Maher EA, Ghedin E, Macken CA, Neumann G, Kawaoka Y. Identification of mammalian-adapting mutations in the polymerase complex of an avian H5N1 influenza virus. Nat Commun. 2015; 6: 7491.

Takahashi T, Hashimoto A, Maruyama M, Ishida H, Kiso M, Kawaoka Y, Suzuki Y, Suzuki T. Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. FEBS letters. 2009; 583: 3171-4.

Takeda M, Leser GP, Russell CJ, Lamb RA. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 14610-7.

Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. Curr Opin Immunol. 2002; 14: 111-6.

Taubenberger JK. The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. Archives of virology Supplementum. 2005: 101-15.

Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. Cell Host Microbe. 2010; 7: 440-51.

Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 15-22.

Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. Annu Rev Pathol. 2008; 3: 499-522.

Taylor MW, Grosse WM, Schaley JE, Sanda C, Wu X, Chien SC, Smith F, Wu TG, Stephens M, Ferris MW, Mcclintick JN, Jerome RE, Edenberg HJ. Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. J Interferon Cytokine Res. 2004; 24: 107-18.

Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. Annu Rev Immunol. 2005; 23: 307-36.

Tian SF, Buckler-White AJ, London WT, Reck LJ, Chanock RM, Murphy BR. Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/Mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract. J Virol. 1985; 53: 771-5.

Ting JP, Lovering RC, Alnemri ES, Bertin J, Boss JM, Davis BK, Flavell RA, Girardin SE, Godzik A, Harton JA, Hoffman HM, Hugot JP, Inohara N, Mackenzie A, Maltais LJ, Nunez G, Ogura Y, Otten LA, Philpott D, Reed JC, Reith W, Schreiber S, Steimle V, Ward PA. The NLR gene family: a standard nomenclature. Immunity. 2008; 28: 285-7.

Tong S, Li Y, Rivailler P, Conrardy C, Castillo DA, Chen LM, Recuenco S, Ellison JA, Davis CT, York IA, Turmelle AS, Moran D, Rogers S, Shi M, Tao Y, Weil MR, Tang K, Rowe LA, Sammons S, Xu X, Frace M, Lindblade KA, Cox NJ, Anderson LJ, Rupprecht CE, Donis RO. A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012; 109: 4269-74.

Treanor JJ, El Sahly H, King J, Graham I, Izikson R, Kohberger R, Patriarca P, Cox M. Protective efficacy of a trivalent recombinant hemagglutinin protein vaccine (FluBlok(R)) against influenza in healthy adults: a randomized, placebo-controlled trial. Vaccine. 2011; 29: 7733-9.

Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. Nucleic Acids Res. 2004; 32: 643-52.

Turan K, Nagata K, Kuru A. Antiviral effect of Sanicula europaea L. leaves extract on influenza virus-infected cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 225: 22-6.

Tyner JW, Uchida O, Kajiwara N, Kim EY, Patel AC, O'sullivan MP, Walter MJ, Schwendener RA, Cook DN, Danoff TM, Holtzman MJ. CCL5-CCR5 interaction provides antiapoptotic signals for macrophage survival during viral infection. Nat Med. 2005; 11: 1180-7.

Tyring SK. Interferons: biochemistry and mechanisms of action. Am J Obstet Gynecol. 1995; 172: 1350-3.

Uğurlu H. HAX-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. K Turan).

Uze G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S. The receptor of the type I interferon family. Curr Top Microbiol Immunol. 2007; 316: 71-95.

V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. Nat Rev Microbiol. 2020.

Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, Garotta G. Distribution of interferon-gamma receptor in human tissues. Eur J Immunol. 1992; 22: 2403-12.

Veit M, Kretzschmar E, Kuroda K, Garten W, Schmidt MF, Klenk HD, Rott R. Site-specific mutagenesis identifies three cysteine residues in the cytoplasmic tail as acylation sites of influenza virus hemagglutinin. J Virol. 1991; 65: 2491-500.

Viboud C, Grais RF, Lafont BA, Miller MA, Simonsen L, Multinational Influenza Seasonal Mortality Study G. Multinational impact of the 1968 Hong Kong influenza pandemic: evidence for a smoldering pandemic. J Infect Dis. 2005; 192: 233-48.

Wang B, Lam TH, Soh MK, Ye Z, Chen J, Ren EC. Influenza A Virus Facilitates Its Infectivity by Activating p53 to Inhibit the Expression of Interferon-Induced Transmembrane Proteins. Front Immunol. 2018; 9: 1193.

Wang H, Chen L, Luo J, He H. NP and NS1 proteins of H5N1 virus significantly upregulated IFITM1, IFITM2, and IFITM3 in A549 cells. Afr Health Sci. 2019; 19: 1402-10.

Wang J, Nikrad MP, Phang T, Gao B, Alford T, Ito Y, Edeen K, Travanty EA, Kosmider B, Hartshorn K, Mason RJ. Innate immune response to influenza A virus in

differentiated human alveolar type II cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 2011a; 45: 582-91.

Wang J, Qiu JX, Soto C, Degrado WF. Structural and dynamic mechanisms for the function and inhibition of the M2 proton channel from influenza A virus. Curr Opin Struct Biol. 2011b; 21: 68-80.

Wang W, Xu L, Su J, Peppelenbosch MP, Pan Q. Transcriptional Regulation of Antiviral Interferon-Stimulated Genes. Trends Microbiol. 2017; 25: 573-84.

Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. Cell Host Microbe. 2007; 2: 96-105.

Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? Science. 2003; 302: 1519-22.

Weber F, Haller O, Kochs G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. J Virol. 2000; 74: 560-3.

Weber F, Kochs G, Haller O, Staeheli P. Viral evasion of the interferon system: old viruses, new tricks. J Interferon Cytokine Res. 2003; 23: 209-13.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev. 1992; 56: 152-79.

Wharton SA, Belshe RB, Skehel JJ, Hay AJ. Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine. J Gen Virol. 1994; 75 (Pt 4): 945-8.

Wilks S, De Graaf M, Smith DJ, Burke DF. A review of influenza haemagglutinin receptor binding as it relates to pandemic properties. Vaccine. 2012; 30: 4369-76.

Wille M, Holmes EC. The Ecology and Evolution of Influenza Viruses. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020; 10.

Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene. 1999; 18: 6112-20.

Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. Nature. 1981; 289: 366-73.

Wu WW, Pante N. The directionality of the nuclear transport of the influenza A genome is driven by selective exposure of nuclear localization sequences on nucleoprotein. Virol J. 2009; 6: 68.

Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JY, Wang H, Menachery VD, Rajsbaum R, Shi PY. Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. Cell Rep. 2020; 33: 108234.

Xiao H, Killip MJ, Staeheli P, Randall RE, Jackson D. The human interferon-induced MxA protein inhibits early stages of influenza A virus infection by retaining the incoming viral genome in the cytoplasm. J Virol. 2013; 87: 13053-8.

Yan H, Krishnan K, Lim JT, Contillo LG, Krolewski JJ. Molecular characterization of an alpha interferon receptor 1 subunit (IFNaR1) domain required for TYK2 binding and signal transduction. Mol Cell Biol. 1996; 16: 2074-82.

Yanai H, Negishi H, Taniguchi T. The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. Oncoimmunology. 2012; 1: 1376-86.

Yang YL, Reis LF, Pavlovic J, Aguzzi A, Schafer R, Kumar A, Williams BR, Aguet M, Weissmann C. Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. EMBO J. 1995; 14: 6095-106.

Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. Curr Opin Immunol. 2015; 32: 48-53.

Yoon SW, Webby RJ, Webster RG. Evolution and ecology of influenza A viruses. Curr Top Microbiol Immunol. 2014; 385: 359-75.

Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nat Rev Immunol. 2007; 7: 454-65.

Yuan P, Bartlam M, Lou Z, Chen S, Zhou J, He X, Lv Z, Ge R, Li X, Deng T, Fodor E, Rao Z, Liu Y. Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. Nature. 2009a; 458: 909-13.

Yuan W, Xie J, Long C, Erdjument-Bromage H, Ding X, Zheng Y, Tempst P, Chen S, Zhu B, Reinberg D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L Is a subunit of human KMT3a/Set2 complex required for H3 Lys-36 trimethylation activity in vivo. J Biol Chem. 2009b; 284: 15701-7.

Zeng W, Sun L, Jiang X, Chen X, Hou F, Adhikari A, Xu M, Chen ZJ. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. Cell. 2010; 141: 315-30.

Zhang H, Hale BG, Xu K, Sun B. Viral and host factors required for avian H5N1 influenza A virus replication in mammalian cells. Viruses. 2013; 5: 1431-46.

Zhang J, Pekosz A, Lamb RA. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. J Virol. 2000; 74: 4634-44.

Zhang WQ, Song SX, Wang TZ. [Advances in the structure and function of pandemic A/H1N1/2009 influenza virus HA protein]. Bing du xue bao = Chinese journal of virology. 2012; 28: 444-52.

Zhou A, Paranjape J, Brown TL, Nie H, Naik S, Dong B, Chang A, Trapp B, Fairchild R, Colmenares C, Silverman RH. Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. EMBO J. 1997; 16: 6355-63.

Zhou A, Paranjape JM, Der SD, Williams BR, Silverman RH. Interferon action in triply deficient mice reveals the existence of alternative antiviral pathways. Virology. 1999; 258: 435-40.

Zhou H, Chen S, Wang M, Cheng A. Interferons and their receptors in birds: a comparison of gene structure, phylogenetic analysis, and cross modulation. Int J Mol Sci. 2014; 15: 21045-68.

9. EKLER

9.1.Ek-1. Araştırma Makalesi

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 ,2020

DOI: 10.3906/biy-2005-73

9.2.Ek-2. Poster Sunumu

Comparison of Interferon-Related Gene Expression Profiles in the Cells Infected with Human and Avian Type Influenza A Viruses

2nd Internatıonal Congress Of Medıcal Sciences and Biotechnology

Uşak/ 1-3 October 2020

UŞAK ÜNİVERSİTESİ

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

Elif ÇAĞLAYAN

We are very thankful for your poster presentation in ***'2nd International Congress of Medical Science and Biotechnology'*** *which was held online, between 01-03 October 2020 and organized by Usak University, Beykent University and İzmir Kavram Vocational School.*

Assoc. Prof. Dr. Alper KARAGÖZ
Chair of the Congress

Prof. Dr. Ekrem SAVAŞ
Rector of Uşak University

Uluslararası Sağlık Bilimleri ve Biyoteknoloji Kongresi

2. ULUSLARARASI SAĞLIK BİLİMLERİ VE BİYOTEKNOLOJİ KONGRESİ

2ND INTERNATIONAL CONGRESS OF MEDICAL SCIENCES AND BIOTECHNOLOGY

KONGRE KİTABI
CONGRESS BOOK

Editör:
Doç. Dr. Alper KARAGÖZ

UŞAK, 2020

Comparison of Interferon-Related Gene Expression Profiles in the Cells Infected with Human and Avian Type Influenza A Viruses

Elif Çağlayan[1] and Kadir TURAN[2]
[1]Institute of Health Sciences, Marmara University, Istanbul, Turkey
[2]Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Marmara University, Istanbul, Turkey

Introduction: Influenza A viruses can cause flu outbreaks in humans with high rates of morbidity and mortality worldwide, and is regarded as a major global health threat. The virus host specificity and pathogenicity not only depend on viral factors, but also host intracellular defense mechanisms play an important role. Therefore, the elucidation of complex interactions between the host and viruses is the most important point of the studies.

Material and Methods: The transcript of interferon related 84 genes (RT² Profiler PCR Array) have been quantified in the cDNAs prepared from HEK-293 cells virus infected with human-type influenza A/WSN/33/H1N1 (WSN) and avian type Influenza A/duck/Pennsylvania/10,218/84/H5N2 (DkPen) viruses. Quantitation of interferon-related genes transcripts was carried out with quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The assay was repeated at least three times for each group. The statistical significance of differences between experimental groups was evaluated using analysis of variance (one-way ANOVA with Newman-Keuls post test) in the SPSS ($p \leq 0.05$).

Results: qRT-PCR analysis showed that, 35 genes were found to be upregulated and 20 genes found to be downregulated in the cells infected with influenza A/WSN virus compared to uninfected cells. It was found that the most increased transcripts in the cells infected with WSN viruses were encoded by the genes; CCL5 (160 fold), HLA-G (275 fold), (IFIT2) (81 fold), IFNB1 (185 fold), (IFNW1 (76 fold) and OAS1 (89 fold). The most decreased transcript in the cells infected with this virus was SOCS1 gene transcript (697 fold). On the other hand, 18 genes were found to be upregulated and 33 genes found to be downregulated in the cells infected with influenza A/DkPen. The highest increase values were detected in the transcripts of CCL5 (33-fold), HLA-G (980-fold), IFNB1 (92-fold) and OAS1 (28-fold) genes. The genes whose the most decreased transcript levels were OAS2 (627-fold) and SOCS1 (18-fold) genes.
Conclusion: It has been revealed that some interferon response genes give similar expression profiles in HEK293 cells infected with both human and avian influenza A viruses. In contrast, more interferon-related genes were down-regulated in DkPen infected cells comparing to WSN viruses (DkPen infected / 33 genes; WSN infected / 20 genes), while fewer genes were up-regulated (DkPen infected / 18 genes; WSN infected / 35 genes). It was concluded that the interferon related proteins are important in the replication efficiency of different types of influenza viruses in infected cells.

Acknowledgments
This work was supported by a grant from the Marmara University Research Foundation (grant no: SAG-C-DRP-250919-0291).

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	ELİF	**Soyadı**	ÇAĞLAYAN
Uyruğu	T.C.	**E-mail**	elifcaglayan@hotmail.com

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya	2017-2021
Önlisans	Anadolu Üniv./A.Ö.F./İlahiyat	2017-2020
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya	2012-2014
Lisans	Istanbul Üniversitesi/Fen Fakültesi-Biyoloji	2006-2009
Önlisans	Anadolu Üniv./A.Ö.F./Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2005-2007
Önlisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Hizmetleri M.Y.O- Tıbbi Laboratuvar	2000-2002

İş Deneyimi

Görevi		**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1	Laborant	T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2004-2006
2	Laborant	T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2006-2010
3	Biyolog	T. C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi	2010-Halen

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
Ingilizce	Iyi	Iyi	Iyi

Yabancı Dil Sınav Notu #								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
80								

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi