



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN BETA AKTİN PROTEİNİ İLE İNFLUENZA VİRÜSÜ
RNA POLİMERAZ ENZİMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

NAZİFE GELMEZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. KADİR TURAN

İSTANBUL - 2019

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)
Tez Sahibi : Nazife GELMEZ
Tez Başlığı : İnsan Beta Aktin Proteini ile İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 28.06.2019

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Kadir TURAN

Kurumu

Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Azize ŞENER

Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK

İstanbul Üniv., Fen Fakültesi



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 03 Temmuz/2019 tarih ve 52 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOLĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

- Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
- Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

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 çalışmasıyla elde edilmeyen 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.

Nazife GELMEZ

I. TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi birikimi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışmamın planlanmasından oluşumuna kadar her aşamasında ilgi ve desteğini sürekli hissettiren, bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşmayı kendine akademik görev edinmiş olan, akademik kariyer hedeflerimde kendime örnek aldığım ve kendisiyle çalışmış olmayı büyük bir kazanç ve şans olarak gördüğüm Tez Danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan' a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

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

Laboratuvar çalışmalarında bilgi birikiminden ve tecrübelerinden sıkça yararlandığım desteğini benden esirgemeyen, bu işi gerçekten büyük bir özveri ve sevgi ile yapan Ayşegül PİRİNÇAL'a ve laboratuvarında birlikte çalıştığım arkadaşlarım Ayşenur GÜNEŞ ve Tuğba KOÇMAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca hem maddi hem manevi desteğini benden esirgemeyen, eğitim hayatımda bugünlere gelmeme büyük katkı sağlayan kıymetli dayım Yusuf GELİR'e teşekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca bana her konuda destek olan, çalışmalarım süresince bana anlayış ve fedakarlık gösteren sevgili annem Nazlı GELMEZ'e ve sevgili babam Mehmet GELMEZ'e teşekkür ederim.

Ayrıca birçok şeyi başaracağıma inanan, bana desteklerini her zaman hissettiren çok sevdiğim biricik kardeşlerim Hilal GELMEZ ve Rabia Nihal GELMEZ'e çok teşekkür ederim.

Nazife GELMEZ

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

I. TEŞEKKÜR	ii
II. İÇİNDEKİLER	iii
III. KISALTMALAR	viii
IV. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ	x
i. Şekil Listesi	x
ii. Tablo Listesi	xii

II. İÇİNDEKİLER

1 ÖZET	1
2 SUMMARY	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ	3
4 GENEL BİLGİLER	6
4.1. İnfluenza Virüsleri	6
4.2. İnfluenza A Virüslerinin Moleküler Yapısı	17
4.3. İnfluenza A Virüsü Yaşam Döngüsü	19
4.4. İnfluenza Patogenezi	22
4.5. İnfluenza Virüslerine Karşı Etkili Olan Hücre İçi Savunma Mekanizmaları	25
4.6. Aktin Proteinleri.....	27
5 GEREÇ ve YÖNTEM	30
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
5.2. Enzimler	31
5.3. Ticari Kitler	32
5.4. Antikorlar	32
5.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	32
5.6. Besiyerleri	33
5.6.1. Luria-Bertani (LB) besiyeri	33
5.6.2. Luria-Bertani agar (LBA) besiyeri	33
5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri	33
5.7. Çözeltiler ve Tamponlar	34
5.7.1. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-	

Akrilamid – a/h)	34
5.7.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (% 10 – a/h)	34
5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu)	34
5.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml)	34
5.7.5. %70 Etil alkol	34
5.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)	34
5.7.7. Fenol : Kloroform : İzooamil Alkol (25:24:1)	35
5.7.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)	35
5.7.9. Glikoz çözeltisi (1 M)	35
5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)	35
5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)	36
5.7.12. Lamel kapatma çözeltisi	36
5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0.55M)	36
5.7.14. % 10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi	36
5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi	36
5.7.16. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M)	36
5.7.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 – a/h)	36
5.7.18. Polietilen glikol (PEG) (%20 –a/h) / NaCl çözeltisi (1.25 M)	37
5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml)	37
5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)	37
5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)	37
5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (% 7.5)	37
5.7.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)	37
5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h)	37
5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)	38
5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M)	38
5.7.27. % 0.25 Tripsin çözeltisi	38
5.7.28. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0.05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h)	38
5.7.29. Tween-20 çözeltisi (%10)	38
5.7.30. Bakteri transformasyon tamponu	38
5.7.31. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA, pH: 8.0)	39

5.7.32. DNA ekstraksiyon tamponu II (0.2 N NaOH, % 1 SDS)	39
5.7.33. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum: 5 M Asetat)	39
5.7.34. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu	39
5.7.35. Hücre liziz tamponu	39
5.7.36. 2x Konsantre NP-40 liziz tamponu	39
5.7.37. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH 6.8)	40
5.7.38. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M tris, % 0.4 SDS, pH 8.8)	40
5.7.39. Poliakrilamid jel elektroforez tamponu (0.025 M tris, 0.25 M Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)	40
5.7.40. Protein transfer tamponu	40
5.7.41. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M tris; %8 SDS – a/h; %0.2 bromofenol mavisi – a/h; %4 2-merkaptotanol – h/h; %40 gliserin – h/h; pH 6.8)	40
5.7.42. 2x Konsantre RIFA tamponu (50 mM tris, pH 8 ; 5 mM EDTA, pH 8 ; 150 mM NaCl; %1 NP-40, a/h ; %0.5 sodyum deoksikolat, a/h; %10 SDS, a/h)	41
5.7.43. Sodyum asetat tamponu (3M)	41
5.7.44. 50x konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu	41
5.7.45. Tris-HCl tamponu (1 M, pH 8.0)	41
5.7.46. Tris/EDTA (TE) tamponu (10 mM tris / 1 mM EDTA, pH 8.0) ..	41
5.7.47. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0.125 M tris, 1.25 M glisin, pH:8.3)	41
5.7.48. 20x Konsantre TBS tamponu	42
5.7.49. TBS ve TBS-T tamponu	42
5.8. Plazmit Vektörler	42
5.9. Virüsler	42
5.10. Bakteriler	42
5.11. Memeli Hücre Hatları	42
5.12. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması	43
5.13. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez	43

5.14. Plazmit DNA'larının Kantitatif ve Kalitatif Analizi	43
5.15. Transformasyon için <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi	44
5.16. Delesyonlu <i>ACTB</i> Genleri Taşıyan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması	44
5.17. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Saflaştırılması	46
5.18. Ligasyon ve Transformasyon	47
5.19. Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması	47
5.20. Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu	48
5.21. Plazmit DNA'lar Restriksiyon Endonukleaz Enzimi İle Kesilerek Kontrol Edilmesi	48
5.22. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri ...	49
5.23. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması	49
5.24. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu	50
5.25. Plazmit Vektörler Üzerinden Kodlanan <i>ACTB</i> Proteinlerinin ve Viral Proteinlerin Western Melezleme Yöntemi ile Analizi	50
5.25.1. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarının hazırlanması	51
5.25.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması	51
5.25.3. Proteinlerin jelde yürütülmesi ve nitrosellüloz membrana transfer edilmesi	51
5.25.4. Membran üzerinde proteinlerin görüntülenmesi	52
5.26. <i>ACTB</i> Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmüno Floresan Yöntemle İncelenmesi	52
5.27. <i>ACTB</i> Proteinleri ile İnfluenza PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması	53
5.27.1. İmmüno Floresan teknikler ile PA proteini ve <i>ACTB</i> proteinleri arasındaki ilişkinin aktarılması	53
5.27.2. Birlikte immün çöktürme	54
5.28. <i>ACTB</i> Proteinlerinin Aşırı Ekspresyonlarının İnfluenza Virüs Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması	55
6 BULGULAR	56

6.1. İnsan ACTB Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler	56
6.2. Plazmit DNA'nın PEI ile HEK293 Hücrelerine Transfeksiyonun Optimizasyonu ile İlgili Veriler	63
6.3. Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinlerinin Western Melezleme Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Veriler	64
6.4. ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinlerinin Hücre içi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler	65
6.5. ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinleri ile PA Proteini Arasındaki İlişkinin Araştırılması ile İlgili Bulgular	67
6.5.1. Birlikte immün-çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar	67
6.5.2. ACTB ve PA proteinlerinin birlikte hücre içi lokalizasyonları ile ilgili veriler	68
6.6. HEK293 Hücrelerde Fazla Miktarlarda Sentez Edilen ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinlerin İnfluenza Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile İlgili Veriler	69
7 TARTIŞMA ve SONUÇ	71
8 KAYNAKLAR	80
9 EKLER	93
10 ÖZGEÇMİŞ	94

III. KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
a/h	Ağırlık/hacim
ACTB	Aktin beta
Ade	Adenin
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz çifti
cPA	PA proteinin karboksil-terminal ucu
D'MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
EV71	Enterovirus 71
FCS	Fetal buzağı serumu
FITC	Floresan izosiyanat
Flag	DYKDDDDK (D=aspartik asit, Y=tirozin, K=lizin)
FTS	Fizyolojik tuzlu su
Gr	Gram
g/L	Gram/litre
h/h	Hacim/hacim
HA	Hemaglutinin
HEK-293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HeLa	İnsan servikal kanser hücreleri
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
KDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre

Mm	Milimolar
NA	Nöraminidaz
NP	Nükleoprotein
nPA	PA proteinin amino-terminal ucu
NLS	Nüklear lokalizasyon sinyali
NS1	Viral yapısal olmayan protein 1
OD	Optik dansite
PA	Polimeraz asidik proteini
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PIPES	1,4-piperazindietansülfonik asit
PVDF	Polivinilidenflorit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIPA	ing. Radioimmunoprecipitation Assay
RNP	Ribonükleoprotein kompleksi
RT-PZR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SiRNA	ing. Small Interfering RNA
SV40	Simian Virüs 40
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
U	Ünite
UV	Ultraviyole
vRNP	Viral ribonükleoprotein partikül
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ M	Mikromolar

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. İnfluenza A virüslerinin enfekte ettiği organizmalar	8
Şekil 2. İnfluenza virüslerinin konak hücrelere tutunmasında görev alan reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri ve virüslerin tercih ettikleri sialik asit bağlanma formları	9
Şekil 3. İnfluenza A virüslerinde antijenik kayma (antijenik shift) ve antijenik sapma (antijenik drift)	10
Şekil 4. İnfluenza virüslerinde meydana gelen genetik değişmeler. A. Viral RNA segmentlerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının birikmesi (antijenik drift). B. Aynı hücreyi enfekte eden iki farklı tipte İnfluenza A virüsü RNA segmentlerinin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi (<i>Ing. reassortment</i>) (antijenik shift)	12
Şekil 5. İnfluenza A virüsü M2 kanal proteininin inhibe eden adamantan türevi amantadin ve rimantadinin molekül yapıları (A), Amantadinin bağlanması ile oluşan amantadin/ M2 protein kompleksi (B) ve adamantan türevi ilaçların virüsün hücre sitoplazmasında endozomdan serbestleşmesini bloke etme mekanizmaları (C)	15
Şekil 6. İnfluenza virüslerine ait NA enzimini inhibe eden sialik asit analogu antiviral ilaçlar	16
Şekil 7. İnfluenza A virüsü şematik görünümü (A), Viral genomu oluşturan RNA segmentleri ve bu segmentler üzerinden kodlanan proteinler (B) ve vRNP'ler (C)	18
Şekil 8. İnfluenza virüsü yaşam döngüsü. 1. Adsorpsiyon, 2. Penetrasyon, 3. Serbestleşme (kot atma), 4. Hücre nukleusuna taşınma, 5. Transkripsiyon ve replikasyon, 6. vRNA'lerin sitoplazmaya taşınması, 7. Viral proteinlerin sentezi (translasyon), 8 ve 9. Kurulum, 10. Hücreden ayrılma	20
Şekil 9. İnfluenza virüslerine karşı gelişen bağışıklık yanıtı mekanizmaları ..	24
Şekil 10. İnsan aktin β proteinini kodlayan genin ekzon-intron şematik gösterimi	29
Şekil 11. pCHA-ACTB plazmit vektörü üzerinden ters PZR ile çoğaltılan delesyonlu ACTB geni taşıyan doğrusal plazmit vektörlerin oluşturulmasında kullanılan primerlerin pozisyonları ve bağlanma yönleri (A). PZR sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin elektroforez profilleri (B)	58

Şekil 12. pCHA-ACTB plazmiti ve bu plazmit üzerinden türetilen delesyonlu ACTB proteini kodlayan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları	59
Şekil 13. Koloni PZR ile plazmit vektörlerin kontrol edilmesi	60
Şekil 14. Oluşturulan plazmitlerin <i>EcoRI</i> restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek kontrol edilmesi	61
Şekil 15. pCHA plazmit vektörüne klonlanan insan <i>ACTBΔ2-3</i> , <i>ACTBΔ3</i> , <i>ACTBΔ4</i> , <i>ACTBΔ5-6</i> ve <i>ACTBΔ6</i> genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	62
Şekil 16. HEK293 hücrelerinin pEGFP-N1/PEI kompleksleri ile transfeksiyonu	63
Şekil 17. İnsan <i>ACTB</i> geninin ekzon/intron yapısı (A). ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin şematik gösterimi ve amino asit kompozisyonlarına göre belirlenen molekül ağırlıkları (B)	64
Şekil 18. pCHA-ACTB, pCHA-ACTBΔ2-3, pCHA-ACTBΔ3, pCHA-ACTBΔ4, pCHA-ACTBΔ5-6 ve pCHA-ACTBΔ6 plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin HeLa hücrelerindeki lokalizasyonları	66
Şekil 19. İnsan ACTB proteini ve İnfluenza PA proteininin arasındaki ilişkinin immün çöktürme testleri ile analizi.	68
Şekil 20. İnfluenza A virüsü PA proteini ve ACTB proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve ACTB proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu	69
Şekil 21. Plazmit transfeksiyonu ile ACTB ve delesyonlu ACTB protein düzeyi arttırılan HEK293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi	70

ii. Tablo Listesi

Tablo 1. pCHA-ACTB plazmit vektörü üzerinden ters PZR tekniği ile belirli ekzon bölgelerini içermeyen delesyonlu gen taşıyan plazmit vektörlerin elde edilmesinde kullanılan oligonukleotit primerler	45
--	----

Başlık :İnsan Beta Aktin Proteini ile İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Araştırılması

Öğrencinin Adı : Nazife GELMEZ

Danışman : Prof. Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan İnfluenza A virüsleri sık sık tekrarlayan salgınlarla insan sağlığını tehdit eden önemli viral patojenlerdir. Bu nedenle çok sayıda bilim insanı İnfluenza virüslerinin konak hücrelerle olan ilişkisini moleküler düzeyde aydınlatmak için yoğun çaba sarfetmektedir. Viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonu PB1, PB2 ve PA alt birimlerinden oluşan RNA polimeraz enzimi tarafından kataliz edilmektedir. Bu tez çalışmasında, daha önce maya ikili hibrit metodu ile ilişkileri saptanan viral RNA polimeraz enziminin PA alt ünitesi ile insan beta aktin (ACTB) proteini arasındaki ilişki memeli hücrelerinde araştırıldı. ACTB proteinin influenza virüsü replikasyonu açısından önemini ortaya konması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCHA plazmitine klonlanmış insan ACTB cDNA'sından belirli ekzon bölgeleri ters PZR ile uzaklaştırıldı ve delesyonlu ACTB proteini kodlayan vektörler oluşturuldu. HeLa ve/veya HEK293 hücreleri ACTB ve delesyonlu ACTB proteinleri ile İnfluenza A virüsü PA proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edildi. Bu hücrelerde birlikte sentez edilen ACTB ve viral PA proteinleri arasındaki ilişki birlikte immün çöktürme ve hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikleri ile analiz edildi.

Bulgular ve Sonuç: Birlikte immün çöktürme ve immünfloresan teknikler transfekte HeLa ve/veya HEK293 hücrelerinde plazmitler üzerinden sentez edilen ACTB ve İnfluenza PA proteinlerinin etkileşim halinde olduğunu ortaya koydu. Delesyonlu ACTB ve viral PA proteinlerinin gösterdikleri etkileşim profilleri, ACTB proteininin özellikle amino-terminal bölgesinin viral PA proteini ile ilişkili olduğu; bu ilişkide PA proteinin karboksil-terminal yarımının (cPA) önem taşıdığını gösterdi. Bu verilerden İnfluenza virüsü kurulumunda vRNP'lerin sitoplazmada taşınması sürecinde ACTB proteinlerinin rolü olabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, Viral RNA polimeraz, PA protein, İnsan beta aktin proteini, vRNP

Title : **Investigation of the relationship between influenza A virus RNA polymerase and human actin beta protein**

Student's name : Nazife GELMEZ

Supervisor : Prof. Dr. Kadir TURAN

Department : Department of Biochemistry

2. SUMMARY

Aim: Influenza A viruses within the *Orthomyxoviridae* family are important viral pathogens that frequently threaten human health with outbreaks. For this reason, many scientists are working intensively to enlighten the interaction of influenza viruses with host cells at the molecular level. The transcription and replication of viral RNAs is catalyzed by the RNA polymerase. In this study, the relationship between human ACTB protein and PA subunit of viral RNA polymerase enzyme, which was previously determined by yeast two-hybrid method, was investigated in mammalian cells. It was aimed to determine whether ACTB protein is important for influenza virus replication.

Materials and Methods: Specific exon regions from *ACTB* cDNA cloned into the pCHA plasmid expressing in mammalian cells were removed by invers PCR and vectors encoding the deletion ACTB protein were generated. HeLa and/or HEK293 cells were co-transfected with plasmid vectors encoding ACTB and deleted ACTB proteins and viral PA proteins. The relationship between ACTB and PA proteins co-expressed in the cells was analyzed with co-immunoprecipitation and immunofluorescence assays.

Results and Conclusion: Co-immunoprecipitation and immunofluorescence assays revealed that ACTB and Influenza PA proteins, synthesized via plasmids in transfected cells, are in association with each other. The interaction profiles of deleted ACTB and viral PA proteins show that the amino-terminal region of the ACTB protein is associated with viral PA protein; showed that the carboxyl-terminal moiety (cPA) of the PA protein was important in this relationship. From these data, it was concluded that ACTB proteins may play a role in the transport process of influenza virus vRNPs in the cytoplasm.

Keywords: Influenza, Viral RNA polymerase, PA protein, Human actin beta protein, vRNP

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Orthomyxoviridae ailesi içerisinde sınıflandırılan İnfluenza A virüsleri, 80 - 120 nm boyutlarında, membranla çevrili RNA virüsleridir (Couch, 1996). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde küresel veya pleomorfik bir görünüm sergilerler (Burleigh ve ark., 2005; Lamb ve Choppin, 1983). İnfluenza virüsünün genomunu oluşturan RNA'ları tek iplikli negatif polarite gösteren moleküllerdir. İnfluenza A ve B tipi virüsler sekiz parçadan oluşan RNA genomuna sahiptir. İnfluenza C tipi virüslerde ise yedi parçalı RNA genomu bulunmaktadır (Couch, 1996).

İnfluenza virüsleri matriks proteini (M1) nuklear proteinin (NP) antijenik özelliklerine göre üç ana gruba ayrılırlar. Bunlar İnfluenza A, B ve C tipi virüslerdir (Couch, 1996). Yakın geçmişte, sığırlardan izole edilen bir İnfluenza virüsünün, mevcut virüs tiplerinden farklı olduğu saptanmış ve İnfluenza D tipi virüsler olarak yeni bir virüs grubu oluşturulmuştur (Ferguson ve ark., 2016; Hause ve ark., 2013). İnfluenza virüsleri arasında özellikle İnfluenza A tipi virüsler insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. İnfluenza B grubu virüsler ise insanlarda enfeksiyon yapmakla birlikte pandemilere neden olmazlar. İnfluenza C ve D tipi virüsler insan sağlığı için önemli bir risk oluşturmazlar. İnfluenza B virüsleri antijenik özellikleri bakımından, İnfluenza A virüsleri kadar büyük bir çeşitlilik göstermezler. Buna karşın İnfluenza A virüsleri yüzey antijen proteinleri HA ve NA proteinleri bakımından büyük bir çeşitlilik gösterirler (Couch, 1996). Bu proteinlerin immünolojik özelliklerine göre İnfluenza A virüsleri çok sayıda alt tipe ayrılır. Günümüze kadar antijenik olarak farklı 18 HA proteini, 11 NA proteini tipi belirlenmiştir (<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm> - Erişim tarihi: 25.05.2019). Bu iki proteinin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi ile büyük bir virüs çeşitliliği ortaya çıkmaktadır. İnfluenza A virüslerinin HA ve NA proteinlerinde görülen mevcut bu çeşitlilik ve mutasyonlar ve rekombinasyon sonucunda yeni virüs tiplerinin ortaya çıkması bağışıklık sistemimizin yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak, zaman zaman ağır seyreden İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına maruz kalırız. İnfluenza A virüs enfeksiyonları bazen epidemiler bazen de pandemiler halinde kendisini gösterir (Lagace-Wiens ve ark., 2010). Bu virüsler sadece insanlarda değil, domuzlar,

atlar, çeşitli deniz memeliler ve birçok kanatlı organizmalarda salgınlara neden olurlar (Parrish ve ark., 2015).

İnsan sağlığı açısından çok büyük bir risk oluşturan İnfluenza A virüslerine karşı korunmada günümüzde iki yol izlenmektedir. Bunlardan birincisi aşılar, ikincisi ise antiviral (anti-influenza) ilaçlardır (Centers for Disease and Prevention, 2009; Fiore ve ark., 2011). Yukarıda da değinildiği gibi İnfluenza A virüslerinin gösterdiği antijenik çeşitlilik ve yeni antijen tiplerinin ortaya çıkması, aşuların koruyucu etkilerinin çok kısa ömürlü olmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde antiviral ilaçlara karşı da dirençli virüs tipleri ortaya çıkmaktadır.

İnfluenza virüsleri yapısal ve işlevsel özellikleri bakımından üzerinde en çok çalışılan virüslerden biridir. Bununla birlikte bu virüsler hakkında çok fazla bilinmeyen vardır. Virüsün replikasyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılabilmesi için konak hücre proteinleri ve replikasyon ve transkripsiyon gibi temel hücresel olaylar ile ilişkisinin ortaya konması büyük önem taşımaktadır. Bu yönüyle ele alındığında influenza virüslerinin replikasyonu üzerinde pozitif ya da negatif yönde etkili olan birçok konak hücre proteini tespit edilmiştir (Dou ve ark., 2018; Samji, 2009). Bu tez çalışması kapsamında da hücresel proteinlerden aktin beta (ACTB) proteininin İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkisi ele alınmıştır. Bu proteinin seçilmesinde maya ikili hibrit metodu ile yapılan tarama çalışmalarında İnfluenza A virüsü PA proteini ile ilişkili olduğunun gösterilmesidir (yayınlanmamış veri; TÜBİTAK projesi/Yürütücüsü: Dr. Kadir Turan/ Proje no: 112S518). Aktin proteinleri evrimsel açıdan çok iyi korunmuş proteinlerdir (Hanukoglu ve ark., 1983). Bütün ökaryotik organizma hücreleri aktin proteinlerini ihtiva eder. Aktin proteinleri hücredeki toplam proteinlerin ortalama % 5 -10'nu oluşturur (Cooper, 2000). Aktin proteinleri, mayalar gibi daha basit yapıda ökaryotik organizmalarda sadece bir aktin geni tarafından kodlanırken, yüksek organizasyonlu ökaryotlarda bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır (Gunning ve ark., 2015).

Bu tez çalışmasında maya hücrelerinde İnfluenza A virüsü polimeraz enzimi ile ilişkili olduğu gösterilen insan ACTB proteininin memeli hücrelerinde virüs RNA polimeraz enzimi ile etkileşimi ve bu etkileşimin viral replikasyon açısından önemli olup olmadığının konusu ele alınmıştır. Viral polimeraz enzimi ile ACTB proteini

arasındaki olası ilişkiyi saptamak amacıyla pCHA plazmitine klonlanmış ACTB geninde belirli ekzonlar delesyona uğratılarak, bu genler üzerinden kodlanan ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin İnfluenza A virüsü RNA polimeraz alt ünitelerinden PA proteini ile ilişkisi *in vitro* koşullarda moleküler biyoloji teknikleri ve immünfloresan teknikler ile araştırılmıştır.



4. GENEL BİLGİLER

Virüsler, yalnızca canlı hücrelerde çoğalabilen küçük bir enfeksiyöz ajandır. Kendi yapılarında bulunan moleküllerin sentezi için gerekli olan metabolik reaksiyonları gerçekleştirebilecek mekanizmalara sahip değildirler. O nedenle replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi karmaşık süreçleri için konak organizmaya gereksinimleri vardır. Virüsler, hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve arkeler dahil olmak üzere tüm yaşam formlarını enfekte eder ve yaşam döngülerini tamamlamak için konak olarak kullanırlar (Koonin ve ark., 2006).

Virüsler canlı organizmalar içerisinde en basit yapıda olmalarına karşın yapısal olarak büyük bir çeşitlilik gösterirler. Bir virüs partikülü, kapsid adı verilen koruyucu bir protein kılıf içinde bulunan DNA veya RNA moleküllerinden oluşur. Virüs genomu tek ya da çift iplikli DNA ya da RNA molekülünden oluşabilir. Bir virüs genomu tek parçalı ya da çok parçalı olabilir (Gelderblom, 1996). Bazı virüsler viral genomu koruyan protein kılıfa ek olarak yapıyı çevreleyen bir membran yapısına sahiptirler. Virüslere ait proteinleri de içeren membran yapıları virüs tarafından enfekte olan konak hücrelerde kökenlenirler. Membran yapısı virüsün konak immün sisteminden korunmasına yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda membran üzerinde bulunan proteinler aracılığıyla konak hücrelerde kendilerine özgü reseptör moleküllerine bağlanmasına ve konak hücrelere girişine olanak sağlarlar (Grove ve Marsh, 2011). Bu çalışmaya konu olan İnfluenza virüsleri tek iplikli RNA moleküllerinden oluşan genoma sahip membranlı virüslerdir.

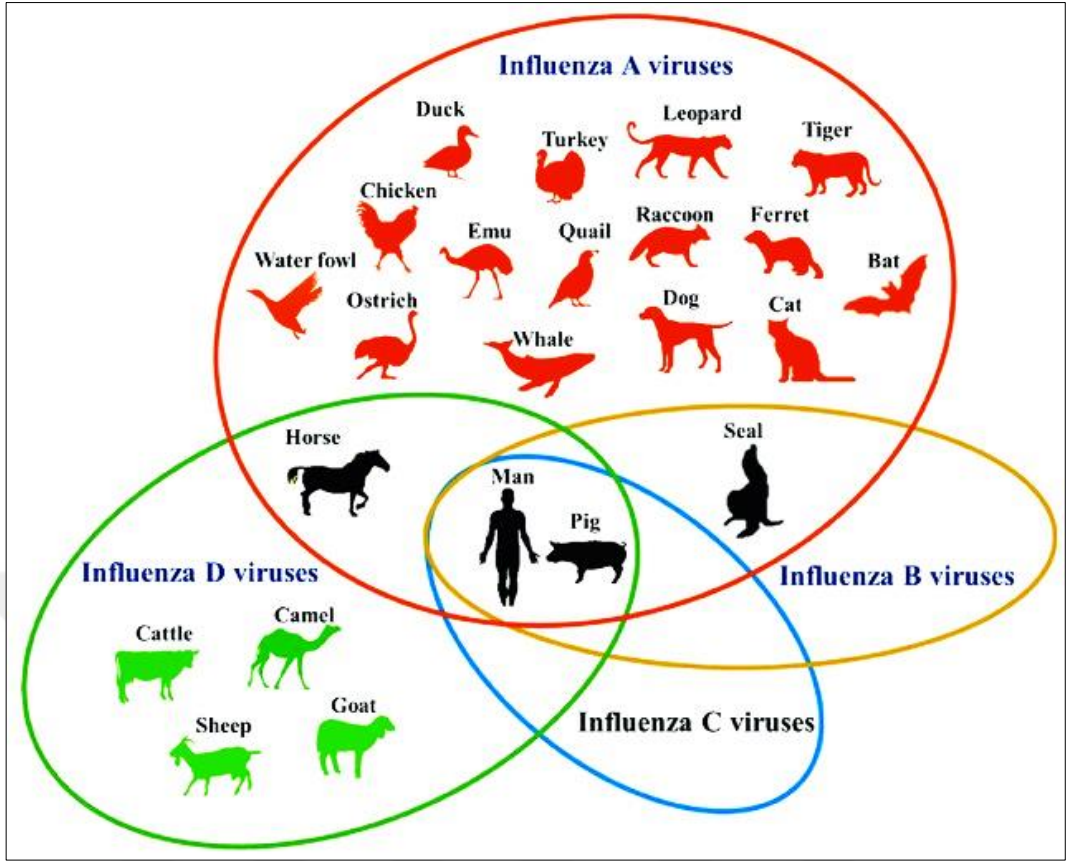
4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri, başta kanatlılar olmak üzere insan ve diğer memeli organizmalarda enfeksiyon yapan virüslerdir. Bu virüsler *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılırlar (Büchen-Osmond, 2006). *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan yedi virüs cinsi bulunmaktadır. Bunlar; İnfluenza A, İnfluenza B, İnfluenza C, İnfluenza D, Isavirüs, Thogotovirüs ve Quaranjavirüslerdir. Isavirüsler somon balıklarında enfeksiyon yaparlar. Thogotovirüsler ise bazı omurgalıları, kene ve sivrisinekler gibi omurgasızları enfekte eden virüslerdir (Jones ve Nuttall, 1989; Raynard ve ark., 2001). *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan İnfluenza A virüsleri kanatlılar, insanlar ve diğer memelilerde grip salgınlarına neden

olan en önemli gruptur. İnfluenza B virüslerinin sadece insanlarda ve foklarda enfeksiyon yaptığı bilinmektedir (Osterhaus ve ark., 2000). İnfluenza C virüsleri insanlar ve domuzlarda enfeksiyon yaparken (Guo ve ark., 1983), İnfluenza D virüsü insan, domuz, at, deve ve sığırlarda enfeksiyon yapabilmektedir (Kuchipudi ve Nissly, 2018; Su ve ark., 2017).

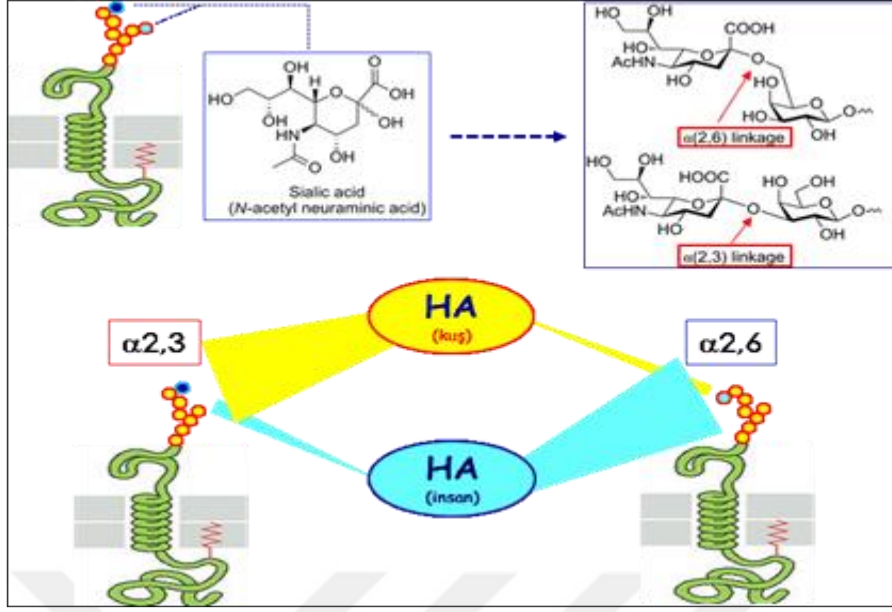
İnfluenza virüsleri, ortalama 80-120 nm çapında, heliks yapıda nükleokapsidli olup morfolojik olarak farklı şekillerde olabilen membranlı virüslerdir. Bu virüsler tek iplikli negatif polarite gösteren çok parçalı RNA genoma sahiptirler (Gulyaev ve ark., 2010; Palese ve Schulman, 1976). İnfluenza A ve B virüslerinin genomları sekiz adet RNA molekülünden oluşur. İnfluenza C ve D virüsleri ise yedi parçadan oluşan RNA genoma sahiptirler (Asha ve Kumar, 2019; Flynn ve ark., 2018). Parçalı genom yapısı özellikle İnfluenza A virüslerinin çok sayıda alt tipinin ortaya çıkmasına olanak tanır.

İnfluenza virüslerinin sınıflandırılmasında sahip oldukları matris proteinleri (M1) ve nükleoproteinlerin (NP) antijenik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Bu proteinlerin antijenik özelliklerine göre İnfluenza virüsleri, A, B, C ve D olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılmıştır. Antijenik özellikleri açısından farklılık gösteren İnfluenza virüsleri içerisinde insan sağlığı bakımından büyük risk oluşturan grup İnfluenza A virüsleridir. İnfluenza A virüsleri sadece insanlar için değil özellikle kanatlı çiftlik hayvanları için de büyük bir risk oluştururlar. İnfluenza A virüslerinin doğal konağı yabani kuşlardır. Bununla birlikte İnfluenza A virüsleri insanları da kapsayan birçok memeli organizmalar ve kanatlılarda da enfeksiyon yapabilen çok geniş bir konak yelpazesine sahiptir (**Şekil 1**). Başta kuşlar olmak üzere, birçok deniz memelisinde, atlarda, kedilerde, köpeklerde, domuzlarda ve insanlarda enfeksiyona sebebiyet vermektedir (Abdelwhab ve Hafez, 2011; Kuchipudi ve Nissly, 2018).



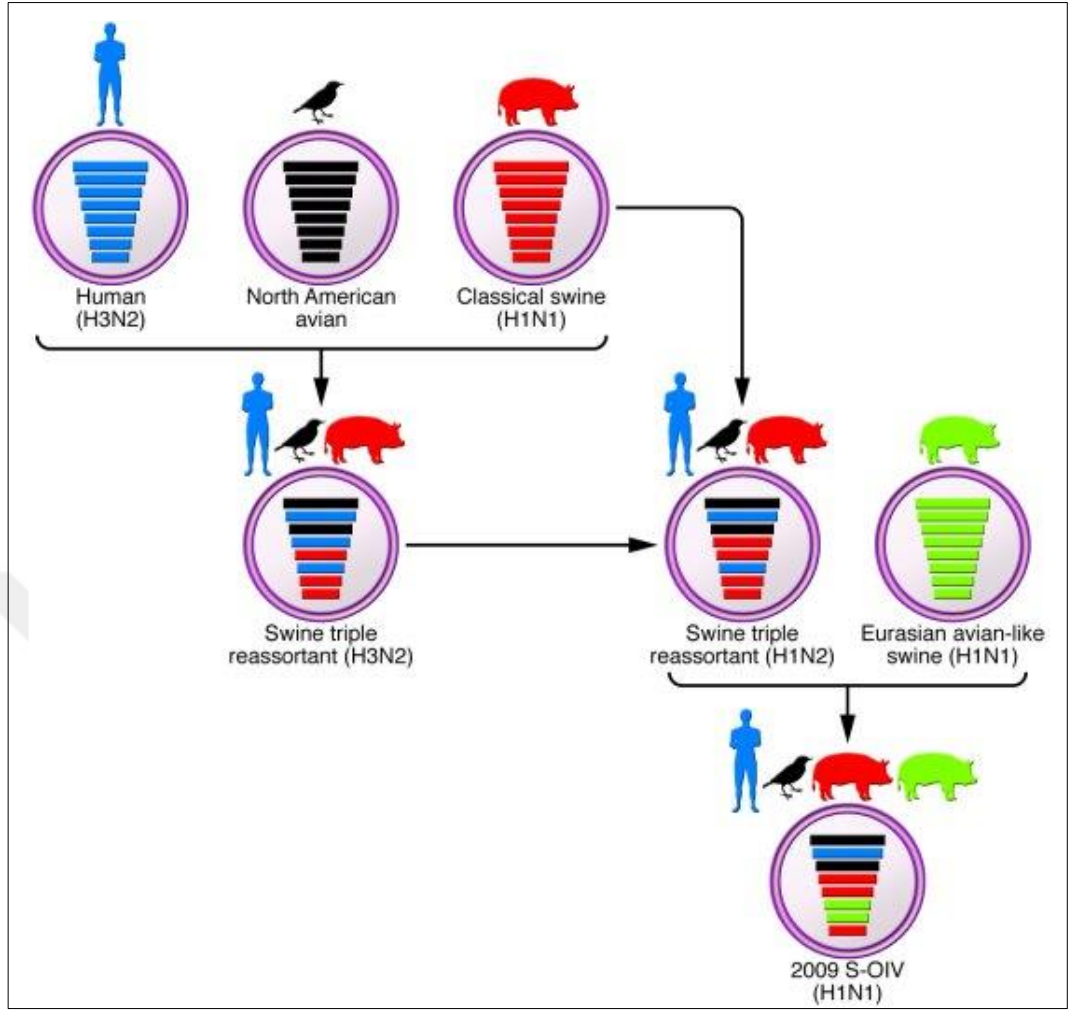
Şekil 1. İnfluenza A virüslerinin enfekte ettiği organizmalar (Kuchipudi ve Nissly, 2018).

Domuzlar, hem insan tipi hem de kuş tipi İnfluenza A virüslerine duyarlılık gösterdiğinden bu virüslerin genom segmentlerinin karışması (*İng. Reassortment*) için en uygun bir ortamı oluşturmaktadır (Ma ve ark., 2008). İnfluenza virüslerinin konak özgülüğünü belirleyen etkenlerin başında, konak hücre membranlarında yer alan glikoproteinlerine bağlı sialik asit bakiyeleri gelmektedir. İnsanlarda enfeksiyon yapan İnfluenza A virüsleri (örn. H1N1) daha çok galaktoz ile α -2,6 bağları yapan sialik asit bakiyeleri (SA α 2,6Gal) taşıyan glikoproteinleri tercih eder. İnfluenza A virüsü için reseptör görevi gören bu proteinler insan solunum yolu epitel hücrelerinde bol miktarda bulunur. Buna karşın kuşlarda enfeksiyon yapan İnfluenza A virüsleri (örn. H5N1) galaktoz ile α -2,3 glikozid bağı yapan sialik asit bakiyelerini (SA α 2,3Gal) tercih eder (**Şekil 2**).



Şekil 2. İnfluenza virüslerinin konak hücelere tutunmasında görev alan reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri ve virüslerin tercih ettikleri sialik asit bağlanma formları.

Bu tip glikoprotein reseptörler kanatlıların bağırsak hücrelerinde yaygın olarak bulunur. Dolayısıyla bağırsak epitel hücreleri bu virüsler için uygun hedeflerdir. Domuzların epitel hücrelerinde ise, hem SA α 2,6Gal hem de SA α 2,3Gal molekülleri bulunmaktadır (Ma ve ark., 2008; Sullivan ve ark., 2010). Bu nedenle domuz hücre reseptörleri, hem insan hem de kuş tipi virüslerin tutunmasına olanak tanır ve aynı hücreyi infekte eden farklı İnfluenza alt tiplerine ait RNA segmentlerinin karışmasına aracılık eder (Sullivan ve ark., 2010; Tscherne ve Garcia-Sastre, 2011) (**Şekil 3**).



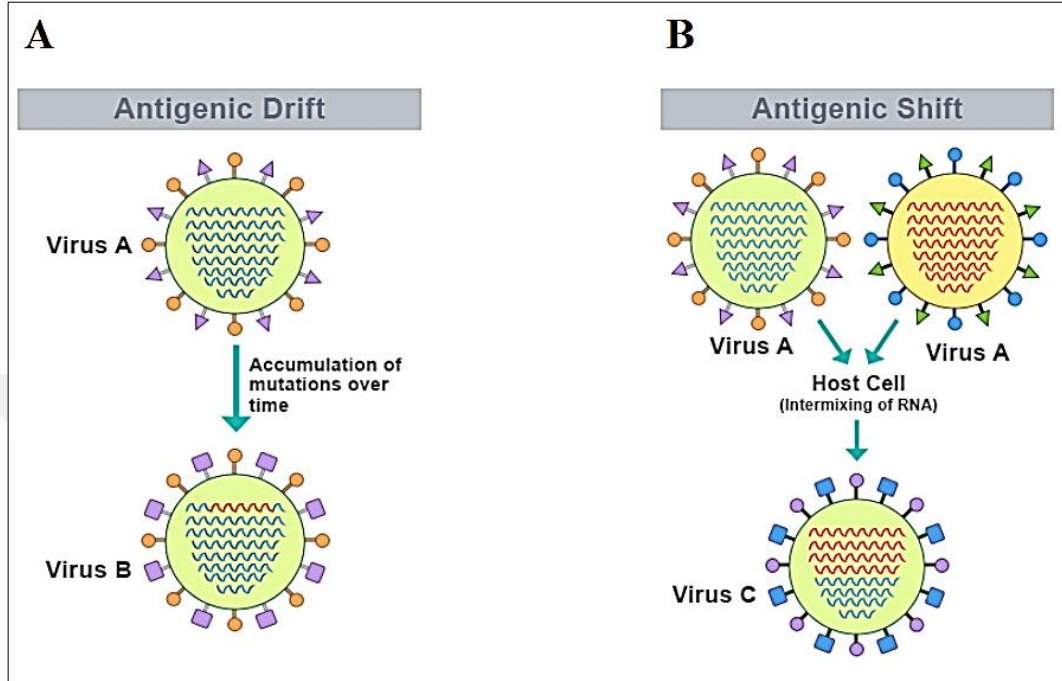
Şekil 3. İnfluenza A virüslerinde antijenik kayma (antijenik shift) ve antijenik sapma (antijenik drift). Konak hücrelerin farklı influenza alt tipleri ile aynı anda enfekte olması sonucu oluşan büyük antijenik yapı değişimi (Tscherne ve Garcia-Sastre, 2011).

İnfluenza A virüslerini çevreleyen membran üzerinde viral genom üzerinden sentez edilen üç farklı protein bulunmaktadır. Bunlardan hemaglutinin (HA) proteini virüs partikülünde en fazla bulunan proteindir (Leser ve Lamb, 2005). Virüs membranında bulunan diğer önemli bir protein nöraminidaz (NA) enzimidir (McAuley ve ark., 2019). NA enzimi miktar olarak HA'ye kıyasla daha azdır. Virüs membranında bu iki proteine ek olarak az miktarlarda M2 kanal proteinleri bulunmaktadır (de Vries ve ark., 2018; Leser ve Lamb, 2005). İnfluenza A virüslerinin alt tiplere ayrılmasında HA ve NA yüzey antijenlerinin özelliklerinden yararlanılır. İnfluenza A virüsleri için immünolojik olarak farklılık gösteren 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) proteini

tanımlanmıştır (<https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm> - Erişim tarihi: 25.05.2019 ; Kawaoka ve Neumann, 2012). Farklı HA ve NA proteinleri virüs partiküllerinde farklı kombinasyonlarda bir araya gelerek çok sayıda farklı influenza virüs tipinin ortaya çıkmasına olanak sağlar. Bilinen influenza A virüslerinin tüm alt tipleri kuşlarda tanımlanmıştır (Straus, 2005). Buna karşın insanlarda mevsimsel dolaşım gösteren İnfluenza virüsü tipleri çoğunlukla H1N1, H2N2 ve H3N2 tipleri ile sınırlıdır. Zaman zaman özellikle kuşlardan geçişler ile farklı influenza A virüsü tipleri de insanlarda enfeksiyon yapabilmektedir (de Vries ve ark., 2018).

Kanatlılarda enfeksiyon yapan İnfluenza A virüslerinin memeli hücrelerinde replikasyon hızları düşüktür. Bununla birlikte mutasyonlar sonucunda memelilerde enfeksiyon için adaptasyon geçirebilirler. Bu şekilde kuşlardan insanlara bulaşan İnfluenza A virüsleri insan sağlığı açısından çok daha büyük riskler taşımaktadır (de Vries ve ark., 2018). Çok parçalı RNA genomu taşıyan İnfluenza A virüsleri diğer virüslere göre çok daha yüksek frekanslarda genetik değişikliğe uğrar. Bu genetik değişim temelde iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Genetik olarak değişimin birinci nedeni; konak hücrelerde hızlı bir şekilde replikasyon geçiren virüs genomlarında meydana gelen nokta mutasyonlarıdır. İnfluenza virüsleri tek iplikli RNA genomu taşıdıklarından, konak hücrede mRNA'ları ve yeni viral RNA'ları sentez edebilmek için yapılarında RNA'yı kopyalayan RNA polimeraz enzimi taşımaktadır. Üç farklı alt üniteden (PB2, PB1 ve PA) meydana gelen İnfluenza A virüsüne ait RNA polimeraz enziminin diğer birçok viral RNA polimeraz enzimlerinde olduğu gibi hata yapma frekansı yüksektir (Couch, 1996). Buna karşın RNA'yı şablon olarak kullanan viral RNA polimeraz enzimlerinin replikasyon sırasında meydana gelen hatalarını düzeltme yetenekleri yoktur. Bu nedenle virüsün replikasyonu sırasında virüs genomunun çeşitli segmentlerinde çok sayıda nokta mutasyonu meydana gelmektedir. Viral RNA segmentlerinde oluşan bu nokta mutasyonlarının birikmesi özellikle virüsün en önemli yüzey antijenleri olan HA ve NA glikoproteinlerinde antijenik sapma (antigenic drift) olarak isimlendirilen değişikliğe neden olur (Bouvier ve Palese, 2008) (**Şekil 4A**). Viral proteinlerde ortaya çıkan bu farklılaşmalar, konağın bağışıklık sistemi tarafından virüslerin daha geç algılanmasına neden olur. Antijenik drift, tüm İnfluenza virüsü tiplerinde gerçekleşir ve tekrarlayan viral epidemilerin temel nedenidir. İnfluenza A virüslerinde görülen antijenik değişimin ikinci nedeni; bu virüslerin parçalı genom

yapılarından kaynaklanan segmentlerin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesidir (*İng. reassortment*). Antijenik kayma (antigenic shift) olarak tanımlanan bu olaylar İnfluenza A virüsü genom yapısında daha büyük değişmelere neden olur (**Şekil 4B**).



Şekil 4. İnfluenza virüslerinde meydana gelen genetik değişmeler. **A.** Viral RNA segmentlerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının birikmesi (antijenik drift). **B.** Aynı hücreyi enfekte eden iki farklı tipte İnfluenza A virüsü RNA segmentlerinin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi (*İng. reassortment*) (antijenik shift). (<https://healthhearty.com/antigenic-drift-vs-antigenic-shift> – Erişim tarihi: 20.05.2019).

Yukarıda da değinildiği gibi influenza virüsleri negatif polarite gösteren çok parçalı RNA moleküllerinden oluşan bir genoma sahiptir (Bouvier ve Palese, 2008). Bazen bir konak aynı anda iki farklı İnfluenza A virüsü alt tipi ile enfekte olabilmektedir. Bu gibi durumlarda konak hücrelerde her iki virüs tipine ait RNA segmentleri çoğalabilmektedir. Bu tip enfeksiyonlarda hücrelerde virüs kurulumu esnasında farklı virüs tipine ait RNA segmentleri gelişmiş bir araya gelerek genetik yapısı farklı yeni virüs partikülleri halinde paketlenabilmektedir. Viral RNA segmentlerinin karışması sonucunda viral antijenleri tamamen farklı yeni virüs tipleri oluşmaktadır. Bu oluşan yeni virüs tiplerinin tüm Dünya'yı etkileyen pandemilere yol açma olasılığı

yüksek olacaktır. Büyük antijenik kaymalar sadece tip A virüslerinde gözlenmiştir (Gething ve ark., 1980; Nakajima, 2003).

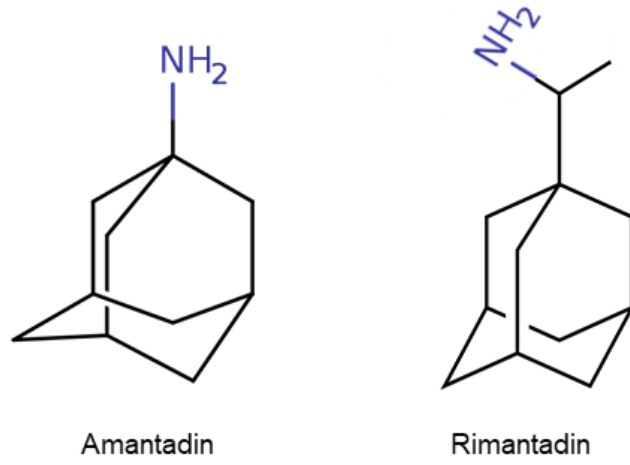
İnsanlarda solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan etkenlerin başında İnfluenza virüsleri gelmektedir. Bu nedenle İnfluenza virüslerinin neden olduğu salgınlar insan sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. İnfluenza virüsleri, geniş bir konak yelpazesine sahip olmaları, insanlarda epidemilere ve kimi zaman yüksek mortalite ile seyreden pandemiler oluşturmaları nedeniyle geçmişte olduğu gibi günümüzde de güncelliklerini korumaktadır (Hsieh ve ark., 2006). Grip ile ilgili tarihteki ilk kayıtlar M.Ö. dördüncü yüzyıla kadar gitmektedir (Kuszewski ve Brydak, 2000). İlk influenza pandemisine ait kayıtlar 1580 yılına aittir. İnfluenza A virüsleri geçen yüzyılda üç büyük pandemiye neden olmuştur (Hsieh ve ark., 2006). Bunlardan, 1918-1919 yıllarındaki pandemi en büyük olanıdır ve farklı kaynaklara göre ortalama 20-50 milyon kişinin ölümüne yol açtığı belirtilmektedir (Taubenberger, 2005). Bu pandemide Dünya nüfusunun % 20-40'ının etkilendiği düşünülmektedir. İspanyol gribi olarak da bilinen bu salgında etkili olan virüsün İnfluenza A/H1N1 olduğu belirlenmiştir (Shortridge, 1999). 1957-1958 yıllarında Asya gribi (İnfluenza A/H2N2) ve 1968-1969 yıllarında Hong Kong gribi (İnfluenza A/H3N2) 20. yüzyılda görülen diğer pandemileridir. Ayrıca 1977-1978 yıllarında daha önce ortaya çıkan İnfluenza A/H1N1 virüsleri Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına yol açmıştır. Yaşadığımız yüzyılın başında 2009 yılı Şubat-Mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan, Nisan ayında ABD'de tanımlanan yeni bir İnfluenza A (H1N1) virüsü tüm Dünyayı etkileyen bir grip salgınına neden olmuştur (Morens ve ark., 2010).

İnfluenza virüsü enfeksiyonları çoğunlukla konak organizmanın kendi doğal bağışıklık sistemi ile kontrol altına alınabilmektedir. Bununla birlikte yukarıda da değinildiği gibi özellikle antijenik kaymalar sonucu ortaya çıkan yeni virüs tiplerinin neden olduğu hastalıklarla mortalite oranları yükselmektedir (Couch ve Kasel, 1983). Günümüzde İnfluenza virüs enfeksiyonları ile mücadelede iki farklı yol izlenmektedir. Bunlardan biri viral enfeksiyonlara karşı korunma amaçlı uygulanan aşılardır, diğeri ise antiviral ilaçlardır. İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı aşı ve antiviral ilaçların geliştirilmesi süreklilik göstermektedir. İnfluenzaya karşı kullanılan aşılarda tam koruma sağlamamakla birlikte özellikle risk grubunda yer alan bireylerde enfeksiyonların daha

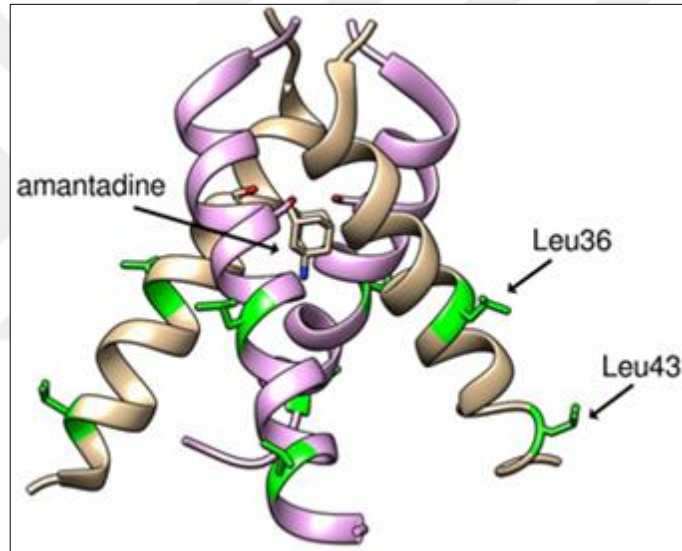
hafif atlatılmasına imkan vermektedir (Zykov, 1982). Aşılar, her yıl, mevsimsel grip etkeni virüs tipine göre yenilenmektedir (<https://www.cdc.gov/flu/about/season/flu-season-2017-2018.htm> - Erişim tarihi: 20.05.2019). Kullanılacak influenza virüs aşılarının hangi virüs alt tiplerinden oluşacağı Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) ve Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA: U.S. Food and Drug Administration) tarafından belirlenmektedir (Hay ve McCauley, 2018).

İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı korunmada izlenen ikinci bir yol antiviral ilaçlar ile tedavidir. İnfluenzaya karşı kullanılan mevcut antiviral ilaçlar iki farklı kategoride değerlendirilebilir. Bir grup antiviral ilaçlar, İnfluenza A virüslerinin konak hücre sitoplazmasında endozomlardan serbestleşmesi aşamasında etkili olan ilaçlardır. Bu ilaçlar viral membranda yer alan M2 proteinini inhibe eden iyon kanalı blokerleridir (**Şekil 5**). M2 proteinini inhibe eden bu ilaçlar adamantan türevi (amantadin ve rimantadin) ilaçlardır. Adamantan türevi ilaçlar sadece İnfluenza A virüsleri üzerinde etkilidirler. İnfluenza B virüslerine karşı etkileri bulunmamaktadır. Diğer taraftan CDC verilerine göre, yapılan çalışmalar dolaşımda olan İnfluenza virüslerinin büyük bir çoğunluğunun M2 kanal inhibitörü olan adamantan türevi ilaçlara karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Centers for Disease and Prevention, 2009). Dolayısıyla bu grup ilaçların İnfluenza virüslerine karşı kullanımları çok sınırlıdır.

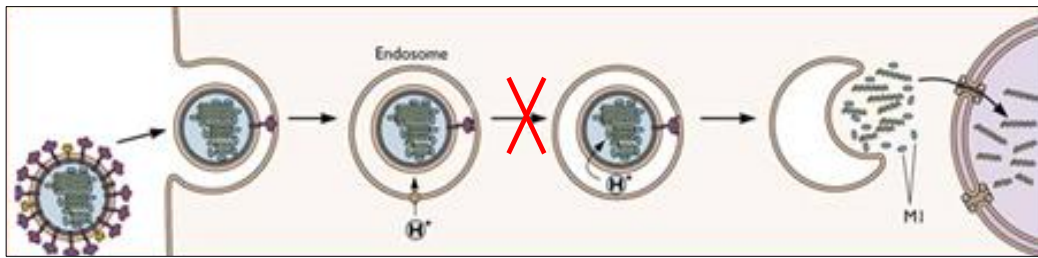
A



B

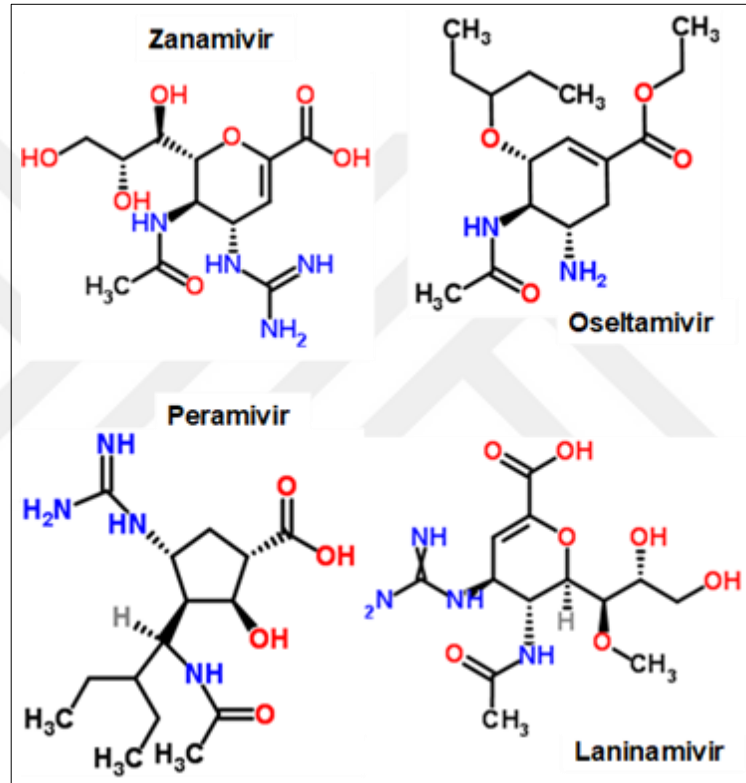


C



Şekil 5. İnfluenza A virüsü M2 kanal proteinini inhibe eden adamantan türevi amantadin ve rimantadinin molekül yapıları (A), Amantadinin bağlanması ile oluşan amantadin/ M2 protein kompleksi (B) ve adamantan türevi ilaçların virüsün hücre sitoplazmasında endozomdan serbestleşmesini bloke etme mekanizmaları (C).

İnfluenza virüslerine karşı kullanılan ve daha etkili olan ilaçlar, virüse ait NA enzimini bloke eden, buna bağlı olarak enfekte hücre membranında oluşan virüs partiküllerinin hücrelerden serbestleşmesini engelleyen moleküllerdir (Smith ve ark., 2001). Zanamivir, oseltamivir, peramivir ve laninamivir İnfluenza A ve B tipi virüslerin NA enzimini bloke eden yeni nesil antiviral ilaçlardır (Şekil 6). NA inhibitörleri yapısal olarak, virüsün HA proteini ile hücre yüzeyine tutunduğu glikoproteinlerin sialik asit (N-asetil nöraminik asit) bakiyelerine benzer moleküllerdir (Vavricka ve ark., 2011).



Şekil 6. İnfluenza virüslerine ait NA enzimini inhibe eden sialik asit analogu antiviral ilaçlar.

NA inhibitörleri hem İnfluenza A hem de İnfluenza B virüsleri üzerinde etkili olan ve tedavi amaçlı kullanılabilen ilaçlar olmakla birlikte, virüslerin NA enzimlerinde özellikle, sialik asite bağlanma bölgesinde meydana gelen amino asit değişiklikleri, bu ilaçlara karşı direnç gelişmesine neden olmaktadır (Moasser ve ark., 2019; Samson ve ark., 2013). NA enziminde Q136K, E119D ve H275Y pozisyonlarında meydana gelen amino asit değişmelerinin, bu ilaçlara karşı dirençli virüslerin ortaya çıkmasına neden olduğu görülmüştür (Kurebayashi ve ark., 2016; L'Huillier ve ark., 2015). Antiviral

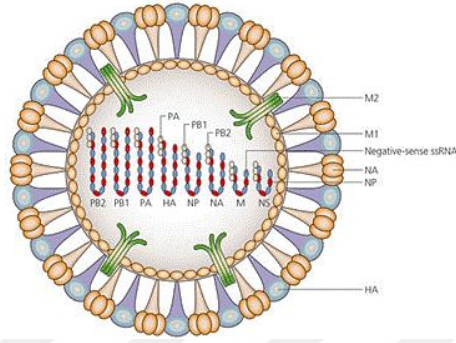
ilaçlara karşı hızlı gelişen direnç nedeniyle, yeni antiviral ilaçların geliştirilmesine yönelik çalışmalar aralıksız sürdürülmektedir. Bu bağlamda, NA dışında diğer viral proteinlerin ve virüs ile ilişkili olayların önemi artmaktadır. Moleküler düzeyde hücre-virüs ilişkisinin daha iyi aydınlatılması, influenza virüsleri ile mücadelede yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Bu tez çalışması kapsamında da, ökaryotik hücrelerde hücre içi iskelet yapısının temel bileşenlerinden olan ACTB proteini ile İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi arasındaki ilişki moleküler düzeyde araştırılmıştır.

4.2. İnfluenza A Virüslerinin Moleküler Yapısı

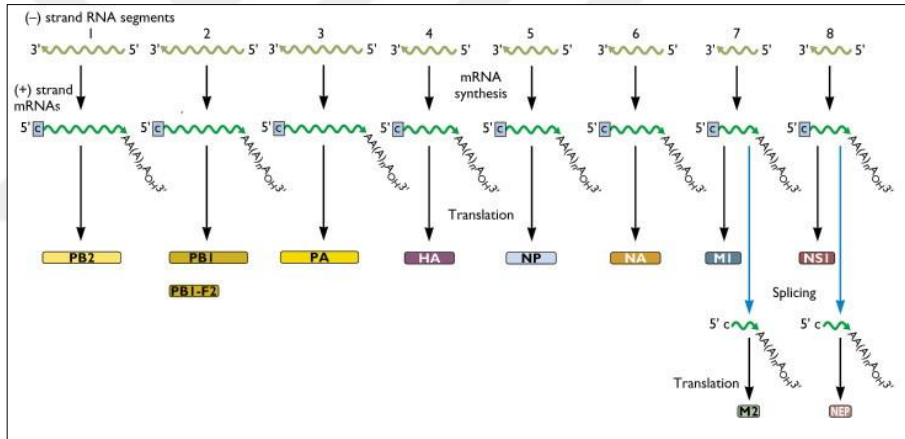
İnfluenza A virüsleri, nükleoproteinler (NP) ile ribonükleoprotein partikülleri halinde paketlenmiş olan 8 adet RNA molekülü (vRNP) ve onları çevreleyen bir membrandan oluşurlar (Bouvier ve Palese, 2008) (**Şekil 7A**). Sekiz segmentten oluşan viral genom üzerinden en az 11 protein sentez edilir (**Şekil 7B**). Viral genomu oluşturan en büyük üç RNA segmenti üzerinden viral RNA polimeraz enzimini oluşturan P proteinleri (PB2, PB1 ve PA) kodlanır. Viral RNA polimeraz hem viral RNA molekülünün replikasyonundan hem de viral mRNA'ların sentezinden sorumludur. Bu enzimi oluşturan proteinler, NP ve vRNA'ların oluşturduğu vRNP'lere bağlı olarak virüs partikülünde (virion) taşınır (Honda ve ark., 1990; Honda ve ark., 1988) (**Şekil 7C**). İnfluenza virüs genomunun 4.segmenti hemaglütinin (HA) yüzey antijen proteinini kodlar. Her bir virüs partikülünde ortalama 500 HA molekülü bulunmaktadır. HA proteinleri virüslerin konak hücre reseptörlerine tutunması ve sitoplazmada viral genomun serbest kalmasında işlev görürler. Virüsün 5.segmenti, viral RNA'lar ile kompleks oluşturan NP kodlar. Viral genomun büyüklük olarak 6.sırada yer alan RNA segmenti, virüsün ikinci önemli yüzey antijen proteini olan NA enzimini kodlamaktadır. NA virüslerin mukusla kaplı yüzey epitel hücrelerine ulaşmasını kolaylaştırırken, aynı zamanda enfekte hücrelerde serbestleşme aşamasında sialik asit bakiyelerini keserek hücre yüzeyinden ayrılmasını sağlamaktadır. Virüs partiküllerinde ortalama 100 NA molekülü yer almaktadır. Virüsün 7.segmenti üzerinden iki matriks proteini sentez edilir. Bunlar M1 ve M2 proteinleridir. M1 proteini virionda en fazla bulunan proteinlerden biridir. M1 proteinleri membranın hemen altında bir katman oluşturur. Her bir virüs partikülünde

ortalama 3000 M1 proteinin bulunduğu hesaplanmaktadır. M1 proteininin viral genlerin transkripsiyonunda regülasyonla ilgili bir işleve sahip olduğu düşünülmektedir (Bui ve ark., 2000). İyon kanalı işlevi gören M2 proteini ise virüs membranında yer alan üçüncü viral proteindir.

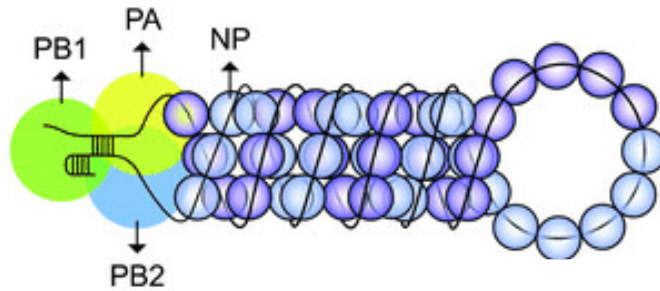
A



B



C

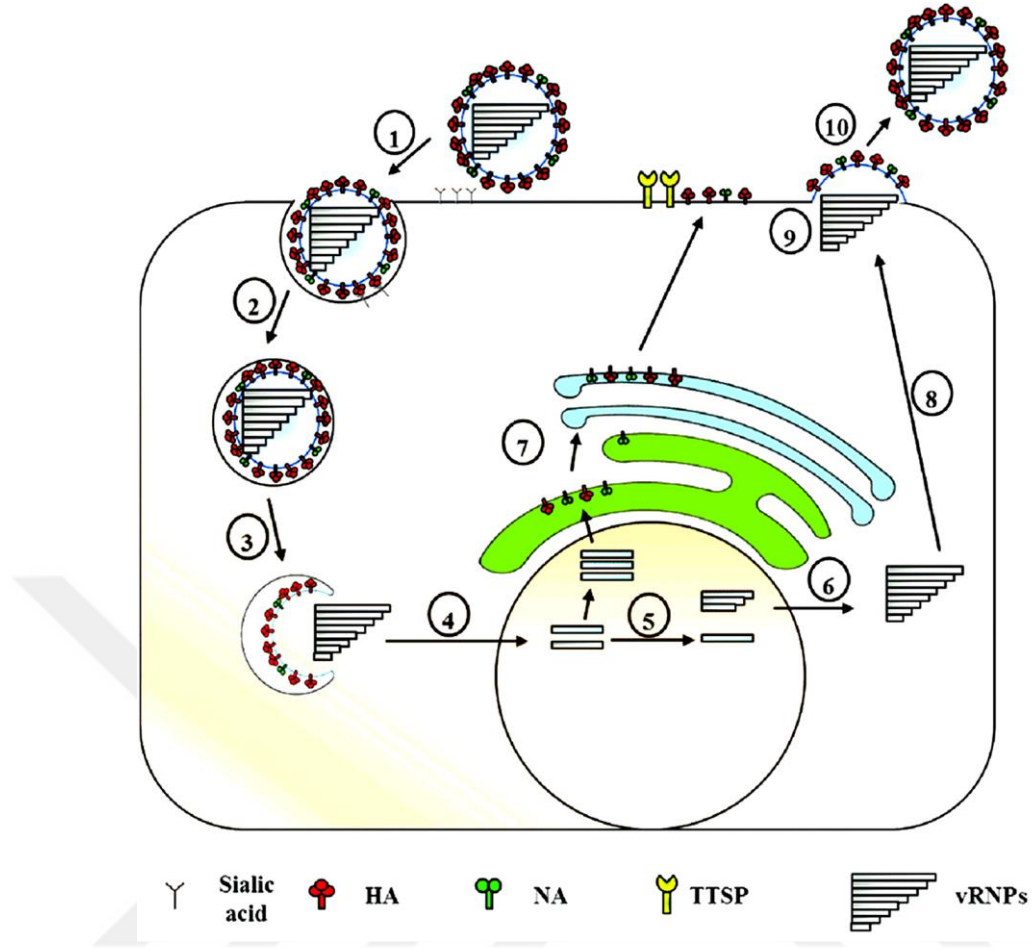


Şekil 7. İnfluenza A virüsü şematik görünümü (A) (Nelson ve Holmes, 2007), Viral genomu oluşturan RNA segmentleri ve bu segmentler üzerinden kodlanan proteinler (B) (<http://www.virology.ws/2009/05/01/influenza-virus-rna-genome/> - Erişim tarihi: 27.05.2019) ve vRNP'ler (C).

Bu protein endozom ve virüs membranlarının pH değişimine bağlı olarak füzyona uğraması ve bunun sonucunda vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasını sağlar (Grigoryan ve ark., 2011). İnfluenza A virüslerinin en küçük RNA segmenti olan 8.segment üzerinden de iki farklı yapısal olmayan protein sentez edilmektedir. Bunlar NS1 ve NS2 (NEP) proteinleridir (Lamb ve Choppin, 1979). İnfluenza A virüsü NS1 proteini, virüs partikülünde varlığı saptanamamış, yapısal olmayan (İng. Non-Structural;NS) bir proteindir (Basu ve ark., 2009). Virüs partikülünde az miktarda bulunan NS2 proteini ise M1 proteini ile birlikte vRNP'lerin transportunda işlev görür. Bu nedenle NEP (İng. nuclear export protein) olarak da adlandırılır (Kawaoka ve Neumann, 2012; Neumann ve ark., 2000).

4.3. İnfluenza A Virüsü Yaşam Döngüsü

İnfluenza virüslerin yaşam döngüsü, virüsün konak hücrelere tutunmasıyla başlar (adsorpsiyon). Virüsün adsorpsiyonu, viral HA molekülünün globüler yapıda olan eksternal uzantısındaki reseptör bağlanma bölgesi ile konak hücre membranında yer alan ve reseptör işlevi gören glikoproteinlerin sialik asit (N-acetyl neuraminic acid) bakiyelerine bağlanmasıyla gerçekleşir (Bouvier ve Palese, 2008; Carroll ve ark., 2014). Konak hücre yüzeyindeki adsorbe olan virüs reseptöre bağlı endositoz yoluyla hücre içerisine alınır (penetrasyon) (Us, 2010). Sitoplazmada endozom içerisinde hapsolan virüsün serbestleşmesi HA ve M2 proteinlerin işlevleri ile sağlanır. HA proteininin işlevini gerçekleştirmesi için endozom ve virionun iç pH değeri önem taşımaktadır. Düşük pH değeri HA molekülünde konformasyonel değişikliğe neden olur ve HA2 bölgesindeki hidrofobik füzyon peptidinin açığa çıkmasını sağlar. Bu şekilde aktifleşen füzyon peptidi viral membran ile endozomal membranın kaynaşmasına neden olur. M2 kanal proteininin bir işlevi sonucu pH değerindeki düşme viral proteinler (NP ve M1) arasındaki etkileşimi de bozar ve vRNP'lerin matriks proteininden serbest kalmasına yol açar. Bunun sonucu olarak vRNP'ler endozomdan kurtularak sitoplazmada serbest kalırlar (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza virüslerinin replikasyon ve transkripsiyonu, diğer birçok RNA virüsünün aksine hücrenin sitoplazmasında değil, hücre nükleusunda gerçekleşir (**Şekil 8**).



Şekil 8. İnfluenza virüsü yaşam döngüsü. 1. Adsorpsiyon, 2. Penetrasyon, 3. Serbestleşme (kot atma), 4. Hücre nükleusuna taşınma, 5. Transkripsiyon ve replikasyon, 6. vRNA'lerin sitoplazmaya taşınması, 7. Viral proteinlerin sentezi (translasyon), 8 ve 9. Kurulum, 10. Hücreden ayrılma (Zmora ve Pöhlmann, 2015).

Hücre sitoplazmasında serbest kalan vRNP'lerin hücre çekirdeğine taşınması, özel nüklear transport sinyalleri ile gerçekleşir. Nükleusa taşınan vRNP'ler üzerinden viral RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi ile iki farklı RNA sentezi gerçekleştirilir. Bu RNA'ların bir grubu viral proteinlerin sentezinde kullanılacak olan mRNA'dır. Diğer RNA molekülleri ise genomik viral RNA'ların (vRNA) sentezinde şablon görevi görecek olan komplementer RNA (cRNA)'lardır (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi PB2, PB1 ve PA proteinlerinin bir araya gelmesi ile oluşmuştur. Bu enzim kompleksi mRNA sentezi için konak hücrenin RNA polimeraz II enzimine gereksinim duyar. Viral RNA polimeraz enzimi, konak RNA polimeraz II enzim tarafından sentezlenmekte olan mRNA'ların 5'-ucundaki 7-metil

guanozin şapka yapısı ile birlikte 10-13 nukleotitlik bir bölgeyi kesip viral mRNA'ların sentezi için primer olarak kullanır. Bu durum İnfluenza virüslerini, kendi viral mRNA'larını sentez edebilmek için konak RNA polimeraz II enzimine bağımlı hale getirir (Mena ve ark., 1999; Plotch ve ark., 1981). Bu da İnfluenza virüslerinin replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinin konak hücre nükleusunda gerçekleşmesini gerektirir. İnfluenza virüsü vRNA'nın 5'-ucunda kodlanmaya katılmayan bölgesinde 5-7 adet urasil nukleotidinden oluşan poli-A sinyali bulunmaktadır. Bu dizi viral mRNA'lara poli-A kuyruğunun eklenmesine yardımcı olur. Bu şekilde 3'-poli-A kuyruğu ve 5'-CAP yapısı taşıyan viral mRNA'lar sitoplazmaya taşınır ve etkin bir şekilde translasyon mekanizmalarına katılarak viral protein sentezine olanak tanır (Bouvier ve Palese, 2008; Us, 2010). Virüs membranında yer alan, HA, NA yüzey antijen proteinleri ve M2 proteinlerinin sentezi endoplazmik retikulumla bağlı ribozomlarda gerçekleştirilir. Bu proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları ve enfekte hücrelerin membranlarına taşınması endoplazmik retikulumdan ve golgi kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. Viral membranda yer almayan PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri sitoplazmada serbest ribozomlar aracılığıyla sentez edildikten sonra nükleusa taşınarak negatif polarite gösteren genomik vRNA ipliklerinin sentezini sağlarlar ve vRNA'lar ile birlikte vRNP'lerini oluştururlar (Çıblak, 2011). Oluşan vRNP'lerin nükleustan sitoplazmaya taşınması NEP olarak da adlandırılan NS2 ve M1 proteinleri tarafından düzenlenir. M1 proteinleri hem viral RNA'lar hem de NP proteinleri ile etkileşim halindedir. M1 proteini de sitoplazmada sentezlendikten sonra nükleusa taşınır ve vRNP-NEP komplekslerinin hücre membranına yönlendirilmesine katkı sağlar. Enfekte hücre membranında vRNP'ler HA, NA ve M2 proteinleriyle bir araya gelerek virüsün kurulumunu gerçekleştirir (Palese P., 2007). Konak hücre yüzeyinde virionun tomurcuk şeklini alması, M1 matriks proteininin konak hücre sitoplazmik membranının altında birikmesiyle başlar. Tomurcuklanma işlevi tamamlandığında viral membran üzerindeki HA proteinleri virionların hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyelerine bağlanmasına sebep olmaktadır (Çıblak, 2011). Bu durum virionun serbest kalmasını güçleştirir. Bu aşamada viral membranda bulunan diğer bir protein olan NA enzimi, konak hücre membranındaki sialik asit bakiyelerini kesmekte ve HA'nın sialik aside yapışmasını önleyerek virüs partiküllerinin serbest kalmalarını sağlamaktadır (Çalışkan, 2011) (**Şekil 8**).

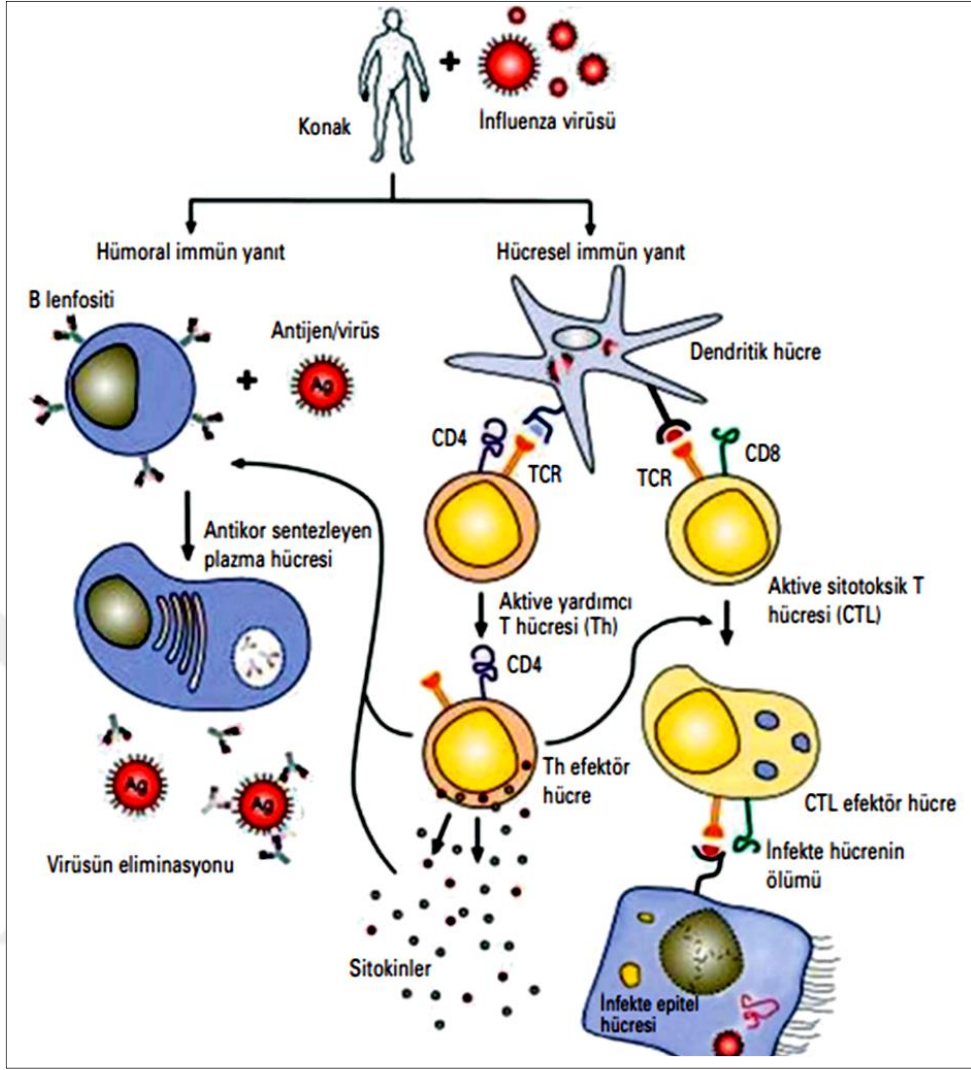
4.4. İnfluenza Patogenezi

İnfluenza virüsünün patojenitesini etkileyen faktörlerin bir kısmı konak hücre kaynaklı faktörlerdir (Fukuyama ve Kawaoka, 2011). Hücrelerde virüsler için uygun hedef reseptörlerin varlığı, virüsün hücre içine girişi ve replikasyonu için gerekli olan enzimlerin varlığı, viral replikasyon üzerinde etkili olan hücre içi protein faktörler, organizmanın bağışıklık sisteminin yetkinliği, organizmanın virüse karşı olan spesifik bağışıklıkları, bağışıklık sisteminin enflamatuvar yanıtı ile konak organizmada hasar oluşturmadan viral replikasyonunu kontrol edebilme yeteneği viral patogenezin seyrini belirleyen önemli hücresel faktörlerdir. Viral patogenezi belirleyen diğer önemli faktörler virüsün kendi yapısal ve işlevsel özellikleri ile ilgili faktörlerdir. Konak organizmada hedef hücelere bağlanma yeteneği, konak organizma dokularında ya da konaklar arasında yayılma yeteneği, bağışıklık sistemin kontrol mekanizmalarından kaçış için mutasyonlar ya da rekombinasyonlar ile antijenik varyasyonlar geliştirme yeteneği ve konak savunmasını zayıflatmak için immün yanıtı kontrol altına alabilme yeteneği viral patogenezi etkileyen faktörler arasında sayılabilir (Chen ve ark., 2018).

İnfluenza virüsünün insanlarda enfeksiyon için ana giriş yolu, solunum mukozasını oluşturan epitel hücreleridir. Bu hücreler genellikle virüslerin tutunması için gerekli olan fonksiyonel reseptör taşıyıcıları nedeniyle enfeksiyona duyarlıdır. Dolayısıyla, viral reseptörlerin yapısı enfeksiyon için önemli belirleyici unsurlardan biridir. Enfekte epitel hücrelerinde viral bileşenlerin çoğalması ve metabolik fonksiyonların işlemez hale gelmesi hücrelerin ölümüne neden olmakta ve çok sayıda yeni virüs partikülleri açığa çıkmaktadır. Solunum yolu epitel hücrelerinde yüksek titrelerde çoğalan virüsler, daha sonra alveoler makrofajları enfekte eder. Enfekte olan makrofajlarda apoptoz mekanizması tetiklenmektedir. Viral enfeksiyon sonucunda nekroz ya da apoptoz ile ölmeleri, organizmada bağışıklık sisteminin uyarılmasına ve sitokin / kemokinlerin üretimine neden olmaktadır. Bu olayların sonucunda salgılanan inflamatuvar mediyatörler, enfeksiyonun başlangıcından bir kaç gün içinde önce makrofaj ve nötrofillerin daha sonra da T-lenfositlerinin periferel kandan akciğer dokularına göçüne sebep olmaktadır (La Gruta ve ark., 2007). Enfeksiyonun erken evrelerinde doğal bağışıklık yanıt mekanizmaları (interferon-alfa/beta, doğal öldürücü

hücreler, nazal salgılardaki müsinler, kompleman sistemi, pulmoner sürfaktan proteinler ve serum mannoz bağlayan proteinler) etkindir.

İnfluenza virüslerine karşı kazanılmış bağışıklık yanıtı, 5-7 gün içerisinde ortaya çıkar. Viral enfeksiyon dendritik hücreler tarafından algılanır. Dendritik hücreler antijen sunan hücre olarak işlev görürler. İnfluenza virüsü için özgül olarak oluşan T lenfosit yanıtında, aktive olan CD4+ yardımcı T (Th1 ve Th2) lenfositleri salgıladıkları sitokinlerle (interlökin-2, interferon-gama) CD8+ sitotoksik T ve B lenfositlerini (IL-10, IL-4) aktive ederler. Sitotoksik T lenfositleri (CTL) virüs ile enfekte hücrelerin ortadan kalkmasını sağlayarak enfeksiyonun şiddetini ve komplikasyon gelişme riskini azaltırlar. Diğer taraftan, virüsün gerek yüzey antijenlerine (HA, NA) gerekse NP ve M1 proteinine karşı gelişen CTL yanıtı, virüsün farklı alt tiplerine karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir (Stambas ve ark., 2008) (Şekil 9).



Şekil 9. İnfluenza virüslerine karşı gelişen bağışıklık yanıtı mekanizmaları (Flint, 2004).

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

yanıtın en önemli hedefidir. HA glikoproteinine özgü oluşturulan antikorlar virüslerin hücre membranlarına tutunmasını zorlaştırır ve virüsün yayılmasını önlerler (Garulli ve Castrucci, 2009; Yang ve ark., 2002). Özellikle İnfluenza A virüslerinde gerek HA gerekse NA yüzey antijenlerinin çok sayıda alt tipinin olması kazanılmış bağışıklığın koruyucu etkisini sınırlar. Bu nedenle, farklı İnfluenza A alt tiplerinin HA ve NA glikoproteinlerinde korunmuş bölgelere karşı oluşturulan özgün nitelikli nötralize edici antikor varlığının saptanması, olası İnfluenza pandemilerden korunmada büyük önem taşıyacaktır (Ekiert ve ark., 2009) (Şekil 9).

4.5. İnfluenza Virüslerine Karşı Etkili Olan Hücre İçi Savunma Mekanizmaları

Omurgalı canlılarda doğal bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerden biri interferonlardır. İnterferonlar ilk kez 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından, İnfluenza virüsleri üzerinde yaptıkları çalışmalar sırasında keşfedilmiştir (Isaacs ve Lindenmann, 1987). İnterferon (IFN) ismi hücrelerde viral replikasyona müdahale etme (interfere) kelimesinden gelmektedir. Nagano ve Kojima tarafından yapılan çalışmalar, IFN sisteminin ayrıntılarıyla ilgili daha sonraki çalışmalara temel oluşturmuştur (Nagano ve Kojima, 1958). İnterferonlar, bazı virüs enfeksiyonlarında karşı antiviral cevap olarak konak hücreler tarafından sentez edilen ve salgılanan glikoprotein yapıda bir grup sinyal proteindir (Chelbi-Alix ve Wietzerbin, 2007; De Andrea ve ark., 2002). Bu glikoproteinler hücreler tarafından sadece virüslere karşı değil aynı zamanda diğer prokaryotik ya da ökaryotik patojenlere ya da tümör hücrelerine yanıt olarak da sentez edilirler. Bir enfeksiyon durumunda IFN'lar otokrin ve parakrin yollarla etki ederek enfekte hücrede veya interferon reseptörleri taşıyan komşu hücrelerde çeşitli savunma mekanizmalarını aktif hale getirerek patojenin yayılmasını engellerler (Bonjardim, 2005; Sen, 2001). IFN'lar genel olarak iki grup altında incelenirler. Bunlar Tip I ve Tip II interferonlardır. IFN- α , IFN- β ve IFN- ω Tip I interferonlar içerisinde sınıflandırılır (Liu, 2005). IFN- α lökositler, IFN- β ise fibroblast hücreleri tarafından sentez edilir ve salgılanır. Aynı grup içinde yer alan IFN- α , viral RNA veya DNA replikasyonunu durdurucu yönde etki gösterir ve edinsel bağışıklıkta epitop durumundaki antijenleri taşıyan MCH-I sınıfı genlerin anlatımını uyarırlar. IFN- β makrofaj hücreleri üzerinde etkilidir, NK hücrelerini aktive eder ve MCH-II anlatımını uyarırlar. Tip II IFN'lar immün IFN'lar olarak bilinir. IFN- γ bu

grup grubu içerisinde değerlendirilir. IFN- γ lenfositler tarafından üretilir ve salgılanır. IFN- γ makrofajlar üzerinde etkilidir, NK hücrelerini aktive eder. MCH-I ve MCH-II sınıfı genlerinin anlatımını uyarır. IFN- γ CD4+Th yardımcı hücreleri ve CD8+Tc hücreleri de aktive eder (Stinebring, 1974). Her iki grupta yer alan IFN'lar antiviral, antiproliferatif ve immün düzenleyici özelliklere sahiptir. Bununla birlikte özellikle viral IFN olarak bilinen Tip I IFN'lar virüs enfeksiyonlarında, Tip II IFN'lar ise mitojenik veya antijenik uyarıcılarla immün düzenleyici reaksiyonlarda etki göstermektedirler (Williams, 2002). İlgili hücrelerde sentezlenen ve salgılanan interferonlar parakrin veya otokrin yol ile hedef hücrelere sinyal iletirler (Bunn ve ark., 2012). Hücreler bu sinyallere yanıt olarak virüslerin replikasyonunu yavaşlatıcı ya da virüslerin replikasyonunu tamamen inhibe edici tepkiler ortaya koyar.

IFN'lar hedef hücre membranlarında yer alan reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler (Mogensen ve ark., 1999). Bu sinyal moleküllerin reseptörlerine bağlanması hücre içerisinde bir dizi reaksiyonun başlamasını neden olur (Samuel, 2001; Wagner, 1964). Tip I interferonlar, İnfluenza virüslerinin ve diğer birçok RNA virüslerinin replikasyonunu inhibe ederler. Bu işlevlerini hücrelerde 2'-5' oligoadenilat sentetaz, protein kinaz R (PKR) gibi enzimler ve çeşitli protein faktörlerin sentezini uyararak gerçekleştirirler (Chelbi-Alix ve Thang, 1986). RNA genomu taşıyan virüsler ile enfekte olan hücrelerde fazla miktarda çift zincirli RNA moleküllerinin oluşması IFN'ların sentezi için en önemli uyarıcı faktördür (Gowen ve ark., 2007). Buna yanıt olarak Tip I interferonların (IFN- α/β) sentezi gerçekleşir. İnterferonların uyarısı ile hedef hücrelerde RNA bağımlı Protein Kinaz (PKR) enzimi üretilmektedir (Thomis ve Samuel, 1993). İnsanda PKR enzimin karboksi-terminal bölgesi protein kinaza pro-apoptik bir özellik verirken, N-terminal bölgesi viral replikasyon ve gen ekspresyonları sonucu oluşan çift zincirli RNA'ya bağlanma işlevi görür. Viral enfeksiyonlarda PKR, çift zincirli RNA'ya bağlanarak dimerleşir ve buna bağlı olarak otofosforilasyon reaksiyonu sonucunda aktive olur. Aktive olan PKR, ökaryotik translasyon başlatıcı faktörünü (EIF2 α) fosforile eder. Fosforillenmiş EIF2 α , hücresel mRNA sentezini inhibe eder ve bu da viral protein sentezi olumsuz yönde etkiler (Galabru ve Hovanessian, 1987; Merrick, 1992). PKR'nin antiviral etkisinin yanı sıra hücre proliferasyonunun kontrolünde de rolü olduğu saptanmıştır.

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

Konak hücrelerin viral enfeksiyonlara karşı kendilerini savunmada sentez ettikleri bir diğer önemli protein grubu Mx proteinleridir (Weber ve ark., 2000). Mx proteinleri özellikle RNA virüsü ile enfekte hücrelerde IFN'ların uyarısı sonucunda üretilir. İnsan hücrelerinde IFN'ların uyarısı ile sentez edilen iki Mx proteini tanımlanmıştır. Bunlar MxA ve MxB proteinleridir. İnsan MxA ve MxB genlerinin her ikisi de 21. kromozomda lokalize olmuşlardır. Mx proteinlerinin sahip olduğu GTPase aktivitesi, antiviral aktiviteleri açısından gereklidir. Yapılan çalışmalarda MxA proteinlerinin İnfluenza virüsleri başta olmak üzere birçok RNA virüsü replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Turan ve ark., 2004).

Virüs enfeksiyonlara karşı immün yanıt oluşturmada görev yapan MHC-I ve MCH-II kompleks proteinleri de IFN'lar tarafından sentezi uyarılan antiviral proteinler arasındadır. Bu kompleks proteinler kazanılmış bağışıklıkta antijenlerin T lenfositlerce tanınmalarından sorumludurlar. Ekzojen antijenlerin tanınmasında MCH-II ve CD4 etkileşimi gerçekleşirken; endojen antijenlerin tanınmasında MCH-I ve CD8 etkileşimi gerçekleşmektedir (Waldburger ve ark., 2000; Yewdell ve Bennink, 1999).

4.6. Aktin Proteinleri

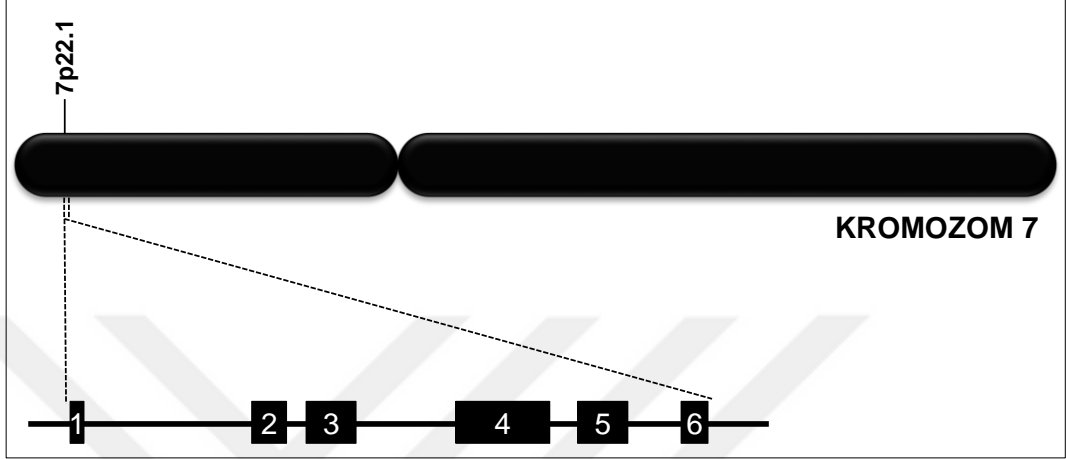
Aktin ökaryotik hücrelerde en bol miktarda bulunan proteindir. Aktin proteinleri evrimsel açıdan çok iyi korunmuş proteinlerdir (Hanukoglu ve ark., 1983). Bütün ökaryotik organizma hücreleri aktin proteinlerini ihtiva eder. Aktin proteinleri hücredeki toplam proteinlerin ortalama % 5 ile % 10'unu oluşturur (Cooper, 2000).

Aktin proteinleri, mayalar gibi daha basit yapıda ökaryotik organizmalarda sadece bir aktin geni tarafından kodlanırken, yüksek organizasyonlu ökaryotlarda bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır (Gunning ve ark., 2015). Bu nedenle yüksek organizasyonlu ökaryotik hücrelerde birden fazla varyantı bulunur. Memeli hücrelerinde en az 6 farklı aktin tipi tanımlanmıştır (Vandekerckhove ve Weber, 1978). Bu proteinler elektroforetik özelliklerine göre α , β ve γ olmak üzere üç farklı sınıf altında değerlendirilir (Rubenstein, 1990). Bunlardan aktin α proteinleri daha çok değişik kas tiplerinde bulunmaktadır. Aktin β (ACTB) ve γ proteinleri ise tüm hücrelerde bulunmaktadır (Vindin ve Gunning, 2013). ACTB proteinleri aktin filamentlerinin temel bileşenidir. Hücre sitoplazmasında lokalize olan ACTB aktin γ ile birlikte hücre iskeletini oluşturan mikrofilamentleri oluştururlar (Cooper, 2000). Canlı organizmalarda aktin, yapısal bir protein olmanın yanı sıra hücre hareketi, kas kasılması, hücre göçü, organellerin ve kromozomların transportu gibi olaylarda rol alır. Aktin hücrede ayrıca, hücre içi sinyal iletimi ve çeşitli maddelerin taşınması ile enzimatik etkinliğin düzenlenmesi gibi çok önemli görevler üstlenir (Dominguez ve Holmes, 2011; Drubin ve ark., 1993). Hücredeki işleyişe göre aktin molekülü sitoplazmadaki çeşitli proteinlerle etkileşime geçerek filament ağı, filament demetleri ya da filament iskeleti oluşturur (Janmey ve ark., 1992).

Bütün ökaryotik hücrelerde sentezlenen ACTB proteini, ortalama 42 kDa ağırlığında bir polipeptid zincirdir. Bu proteinin N-terminal ucu asidik aminoasitlerden oluşur. Aktin, hücrede aynı anda hem globüler aktin (G-aktin) olarak monomerik yapıda, hem de iplikli aktin (F-aktin) olarak polimerik yapıda bulunabilen tek proteindir. Hücrede biyolojik etkinliğe sahip olan aktin ise iplikli aktindir (Janmey ve ark., 1992). Aktin filamentinin birincil yapısı dört ayrı alt birimden oluşur. Birinci alt birim G-aktinin 1-32, 70-144, 338-375, ikincisi 33-69, üçüncüsü 145-180, 270-333 ve dördüncüsü 181-269 amino asitlerini kapsayan dizilerden oluşur (McLaughlin ve ark., 1993).

Bu tez çalışmasına konu olan insan ACTB proteinini kodlayan gen 7 no'lu kromozomda 7p22.1 bölgede yer almaktadır. Parçalı gen özelliği gösteren ACTB geni 6 ekzon ve 5 intron bölgesinden oluşur. ACTB geni 6 ekzon bölgesinden oluşup açık okuma çerçevesi 2.eksondan başlayıp ekson 6'da ise stop kodunu ile sonlanır

(Nakajima-Iijima ve ark., 1985) (**Şekil 10**). İnsan *ACTB* geni üzerinden ortalama 1.8 kb boyutunda bir RNA molekülü sentez edilir. Bu transkript üzerinden 374 amino asitten oluşan ortalama 42 kD ağırlığında *ACTB* proteini sentez edilmektedir (http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ACTB.html – Erişim tarihi: 27.10.2017).



Şekil 10. İnsan aktin β proteinini kodlayan genin ekzon-intron şematik gösterimi.

Aktin proteinlerinin yukarıda verilen doğal işlevlerinin yanı sıra, domuz rotavirusü (PoRV), Enterovirus 71 (EV71), insan immün yetmezliği virüsü tip 1 (HIV-1) ve coronavirus gibi virüslerin replikasyonları ile de ilişkili olduğu saptanmıştır (Kimura ve ark., 1996; Lui ve ark., 2013; Wang ve ark., 2009; Yuan ve ark., 2016). Bu tez çalışmasında da maya ikili hibrit metodu ile İnfluenza A virüsü PA proteini ile fiziksel ilişkisi saptanan insan *ACTB* proteininin, insan orijinli hücrelerde İnfluenza virüsü ile olası ilişkisi moleküler düzeyde araştırılmıştır.

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
Dekstroz	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit: EDTA	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Glukoz	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
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
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
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 hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletilediamin: TEMED	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
293fectin	Invitrogen, ABD
2-β-Merkaptoetanol (2-ME)	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Çalışma kapsamında oluşturulan vektörlerin, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak doğruluklarının kontrol edilmesinde *EcoRI*, *EcoRV*, *BamHI*, *DraIII* ve *Hind III* (MBI Fermentas ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleaz enzimlerinden yararlandı.

Gen klonlama çalışmalarının değişik aşamalarında, primerlerin fosforillenmesinde polinükleotit kinaz (New England Biolabs), ligasyon işleminde T4 DNA ligaz (TaKaRa, Japonya), plazmit DNA izolasyonlarında RNaz (Masherey Nagel, Almanya) enzimleri kullandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarında standart Taq DNA polimeraz (New England Biolabs, Biotechrabbit) enzimi ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 arke suşundan elde edilen, KOD-plus (Toyobo, Japonya) enzimi kullanıldı.

5.3. Ticari Kitler

Plazmit DNA'ların izolasyonunda orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen); PZR ile çoğaltılan DNA fragmentlerinin saflaştırılmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Western melezleme ve immünfloresan deneylerinde birincil antikor olarak, fare anti-HA (Millipore: 05-904; Santa Cruz: sc-7392), tavşan anti-NP ve/veya anti-PA [Dr. Atsushi Kawaguchi (Tsukuba Üniversitesi, Enfeksiyon Biyolojisi Laboratuvarı) tarafından verilmiştir] 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. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
CO2 etüv	Sanyo, Japonya
Çalkalayıcı su banyosu	GFL, Almanya
Derin Dondurucu (-80 °C)	Panasonic, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazları	Omnipage, İngiltere
Etüv	Memmert, Almanya
Floresan Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Hassas Terazî	Shimadzu, Japonya
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Mikrosantrifüj	Eppendorf, Almanya
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
pH metre	Hanna instruments, Portekiz

PZR Cihazları	ABI, ABD / Techne, İngiltere
Soğutmalı Sanrifüjler	Sigma, ABD /Backman, ABD
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Su banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
Ters/Inverted Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Tüp karıştırıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet, ABD

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Luria-Bertani (LB) besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya özütü ve 10 gr sodyum klorür distile su içerisinde çözdürülüp hacmi 1 litreye tamamlandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.6.2. Luria-Bertani agar (LBA) besiyeri

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

Hazırlanan LB ve LBA besiyerleri,1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20-25 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

Katı ya da sıvı besiyerlerine gerekli durumlarda otoklavlama işlemi sonrasında 100 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin eklendi.

5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde 1g/L konsantrasyonda glikoz içeren Dulbecco tarafından içeriği değiştirilen Eagle'ın minimal temel besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM) (Gibco, ABD) kullanıldı. Besiyeri 4x konsantre olacak şekilde hazırlandı. Bunun için 20 g toz haldeki DMEM, deiyonize distile su içerisinde çözdürülerek toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Hücreleri üretmek için kullanılan besiyeri, 125 ml 4x konsantre DMEM, 325 ml steril deiyonize distile su, 50 ml FCS (fetal calf serum) ve 5 ml 100x konsantre

penisilin/streptomisin (Gibco) karıştırılarak hazırlandı. Besiyerinin pH'sı 4-5 ml % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek 7.3-7.4'e ayarlandı.

5.7. Çözeltiler ve Tamponlar

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 içerisinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.44 µm filtreden geçirildi ve 4-8 °C'da saklandı.

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

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

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

25 g yağsız süt tozu, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS ve 1 ml % 10 sodyum azid (NaN₃) eklendi. Çözelti 4-8 °C'da saklandı.

5.7.4. Etidyum bromür (10 mg/ml)

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

5.7.5. %70 Etil alkol

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

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

18,61 g EDTA, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltiye pellet halde bulunan NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121 °C sıcaklıkta 20

dakika süreyle 1 atm. basınç altında otoklavlanarak steril edildi. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi (EDTA, Mw =292.24).

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

Kristal haldeki 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 4-8 °C'da 60 dakika bekletildi ve üstteki su fazı uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M tris-Cl tamponu (pH 8) ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık %90'ı uzaklaştırıldıktan sonra 4-8 °C'da saklandı. Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:I) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanılmak üzere 4-8 °C'da saklandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.7.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)

40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH₂PO₄ ve 21.6 g Na₂HPO₄.7H₂O, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan T-FTS 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Çalışmalarda 5x konsantre T-FTS steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında karıştırılarak kullanıldı.

5.7.9. Glikoz çözeltisi (1 M)

90 g glikoz, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam 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 su üzerine 29,56 g (25 ml) % 37'lik (a/a) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı (Hidroklorik asit, Mw=36.46; 1.186 g/ml).

5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2.5 M)

27.75 g kalsiyum klorür, 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika otoklavda tutularak 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 saf gliserin ile hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti karanlıkta -20°C'da saklandı.

5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0.55M)

54.4 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, Mw = 197.9).

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

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

5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi

3 g paraformaldehit, 80 ml distile su içinde 65 °C sıcaklıkta çözündürüldü. Üzerine 20 ml 5x konsantre T-FTS eklendi. Çözeltinin pH'sı (pH 7-7.5) pH indikatör kağıdı ile kontrol edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

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

30.2 g PIPES, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı NaOH ile 7.5'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözeltinin sterilizasyon işlemi otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak yapıldı ve sterilizasyon işlemi sonrasında çözelti oda sıcaklığında saklandı (PIPES, Mw = 302.37).

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

40 g PEG-4000, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtre ile filtre edildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

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

% 40 PEG-4000 çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

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

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

5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

29.44 g potasyum asetat (CH₃COOK) deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi. (CH₃COOK, Mw= 98.14).

5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2.5 M)

93.2 g potasyum klorür (KCl) deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi (Potasyum klorür (KCl, Mw= 74.55).

5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (% 7.5)

7.5 g NaHCO₃, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5.7.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)

5 gr sodyum deoksikolat (3α,12α-Dihidroksi-5β-kolanik asit sodyum tuzu) deiyonize distile su içinde çözündürülüp hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

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

10 g SDS, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. SDS çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 g sodyum hidroksit (NaOH), deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi. (NaOH, Mw=39.99).

5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2.5 M)

36.6 g sodyum klorür (NaCl), deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi (NaCl, Mw=58.5).

5.7.27. % 0.25 Tripsin çözeltisi

0.25 g tripsin, 100 ml T-FTS içerisinde çözündürüldü ve 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan çözelti 10 ml'lik hacimler halinde -20 °C derece sıcaklıkta muhafaza edildi.

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 (pH 8) karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi.

5.7.29. Tween-20 çözeltisi (%10)

5 g (4.5 ml) Tween-20, deiyonize distile su ile karıştırılarak hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Tween çözeltisi oda sıcaklığında muhafaza edildi (Tween-20 d=1.11g/ml).

5.7.30. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M Pipes, 2 ml 2.5 M CaCl₂ ve 20 ml 2.5 M KCl 150 ml deiyonize distile su ile karıştırıldı. Tamponun pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M MnCl₂ eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.2 µm'lik fitreden geçirilerek steril edildi.

5.7.31. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA, pH 8.0)

6.25 ml 1 M tris-Cl, 12.5 ml 1 M glikoz ve 5 ml 0.5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edildi.

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

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

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

150 ml 5 M potasyum asetat ve 28.75 ml glasiyel asetik asit deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Hazırlanan tampon 4 °C sıcaklıkta saklandı (CH₃COOK), Mw = 98.14).

5.7.34. 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. Hazırlanan 6x konsantre DNA yükleme tamponu -20 °C' da saklandı.

5.7.35. Hücre liziz tamponu

2.5 ml 1M tris-HCl (pH 8), 3 ml 2.5M NaCl ve 1 ml %10'luk NP 40 çözeltisi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Deneylerde gerekli durumlarda kullanımdan önce tampon çözeltisine 1 mM final konsantrasyon olacak şekilde 1M DTT eklendi.

5.7.36. 2x Konsantre NP-40 liziz tamponu

10 ml %10 NP-40 çözeltisi, 10 ml 0.5M tris-HCl tamponu (pH 8.0) ve 6 ml 2.5M sodyum klorür çözeltisi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.37. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH 6.8)

6.05 g tris ve 0.4 g SDS 80 ml deiyonize distile su içinde çözdürüldü, çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 6.8'e ayarlandı. Son hacim deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.38. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1.5 M tris, % 0.4 SDS, pH 8.8)

45.43 g tris ve 1 g SDS 200 ml deiyonize distile su içerisinde çözdürüldü ve çözeltinin pH'sı 3 N HCl ile 8.8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5.7.39. Poliakrilamid jel elektroforez tamponu (0.025 M tris, 0.25 M Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)

200 ml 5x konsantre tris glisin tamponu deiyonize distile su ile 990 ml'ye tamamlandı, üzerine 10 ml % 10'luk SDS çözeltisi eklendi.

5.7.40. Protein transfer tamponu

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

5.7.41. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0.2 M tris; %8 SDS – a/h; %0.2 bromofenol mavisi – a/h; %4 2-merkaptolanol – h/h; %40 gliserin – h/h; pH 6.8)

0.61 g tris, 2 g SDS ve 0.05 g bromofenol mavisi, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözdürüldü ve üzerine 1 ml 2-merkaptolanol ile 11.5 ml %87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 25 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 1ml porsiyonlar halinde 20 °C sıcaklıkta saklandı.

5.7.42. 2x Konsantre RIFA tamponu (50 mM tris, pH 8 ; 5 mM EDTA, pH 8 ; 150 mM NaCl; %1 NP-40, a/h ; %0.5 sodyum deoksikolat, a/h; %10 SDS, a/h)

2.5 ml 1M tris-HCl (pH 8.0), 0.5 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), 3 ml 2.5M sodyum klorür, 5 ml %10'luk NP-40, 0.5 ml % 10'luk SDS ve 2.5 ml %10'luk sodyum deoksikolat çözeltileri deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı.

5.7.43. Sodyum asetat tamponu (3M)

12.3 g sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözdürüldü. pH'sı 5.2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 50 ml'ye tamamlandı ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Mw:82.03).

5.7.44. 50x konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu

121 g tris deiyonize distile su içerisinde çözdürülerek hacmi 421.5 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 28.5 ml glasiyal asetik asit, 50 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) eklendi. Elektroforez tamponu olarak ya da agaroz jellerin hazırlanmasında 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

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

60.55 g tris 400 ml deiyonize distile su içerisinde çözdürüldü. 5 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Tris-HCl tamponun otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Tris, Mw=121.1).

5.7.46. Tris/EDTA (TE) tamponu (10 mM tris / 1 mM EDTA, pH 8.0)

2.5 ml 1 M tris-HCl tamponu (pH: 8.0) ve 0.5 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH 8.0) deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.47. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0.125 M tris, 1.25 M glisin, pH:8.3)

93.84 g glisin ve 15.15 g tris 800 ml deiyonize distile su içinde çözdürüldü. pH'sı 8.3'e ayarlandı. Tamponun son hacmi deiyonize distile su ile 1 litreye tamamlandı (Glisin, Mw=75.07).

5.7.48. 20x Konsantre TBS tamponu

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml tamamlandı. Tampon 121°C sıcaklıkta, 1 atmosfer basınç altında, 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.7.49. TBS ve TBS-T tamponu

TBS tamponu, 50 ml 20x konsantre TBS tamponu deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. TBS-T tamponu için ise, TBS tamponuna 10 ml %10 Triton X-100 eklendi.

5.8. Plazmit Vektörler

Çalışmada delesyonlu insan ACTB proteini kodlayan ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pCHA-ACTB plazmiti (TÜBİTAK Projesi/112S518/Yürütücü: Prof. Dr. Kadir Turan) kullanıldı. İnfluenza A virüsü PA proteinlerini kodlayan pCAGGS-PA, pCAGGS-nPA ve pCAGGS-cPA plazmitleri de 112S518 nolu proje kapsamından oluşturulan plazmitlerdir. Transfeksiyon koşullarının belirlenmesi ve normalizasyonunda pEGFP-N1 (Clontech, ABD) plazmitinden yararlanıldı.

5.9. Virüsler

Enfeksiyon gerektiren deneylerde insan tipi influenza A/WSN/33-H1N1 (WSN) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen-H5N2 (DkP) virüsleri kullanıldı.

5.10. Bakteriler

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında *E. coli* DH5 α ve Mach1 bakteri suşlarından yararlanıldı.

5.11. Memeli Hücre Hatları

Memeli hücrelerinde insan aktin beta proteininin influenza A virüsü polimeraz enzimi ile ilişkilerinin araştırılmasında insan orijinli 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. Diğer hücre hatlarına göre daha dayanıklı olmaları nedeniyle birçok araştırmada tercih nedeni olmuş ve günümüze kadar devamlılığı sağlanmıştır. HEK-293 hücreleri ise 1970'li yıllarda Graham ve Alex Van der Eb (Graham ve van der Eb, 1973) tarafından kültürlenmiştir. HEK293 hücreleri hızlı çoğalmaları ve DNA transfeksiyon etkinliğinin yüksek olması nedeniyle bilimsel araştırmalarda tercih edilen hücrelerdir.

5.12. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması

HeLa ve HEK293 hücreler 10 ml DMEM besiyeri içeren 10 cm'lik petri kutularında 37 °C'da , % 5 CO₂ ve % 95 nispi nem içeren CO₂'li etüvde üretildi ve 3-4 gün aralıklarla pasajları yapıldı. Doymuş kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve 37 °C'da 5-10 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler 5 ml besiyerinde pipetaj yapılarak süspansiyon edildi. 0.25-0.5 ml hücre süspansiyonu 10 ml taze besiyeri içeren petrilere aktarıldı ve CO₂'li etüv içerisinde üremeye bırakıldı.

5.13. Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada DNA moleküllerinin analizinde % 1'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. 1 g agar 100 ml 1x konsantre TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 60 -70 °C'a düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel katılaştıktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x konsantre yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit gerilim altında 20-30 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.14. Plazmit DNA'larının Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometrik yöntemlerden yararlandı. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri belirlendi ve aşağıda verilen formüller uygulanarak µg/ml olarak miktarları saptandı.

$$DNA \text{ konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \cdot D \cdot Kd$$

$$RNA \text{ konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = OD_{260} \cdot D \cdot Kr$$

[OD, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; Kd, (50 µg/ml); Kr, (40 µg/ml)].

DNA örneklerinin saflığı OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranından yararlanılarak saptandı. (Bu oran kaliteli DNA için ~1.8 ; RNA için ise ~2.0'dir).

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

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak E. coli DH5α ya da Mach1 suşu kullanıldı. Bu amaçla, -80°C' da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile steril koşullarda ekim yapıldı ve 37°C'da bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürden tek bir koloni alındı ve 5 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. Kültür 37°C'da 150 dev./dak. çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik doymuş kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23-25°C'da 150 dev./dak. çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültür, 600 nm dalga boyundaki optik değerleri (OD₆₀₀) ~0.25-0.3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4°C'da 10 dakika, 7.000 dev./dak. hızda santrifüj edilerek bakteriler çöktüldü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspansiyon edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 7.000 dev./dak. hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 700 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya doğrudan transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C' da saklandı (Inoue ve ark., 1990).

5.16. Delesyonlu *ACTB* Genleri Taşıyan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

İnsan aktin beta geni (*ACTB*), 6 ekzon ve 5 intron bölgesine sahip parçalı bir yapı göstermektedir. Tez çalışması kapsamında bu genin 2. ve 3. ekzon (Δ2-3) bölgesi; 3. ekzon (Δ3) bölgesi; 4. ekzon (Δ4) bölgesi; 5. ekzon (Δ5-6) bölgesi; 5. ve 6. ekzon (Δ6) bölgesi çıkartılarak, bu bölgeler bakımından delesyonlu *ACTB* proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörleri elde edildi. Bunun için terz (inverz) polimeraz zincir reaksiyonu tekniğinden yararlanıldı. PZR'nda kalıp DNA olarak, başka bir proje

(TÜBİTAK/112S518 - Yürüyücü: Prof. Dr. Kadir Turan) kapsamında oluşturulan pCHA-ACTB plazmit vektörü ve Tablo 1’de verilen oligonukleotit primerler kullanıldı. pCHA-ACTB plazmitinin, delesyona uğratılacak ekzon bölgesi/bölgeleri dışında kalan kısmı PZR ile çoğaltıldı.

Tablo 1. pCHA-ACTB plazmit vektörü üzerinden ters PZR tekniği ile belirli ekzon bölgelerini içermeyen delesyonlu gen taşıyan plazmit vektörlerin elde edilmesinde kullanılan oligonukleotit primerler.

<i>Primer Adı</i>	<i>Nükleotid Dizisi</i>
<i>pCA-TAG-For</i>	5'-TAGATATCTTAAGTGACTGAATTC-3'
<i>pCHA-Vec-Rev</i>	5'-GATATCACGCGTGGTGACC-3'
<i>ACT-Δex2/3-For</i>	5'-ATGATCATGTTTGAGACCTTCAACAC-3'
<i>ACT-Δex3-For</i>	5'-GGATCATGTTTGAGACCTTC-3'
<i>ACT-Δex3-Rev</i>	5'-CCTGGTGCCTGGGGCGC-3'
<i>ACT-Δex4-For</i>	5'-ATGGAGTCCTGTGGCATCC-3'
<i>ACT-Δex4-Rev</i>	5'-CTGGGTCATCTTCTCGCGG-3'
<i>ACT-Δex6-Rev</i>	5'-CTTGATCTTCATTGTGCTGG-3'
<i>ACT-Δex5/6-Rev</i>	5'-CCCAGGAAGGAAGGCTGG-3'

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

Reaksiyon Karışımı

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

Ters PZR 0.2 ml'lik plastik tüplerde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı. Reaksiyon koşulları, 97 °C'da 3 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, "95°C -20 sn" / "50-58°C arası- 20 sn" / "68°C- 6 dk" ve bir döngü 68 °C'da - 10 dk olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

<i>pCHA-ACTB (10 ng/ µl)</i>	: 2.0 µl
<i>Fosforillenmiş İleri/Geri Primer karışımı (5 pmol/ µl)</i>	: 4.0 µl
<i>dNTP karışımı (2,5 mM)</i>	: 4.0 µl
<i>MgSO₄ (25 mM)</i>	: 2.0 µl
<i>Tampon (x10)</i>	: 4.0 µl
<i>Deiyozize distile su</i>	: 23.25 µl
<i>KOD-plus (1U/µl)</i>	: 0.75 µl
<i>Toplam hacim</i>	: 40.0 µl

5.17. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Saflaştırılması

PZR ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 µl'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Ortam 14.000 dev./dak hızda, 20 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3M sodyum asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10-15 dakika buz üzerinde bekletildi. DNA molekülleri 4 °C'da 15 dakika 14.000 dev./dak hızda santrifüj edilerek çöktürüldü. DNA çöktürülmesi % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 20 µl TE tamponunda çözdürüldü. DNA örnekleri 5 µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırıldı ve % 1'lik agaroz jelle uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 25-30 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası beklenen boyutlardaki DNA bantları, UV ışık altında bir bistüri yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin agaroz jelden geri alınmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri üretici firma tarafından önerilen yöntemle uygun

olarak gerçekleştirildi. Küçük silika kolonlara bağlanan DNA molekülleri 30 µl TE tamponu ile geri kazanıldı ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.18. Ligasyon ve Transformasyon

Yukarıda (bkz. 5.16 ve 5.17) açıklandığı şekilde hazırlanan *ACTB* genine ait belirli ekzonları taşımayan fosforillenmiş doğrusal DNA fragmentleri kendi içlerinde ligasyona uğratarak halkasal şekle dönüştürüldü. DNA fragmentlerinin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 10 µl hacim içerisinde T4-DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 20 ng DNA fragmentine deiyonize distile su eklenerek 12.5 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 1.5 µl 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 1 µl (1U) T4 DNA ligaz (TaKaRa) eklendi. Ligasyon işlemi 15 °C'da 15-16 saat sürede gerçekleştirildi. Transformasyon için ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerine daha önce bölüm 5.15'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kompetent *E. coli* hücrelerinden 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 1 dakika 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl, antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37 °C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, pozitif transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden hazırlanan 5 ml sıvı kültürlerden küçük ölçekte plazmit DNA'lar izole edildi.

5.19. Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması

Transformasyon sonrası, her bir örnek için katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden 6 koloni, steril kürdan ile alınarak 5 µl deiyonize distile su içerisinde süspansiyon 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, 1 µl (10 pmol/ µl) hedef bölgesi cDNA içerisinde olan geri primer, 1 µl dNTP (2.5 mM), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 9 µl deiyonize distile su ve 0.2 µl Taq DNA polimeraz enzimi (5U/µl) eklendi. (Fazla sayıda örnekle çalışıldığı için örnek sayısı ile orantılı

olarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan her bir PZR tüpüne 15 µl eklendi). PZR koşulları 95 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 30 döngü, 95 °C-20 sn/ 53 °C-20 sn/ 72 °C-1 dakika olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.20. Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu

Koloni-PZR sonucunda pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 3 ml doymuş kültürler hazırlandı. Bunun için steril kürdan ile alınan koloniler 3 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve ortam 37 °C'da 120 dev./dak. çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doymuş kültürler 7.500 dev./dak. hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktüldü. Hücre çökeltisi, 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspanسیونuna taze hazırlanmış 300 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Parçalanmış hücrelerin üzerine 225 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10-15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genom DNA'ları, 4°C'da, 14.000 dev./dak. hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'ları içeren üst sıvı üzerine 2.5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20°C'da, 14.000 dev./dak. hızda 10 dakika santrifüj edilerek DNA çöktüldü. DNA çökeltisi 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandı ve kurutuldu. Kurutulduktan sonra 100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü (Maniatis ve ark., 1982). Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre seçilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek ikinci kez kontrolleri yapıldı. DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.21. Plazmit DNA'lar Restriksiyon Endonükleaz Enzimi İle Kesilerek Kontrol Edilmesi

Delesyonlu *ACTB* geni taşıyan plazmitlerin tümü pCHA-ACTB plazmitinden türetildiği için sadece *EcoRI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek kontrol edildi. Küçük ölçekte hazırlanan DNA örneklerini *EcoRI* enzimi ile kesmek için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımları 37 °C'da 1-2 saat

su banyosunda bekletildi. Daha sonra örneklere 5 µl 6x konsantre DNA jel yükleme tamponu eklendi ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Reaksiyon Karışımı

<i>Plazmit DNA (100-200 ng µl)</i>	: 3.0 µl
<i>EcoRI reaksiyon tamponu (x10)</i>	: 2.0 µl
<i>Deiyonize distile su</i>	: 14.2 µl
<i>RNaz (10 µg µl)</i>	: 0.5 µl
<i>EcoRI (10U/µl)</i>	: 0.3 µl
<i>Toplam hacim</i>	: 20 µl

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

Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrulukları gösterilen plazmit DNA'ları PEG/NaCl ile çöktürme yöntemiyle kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizine tabi tutuldu. TE tamponu içerisinde çözündürülen DNA örneklerinin üzerine 4 hacim PEG (%20-a/h)/NaCl (1.25M) çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda 4 °C'da 16.000 dev./dak. hızda, 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve çökelti 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandı. DNA çökeltileri kurutuldu ve 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için hizmet alınmasına gidildi.

5.23. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri ile *ACTB* geni içerisinde delesyona uğratılan ekzon bölgelerinin doğruluğu kesinleştirilen plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı ve memeli hücrelerine transfekte edilebilecek kalitede saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler bölüm 5.15'de anlatıldığı şekilde kompetent hale getirilen *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece üretilerek doymuş ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml ampisilin içeren taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 120 dev./dak. çalkalanma hızında 14-16 saat süreyle üretildi. Hazırlanan kültürler plazmit DNA izolasyonunda kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonunda Qiagen

orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA örnekleri 500-750 µl TE tamponunda çözdürüldü. DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi, bölüm 5.14'de anlatıldığı gibi 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Elde edilen plazmit vektörler *EcoRI* restriksiyon enzimi ile yeniden kesilerek kontrol edildi ve -20 °C'da saklandı.

5.24. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu

ACTB ve delesyonlu *ACTB* geni taşıyan plazmitler ve pEGFP-N1 plazmiti, deneyin amacına göre HEK293 veya HeLa hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyon için kationik bir polimer olan polietilenimin (PEI) kullanıldı (Longo ve ark., 2013). Hücreler deneyin amacına göre 12-kuyulu ($2-5 \times 10^5$ hücre/kuyu) veya 6-kuyulu ($5-10 \times 10^5$ hücre/kuyu) plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında (37 °C - %5 CO₂ - %95 nispi nem) 16-24 saat süre ile üremeye bırakıldı. Transfeksiyon deneylerinde 12-kuyulu plaklar için 1.5-2 µg; 6-kuyulu plaklar için ise 2-3 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'lar 20 ng/µl olacak şekilde OPTI-MEM (Gibco, ABD) içerisinde sulandırıldı. PEI ile transfeksiyon için optimal koşulları belirlemek amacıyla farklı oranlarda DNA/PEI (DNA/PEI oranları: 1/1-5) karışımları denendi. Optimizasyon deneylerde canlı hücrelerde izlenebilen yeşil floresan proteini kodlayan pEGFP-N1 plazmitinden yararlanıldı. Plazmit DNA'ları 20 ng/µl konsantrasyonda OPTI-MEM içerisinde sulandırıldı ve yine OPTI-MEM içerisinde sulandırılarak hazırlanan farklı konsantrasyonlarda PEI çözeltileri ile eşit hacimlerde karıştırıldı. Örnekler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra hücre kültürlerine eklendi. Kültürler standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyondan 6-8 saat sonra kültürlerin besiyerleri değiştirildi ve inkübasyona devam edildi. Transfeksiyondan 44-48 saat sonra hücreler deneyin amacına göre kullanıldı.

5.25. Plazmit Vektörler Üzerinden Kodlanan ACTB Proteinlerinin ve Viral Proteinlerin Western Melezleme Yöntemi ile Analizi

pCHA plazmit vektöründe yer alan *ACTB* ve delesyonlu *ACTB* genlerinin ekspresyon yapıp yapmadığı, sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile incelendi. Bu amaçla plazmitler ile transfekte edilen HEK-293 hücrelerden

hazırlanan proteinler, SDS-PAGE ile ayrıştırıldı ve aktin proteinleri Western melezleme ile analiz edildi.

5.25.1. Plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarının hazırlanması

HEK293 hücreleri D'MEM içeren 12 kuyulu plaklara (2.0×10^5 /kuyu) ekildi ve 24 saat inkübasyondan sonra, her bir kuyudaki hücreler 2 µg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi (bkz. 5.24). 48 saat süre ile standart kültür koşullarında inkübe edildikten sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Hücreler bir kez T-FTS ile yıkandı ve her bir kuyudaki hücreler 250 µl 1x konsantre protein yükleme tamponunda bir silikon sıyrıcı yardımıyla toplandı. Toplanan hücre lizatları 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi ve -20 °C'da saklandı.

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, 50 µl APS (%10 – w/v) ve 25 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 500 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra jel yüzeyindeki su uzaklaştırıldı % 5'lik akrilamid içeren 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 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 protein örnekleri 5 dakika kaynar suda bekletildi. Örnekler, 5-10 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi, poliakrilamid tris-glisin tamponu ile dolu tank içerisinde ilk 20 dakika 40 volt/kaset, daha sonra 80 volt/kaset 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 dakika 45 voltta ve 90 dakika 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

5.25.4. Membran üzerinde proteinlerin görüntülenmesi

Protein transferi işleminden sonra nitrosellüloz membranlar, antikorların olası özgün olmayan bağlanmalarını önlemek için 1-2 saat bloklama çözeltisinde bekletildi. Daha sonra membranlar bir gece boyunca, bloklama çözeltisinde 1/1000 oranlarında sulandırılan primer antikor etkisinde bırakıldı. Primer antikor olarak pCHA plazmit vektöründe klonlanan dolayısıyla HA uzantısı taşıyan ACTB proteinleri kodlayan genlerin analizinde, fare orijinli monoklonal anti-HA antikorları (Millipore, 05-904), tavşan poliklonal anti-PA (MyBioSource) ve tavşan orijinli anti NS2 (Invitrogen) antikorları kullanıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar bir kez 20 dakika TBS-T, iki kez 20 dakika TBS ile yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra 30 dakika 1/3000 oranında TBS içerisinde sulandırılarak hazırlanan keçi anti-fare IgG-HRP antikorları (Invitrogen / Thermo: 31420) ya da anti-tavşan IgG-HRP antikorları (Invitrogen / Thermo: 31423) ile işleme kondu. Sekonder antikor kalıntılarını uzaklaştırmak için membranlar 20 dakika 1 kez TBS-T, 2 kez TBS ile yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (H&C, RPN2232) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntüledi.

5.26. ACTB Proteinlerinin Hücre İçerisinde Lokalizasyonlarının İmmüfloresan Yöntemle İncelenmesi

Ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarının saptanmasında HeLa hücreleri kullanıldı. HeLa hücreleri 12-kuyulu plaklarda ($2-3 \times 10^5$ hücre/kuyu) 9 mm çapında yuvarlak lameller üzerinde standart kültür koşullarında 24 saat üretildi. Daha sonra hücreler bölüm 5.24’de verildiği gibi PEI kullanılarak plazmit DNA’lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 44-48 saat sonra hücreler fikse edilerek ACTB proteinleri için immüfloresan yöntem

ile analiz edildi. Lameller üzerinde üretilen transfekte hücreler T-FTS ile 2 kez 10'ar dakika yıkandı ve sonra %3 paraformaldehit içerisinde 20 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon işleminin sonunda hücreler T-FTS ile 1 kez yıkandı ve 10 dakika oda sıcaklığında % 0.1'lik NP-40 etkisinde bırakılarak hücre zarları geçirgen hale getirildi. Daha sonra istenmeyen antikör bağlanmalarını en aza indirmek için hücreler %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda hücreler %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1/250-1/500 oranında seyreltilerek hazırlanan primer antikörler ile 1 saat muamele edildi. Hücreler 3'er kez 15 dakika boyunca T-FTS ile yıkandı ve tekrar 20 dakika %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde bekletildi. Primer antikörler ile işlem gören hücreler 1/300 oranında %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde seyreltilen Alexa-488 konjuge anti mouse IgG (Abcam:ab150117) ve/veya Alexa-568 konjuge anti tavşan IgG antikoru (Abcam: ab175471) ile 1 saat muamele edildi. Hücre nükleuslarının görüntülenebilmesi için antikör çözeltilerine 1/2000 oranında DAPI eklendi. Hücreler T-FTS ile 3 kez tekrar 15'er dakika yıkandı. Lameller temiz lamalar üzerine damlatılan 2-3 µl kapatma solüsyonu üzerine kapatıldı ve çevrelerine şeffaf oje sürüldü. Hazırlanan hücre preparatları DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

5.27. ACTB Proteinleri ile İnfluenza PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması

Memeli hücrelerinde influenza PA proteini ile ACTB proteinleri arasındaki olası etkileşimleri immünfloresan teknikler ve birlikte immün çöktürme (İng. co-immunoprecipitation) yöntemleri ile test edildi.

5.27.1. İmmünfloresan teknikler ile PA proteini ve ACTB proteinleri arasındaki ilişkinin aktarılması

12-kuyulu plaklarda ($2-3 \times 10^5$ hücre/kuyu) 9 mm çapında yuvarlak lameller üzerinde 24 saat üretilen HeLa hücreleri PA proteini ve ACTB proteinleri kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi (bkz. 5.24). Transfeksiyondan 44-48 saat sonra hücreler fikse edilerek bölüm 5.26'da anlatıldığı gibi ikili antikörler (primer antikörler: anti-HA/anti-PA; sekonder antikörler: fare IgG-Alexa-488/tavşan IgG-Alexa-568)

kullanılarak PA ve ACTB proteinleri işaretlendi ve DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskop ile görüntülendi.

5.27.2. Birlikte immün çöktürme

Proteinlerin işlevlerinin ve farklı proteinler ile ilişkilerinin saptanmasında izlenen önemli biyokimyasal yöntemlerden biri özgün antikorlar kullanarak proteinleri birlikte çöktürme yöntemidir. Bu çalışmada HA uzantılı ACTB proteinlerini ve influenza virüsü PA proteinini kodlayan plazmit DNA'ları 6-kuyulu plaklarda çoğaltılan HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-45 saat sonra hücreler, bir kez T-FTS ile yıkandı. Her bir kuyudaki hücelere 500 µl T-FTS içinde hazırlanmış 2 mM konsantrasyonunda DSP çözeltisi eklendi ve 4 °C'da 1 saat bekletildi. Daha sonra DSP'yi etkisizleştirmek için ortama 50 µl 1M Glisin eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Hücreler 500 µl RIFA tamponunda bir silikon sıyrıcı yardımıyla hücreler toplandı. Hücre lizatları 15-20 dakika -80 °C donduruldu ve 37 °C su banyosunda çözündürüldü. Dondurma-çözme işlemi 4 kez daha tekrarlandı. Lizatları 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 4°C'da 15.000 dev./dak. hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar immün çöktürme işleminde kullanıldı. Bunun için 250-500 µl hücre lizatına 2-4 µl fare anti-HA antikorunu eklendi ve ortam 4°C da 1 saat boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Daha sonra hücre lizatına 15-30 µl protein A-sepharose süspansiyonu eklendi ve 4°C da bir gece boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Sonrasında örnekler 3000 dev./dak. hızda 2 dakika santrifüj edilerek protein A-sepharose boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti 500 µl yıkama tamponunda (150 mM NaCl, 50 mM tris, 1 mM DTT, pH 8) süspansiyon edildi ve 10 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Örnekler tekrar santrifüj edilerek protein A-sepharose boncuklar çöktürüldü. Yıkama işlemi 2 kez daha tekrar edildi. Yıkama işlemleri sonrasında elde edilen çökeltiler 30-60 µl x2 konsantre protein yükleme tamponunda süspansiyon edildi ve kaynar suda 5 dakika bekletilerek boncuklara bağlı proteinler denatüre edildi. Hazırlanan protein örnekleri SDS-PAGE ile ayrıştırıldı; ACTB proteinleri ve influenza PA proteini için Western melezleme tekniği ile analiz edildi.

5.28. ACTB Proteinlerinin Aşırı Ekspresyonlarının İnfluenza Virüs Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması

HEK293 hücrelerinde ACTB ve delesyonlu ACTB protein miktarları bu proteinleri kodlayan plazmitlerin geçici transfeksiyonu ile yapay olarak arttırıldı. Bunun için 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler ($2-3 \times 10^5$ hücre/kuyu) bölüm 5.24'te anlatıldığı şekilde 2 µg plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen DMEM (DMEM-) besiyeri ile iki kez yıkandı. Hücrelere %1 BSA içerisinde 1-2 moi (*İng. multiplicity of infection*) titresinde olacak şekilde seyreltilen A/WSN/33-H1N1 ve influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüsleri ile enfekte edildi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da virüslerin tutunması için bekletildi. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve ortama 2 ml DMEM besiyeri eklendi ve CO₂-etüvde 37 °C'da inkübe edildi. Virüsler ile enfeksiyondan 8 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl protein yükleme tamponunda toplandı. Hücre lizatları 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi ve kaynar suda 5 dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. Lizatlardaki endojen ACTB proteinleri, plazmit vektörler üzerinden sentez edilen HA uzantılı aktin proteinleri ve viral proteinler (PA, NP ve/veya NS1) yukarıda anlatıldığı şekilde (bkz. 5.25) SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-aktin, fare monoklonal anti-HA ve tavşan poliklonal antikorlar (anti-PA, anti-NP ve anti-NS1) antikorları kullanıldı. Deney sonucu elde edilen veriler üzerinde viral ve hücresel proteinlerin bant yoğunlukları karşılaştırılarak sonuca gidildi.

6. BULGULAR

ACTB proteinleri farklı organizma türlerinde evrimsel olarak en iyi korunan proteinlerden biridir. ACTB protein globuler aktin (g aktin) ile birlikte, sitoplazmik iskeleti oluşturan mikrofilamentlerin bir bileşenidir. Bu proteinler organellerin ve kromozomların taşınmasında ve hücre hareketlerinde işlev görürler (Fletcher ve Mullins, 2010). Maya ikili hibrit metodu ile yapılan çalışmalarda ACTB proteinin influenza A virüsü PA proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (TÜBİTAK projesi: 112S518 / Yürütücü: Prof. Dr. Kadir Turan). Bununla birlikte bu proteinin influenza A virüsü replikasyonundaki rolü bilinmemektedir. Bu çalışma da memeli hücrelerinde ACTB proteini ile influenza A virüsü PA proteini arasındaki ilişki araştırıldı. Bunun için insan HA uzantılı ACTB proteini ve delesyonlu ACTB proteinlerini kodlayan ekspresyon vektörleri oluşturuldu. Bu vektörler üzerinden sentez edilen proteinlerin insan orijinli hücrelerde influenza PA proteini ile etkileşimi, immünfloresan teknikler ve birlikte immün çöktürme teknikleri ile analiz edildi. Bu bağlamda yapılan çalışmalar sonucunda aşağıda verilen bulgular elde edildi.

6.1. İnsan ACTB Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

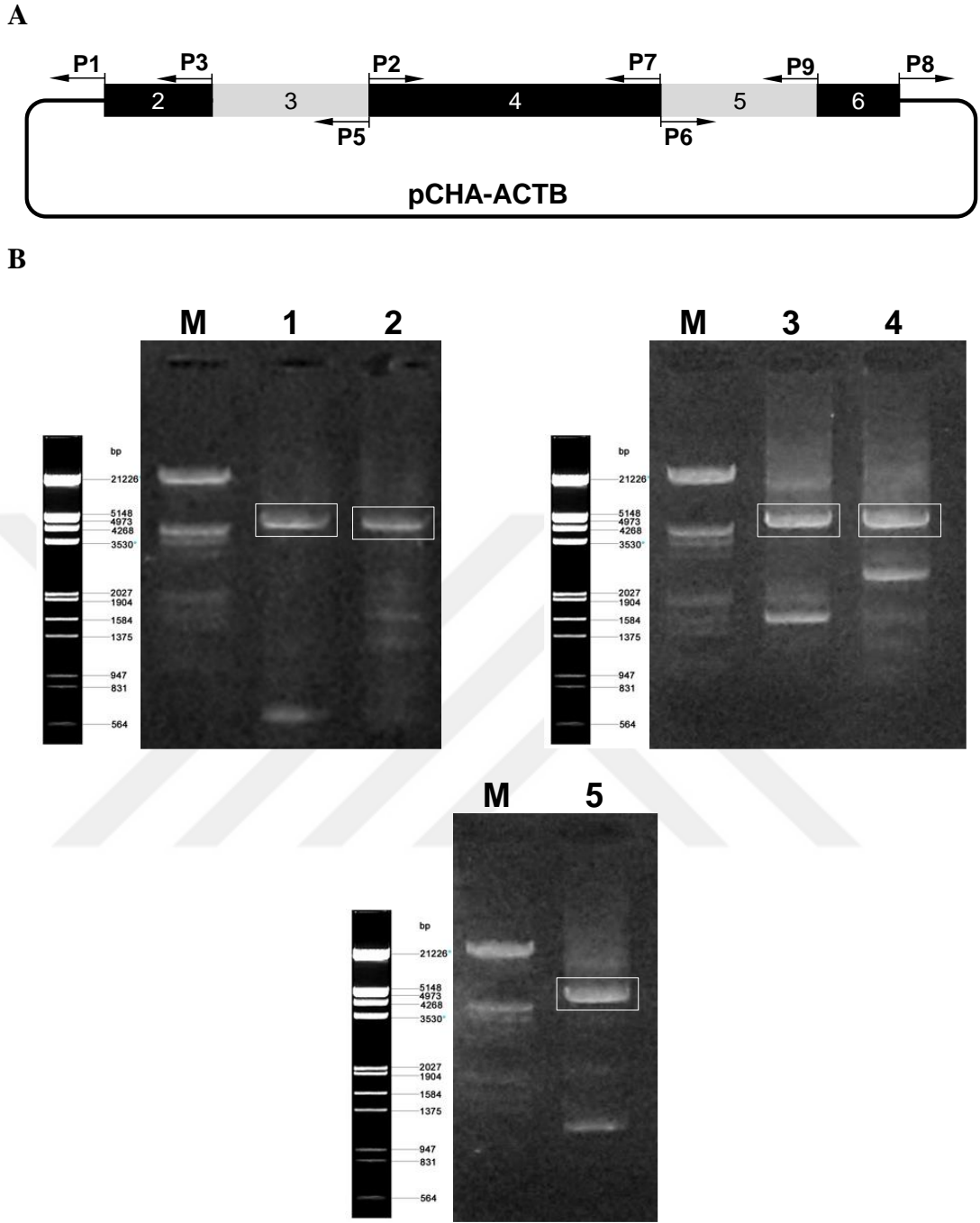
Genel bilgiler bölümünde belirtildiği gibi insan *ACTB* geni 6 ekzon ve beş introndan oluşan parçalı bir genidir (Şekil 10). Bu gen üzerinden kodlanan mRNA'nın DNA kopyası (cDNA)'nın, pCHA-ACTB plazmit vektörüne klonlanmış haldeki dizisi aşağıda verilmiştir (küçük harfler ile verilen diziler *ACTB* genine sınır vektör bölgelerini göstermektedir).

pCHA-ACTB plazmit vektörüne klonlanan insan *ACTB* geninin nukleotit dizisi:

```
nnnnaacgtgctggttgttgctgtctcatcattttggcaaagaattcctcgagc  
cgccatgtaccatacgatgttccagattacgctagcttgggtgggtccggtcaccac  
gcgtgatatc ATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTTCGACAACGGCTCCGGCAT  
GTGCAAGGCCGGCTTCGCGGGCGACGATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGT  
GGGGCGCCCCAGGCACCAGGGCGTGATGGTGGGCATGGGTGAGAAGGATTCCCTATGT  
GGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCACCTGAAGTACCCCATCGAGCA  
CGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCTACAA  
TGAGCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAGACCCCGTGCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAA  
CCCCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGACCCGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCC
```

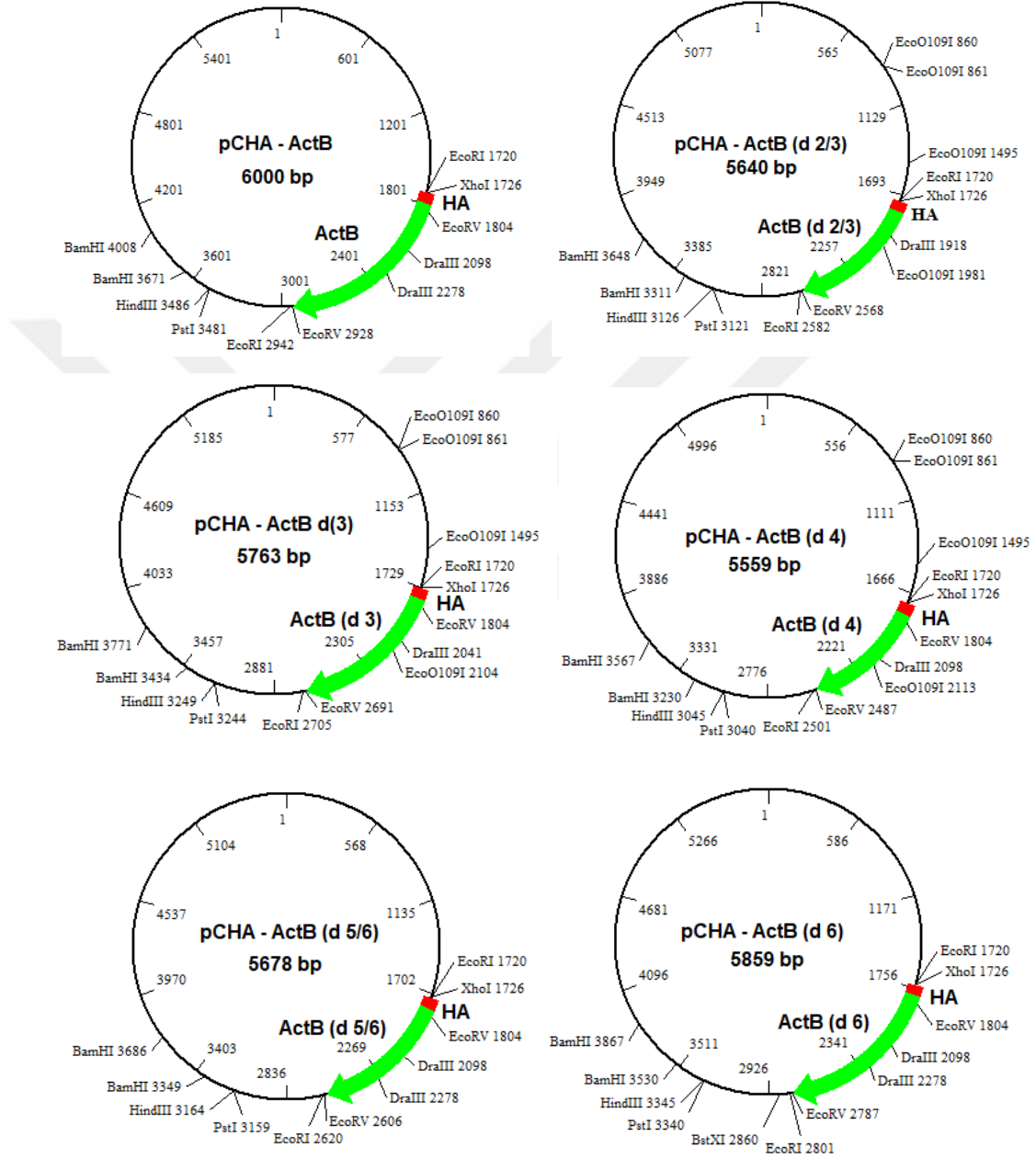
AGCCATGTACGTTGCTATCCAGGCTGTGCTATCCCTGTACGCCTCTGGCCGTACCAC
TGGCATCGTGATGGACTCCGGTGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTACGAGGG
GTATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTGACTGA
CTACCTCATGAAGATCCTCACCGAGCGCGGCTACAGCTTCACCACCACGGCCGAGCG
GGAAATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCA
AGAGATGGCCACGGCTGCTTCCAGCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTGA
CGGCCAGGTCATCACCATTTGGCAATGAGCGGTTCCGCTGCCCTGAGGCACTCTTCCA
GCCTTCCTTCCTGGG *CATGGAGTCCTGTGGCATCCACGAAACTACCTTCAACTCCAT*
CATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCTGG
CGGCACCACCATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCT
GGCACCCAGCACAAATGAAGATCAAG **ATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGT**
GTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAG
CAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCTCCATCGTCCACCGCAAATGCTTCTAG at
atcttaagtgactgaattcactcctcaggtgcaggctgcctatcagaaggtggtggc
tggtgtggccaatgccctggctcacaataactgagatctttttnnnnnnn

Bu dizi üzerinden ters PZR ile 2. ve 3. ekzonları delesyonlu *ACTB* geni taşıyan vektör (pCHA- Δ ACTB Δ 2-3) oluşturmak için Act- Δ ex2-3-For (P2) / pCHA-Vec-Rev (P1); 3. ekzonu delesyonlu *ACTB* geni taşıyan vektör (pCHA- Δ ACTB Δ 3) oluşturmak için Act- Δ ex2-3-For (P2) / Act- Δ ex3-Rev (P3); 4. ekzonu delesyonlu *ACTB* geni taşıyan vektör (pCHA- Δ ACTB Δ 4) oluşturmak için Act- Δ ex4-For (P6) / Act- Δ ex4-Rev (P5); 5. ve 6. ekzonları delesyonlu *ACTB* geni taşıyan vektör (pCHA- Δ ACTB Δ 5-6) oluşturmak için pCA-TAG-For (P8) / Act- Δ ex5-6-Rev (P7); 6. ekzonu delesyonlu *ACTB* geni taşıyan vektör (pCHA- Δ ACTB Δ 6) oluşturmak için ise pCA-TAG-For (P8) / Act- Δ ex6-Rev (P9) primer çiftleri kullanıldı. Ters PZR'da kullanılan primerlerin pozisyonları ve reaksiyon sonucu elde edilen delesyonlu DNA fragmentlerinin agaroz jel elektroforezi sonuçları **Şekil 11**'de verildi. Elektroforez sonuçları, PZR ile sentez edilen fragmentlerin beklenen boyutlarda olduğunu gösterdi: pCHA- Δ ACTB Δ 2-3/ 5,6 kbç; pCHA- Δ ACTB Δ 3/5,8 kbç; pCHA- Δ ACTB Δ 4/5,6 kbç; pCHA- Δ ACTB Δ 5-6/5,7 kbç; pCHA- Δ ACTB Δ 6/5,9 kbç.



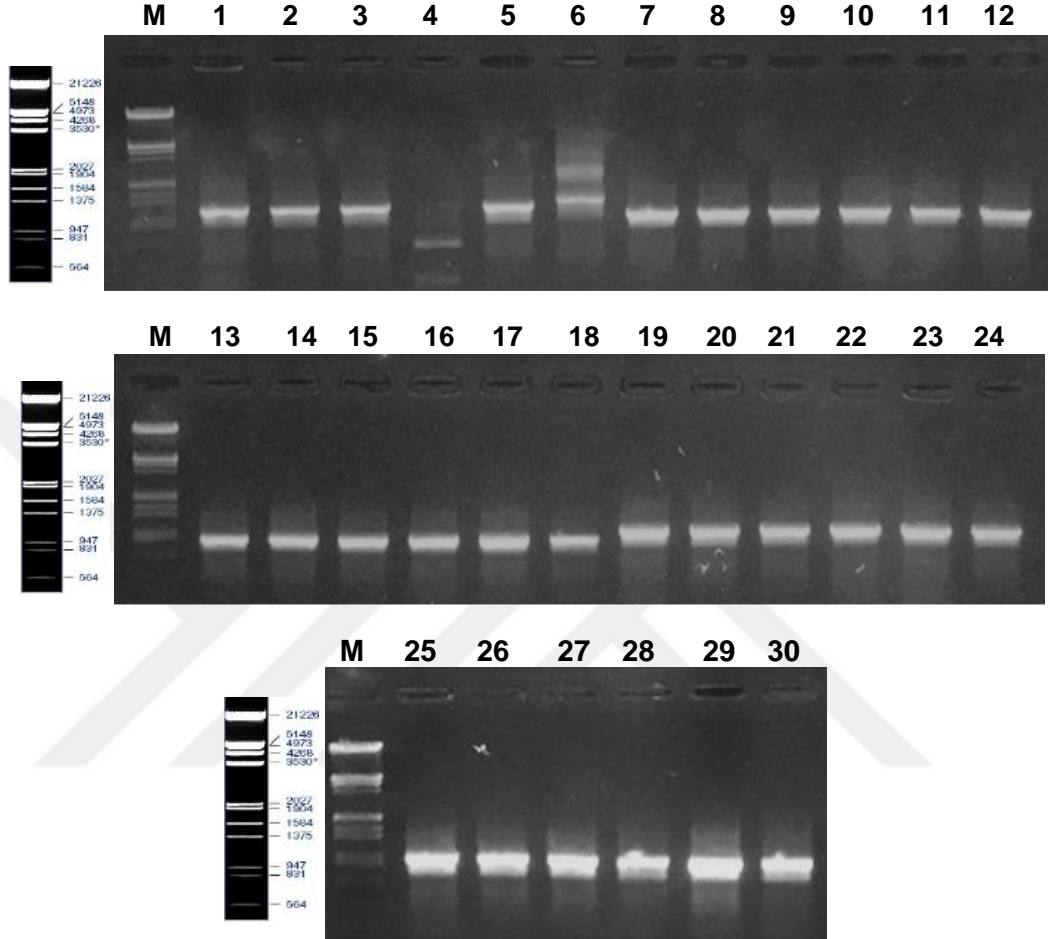
Şekil 11. pCHA-ACTB plazmit vektörü üzerinden ters PZR ile çoğaltılan delesyonlu *ACTB* geni taşıyan doğrusal plazmit vektörlerinin oluşturulmasında kullanılan primerlerin pozisyonları ve bağlanma yönleri (**A**). PZR sonucu elde edilen DNA fragmentlerinin elektroforez profilleri (**B**). **1.** pCHA-ACTB Δ 2-3; **2.** pCHA-ACTB Δ 3; **3.** pCHA-ACTB Δ 4; **4.** pCHA-ACTB Δ 5-6; **5.** pCHA-ACTB Δ 6. Elektroforez işleminde %1'lik agaroz jel kullanıldı. İşlem TAE tamponunda, 100 V sabit gerilim altında 25 dakikada tamamlandı. **M.** *Hind*III ve *Eco*RI restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen Lambda bakteriyofaj DNA'sı (λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI).

Ters PZR ile çoğaltılan delesyonlu plazmit DNA moleküllerinin serbest uçları T4 DNA ligaz enzimi ile birleştirilerek aşağıda restriksiyon haritaları verilen plazmit vektörler elde edildi (Şekil 12).



Şekil 12. pCHA-ACTB plazmiti ve bu plazmit üzerinden türetilen delesyonlu ACTB proteini kodlayan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları. Vektörler pCHA ve ACTB genlerinin nükleotid dizileri ve klonlama aşamasında izlenen yöntem göz önünde tutularak BioEdit programında çizildi.

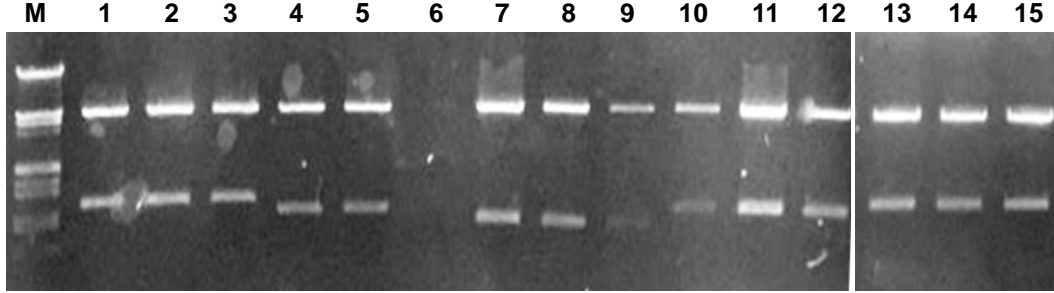
Transformasyon sonucu elde edilen kolonilerin doğru plazmit taşıyıp taşımadıkları ilk aşamada koloni PZR ile araştırıldı (Şekil 13). Koloni PZR sonuçları hemen hemen tüm transformant kolonilerin istenilen rekombinant plazmitleri taşıdıklarını gösterdi.



Şekil 13. Koloni PZR ile plazmit vektörlerin kontrol edilmesi. **1-6** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 6 vektörü (5,86 kbç), **7-12** arası örnekler pCHA-ACTB Δ 5-6 vektörü (~5,68 kbç), **13-18** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 4 vektörü (5,56 kbç), **19-24** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 3 vektörü (~5,76 kbç), **25-30** arası olan örnekler ise pCHA-ACTB Δ 2-3 vektörü (~5,64 kbç). **M.** λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI. PZR ürünlerinin analizinde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi Şekil 11'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

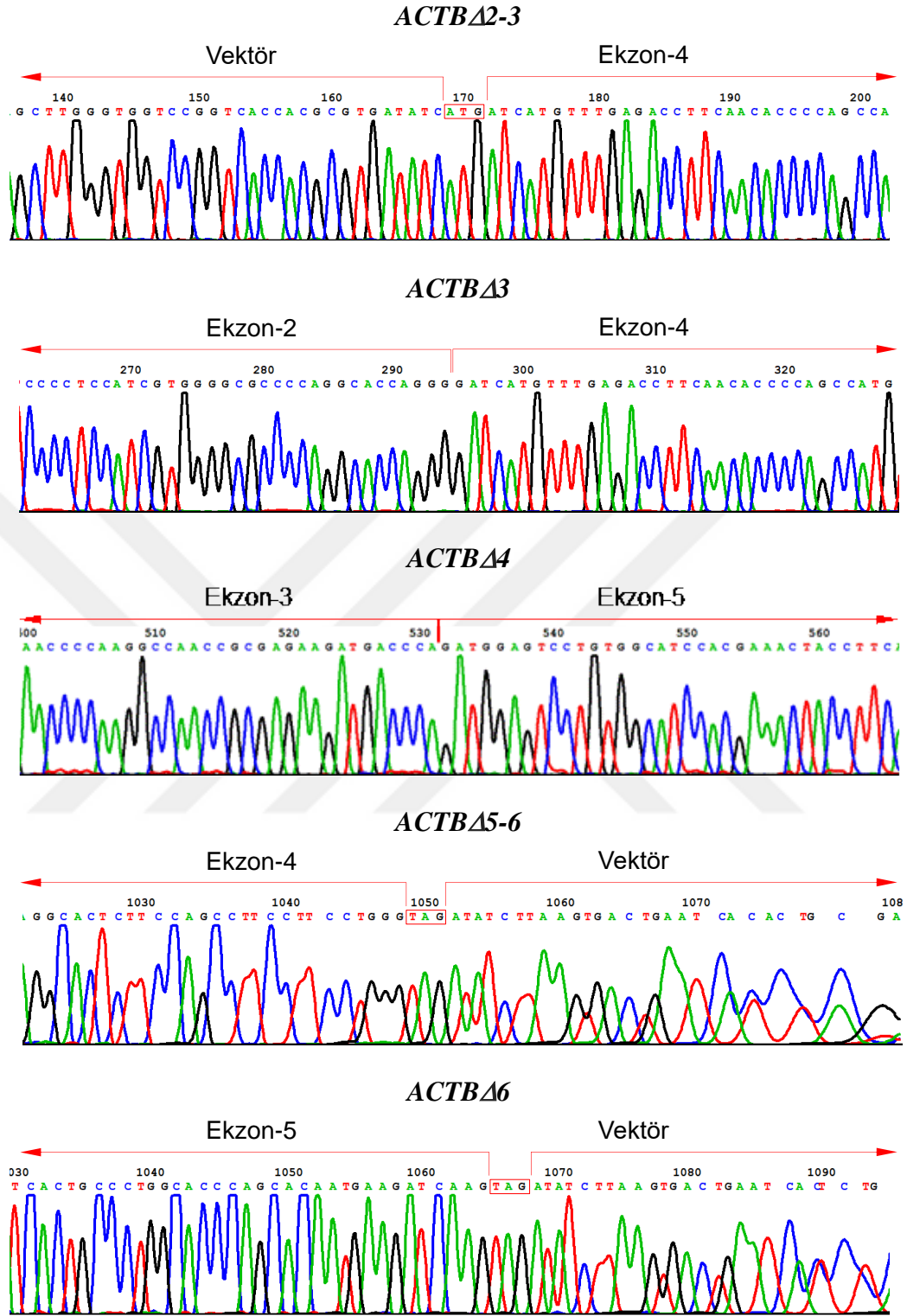
Koloni PZR ile ön kontrolleri yapılan transformantlardan küçük ölçeklerde plazmit DNA izolasyonu yapıldı; plazmitlerin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak *Eco*RI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesildi ve sonuçlar agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi (Şekil 14). Agaroz jel elektroforezi ile pCHA-

ACTB Δ 2-3 için 862 ve 4778 bç boyutlarda; pCHA-ACTB Δ 3 için 985 ve 4778 bç; pCHA-ACTB Δ 4 için 781 ve 4778 bç; pCHA-ACTB Δ 5-6 için 900 ve 4778 bç ve pCHA-ACTB Δ 6 için 1081 ve 4778 bç beklenen boyutlarda DNA fragmentlerinin oluştuğu saptandı.



Şekil 14. Oluşturulan plazmitlerin *EcoRI* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek kontrol edilmesi. **1-3** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 6 vektörü, **4-6** arası örnekler pCHA-ACTB Δ 5-6 vektörü, **7-9** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 4 vektörü, **10-12** arası olan örnekler pCHA-ACTB Δ 3 vektörü, **13-15** arası olan örnekler ise pCHA-ACTB Δ 2-3 vektörü. **M.** λ DNA/*HindIII*+*EcoRI*. PZR ürünlerinin analizinde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi **Şekil 11**'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğru oldukları belirlenen plazmit DNA'larından birer örnek, ligasyon bölgelerinde PZR ya da ligasyon aşamalarında herhangi bir nukleotit kaybı ya da eklenmesi olasılığını bertaraf etmek için Sanger DNA dizi analizi tekniği ile dizilendi. Dizilenen plazmit örneklerinin teorik olarak tasarlanan diziler ile bire bir uyumlu olduğu, herhangi bir nukleotit kaybı ya da eklenme olmadığı saptandı (**Şekil 15**).

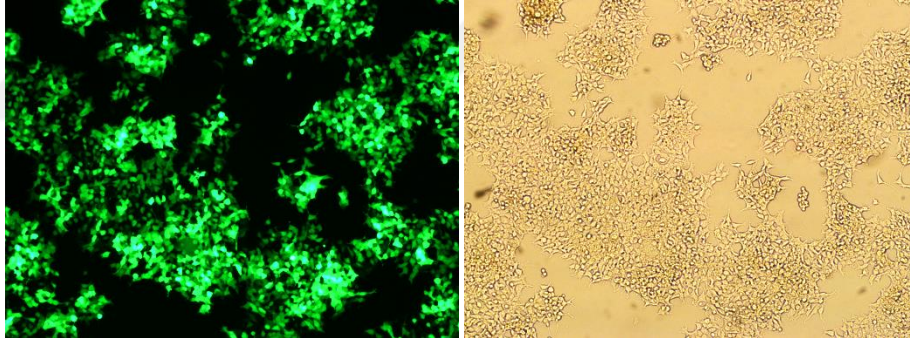


Şekil 15. pCHA plazmit vektörüne klonlanan insan *ACTBΔ2-3*, *ACTBΔ3*, *ACTBΔ4*, *ACTBΔ5-6* ve *ACTBΔ6* genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlarda *ACTB* geninde yapılan delesyon sonrası bağlantı noktaları verilmiştir.

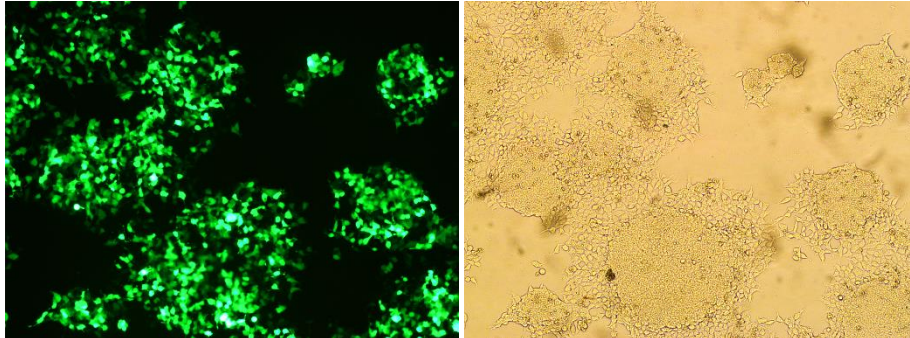
6.2. Plazmit DNA'nın PEI ile HEK293 Hücrelerine Transfeksiyonun Optimizasyonu ile İlgili Veriler

HEK293 hücreleri kompleks halinde DNA moleküllerini kolay alan hücrelerdir. Diğer taraftan, DNA transfeksiyonunda kullanılan özellikle katyonik lipid bazlı transfeksiyon ajanları yüksek maliyet gerektirmektedir. Buna karşın katyonik bir polimer olan PEI maliyeti çok düşüktür, fakat DNA (μg) / PEI (μg) oranının iyi ayarlanması gerekmektedir. Yüksek oranlarda PEI hücreler için toksik etki göstermektedir (Reed ve ark., 2006). Bu nedenle en iyi oranı saptamak için yeşil floresan protein kodlayan pEGFP-N1 plazmit DNA'sı farklı oranlarda PEI çözeltisi ile karıştırılarak HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreler floresan mikroskop altında incelendi (**Şekil 16**). Uygulanan transfeksiyon koşullarında HEK293 hücreleri için en uygun DNA (μg) / PEI (μg) oranının 1:2 olduğu saptandı. Daha sonra ACTB ve PA proteinlerini kodlayan plazmitler ile yapılan transfeksiyon deneylerinde bu oran uygulandı.

DNA/PEI Oranı 1:2



DNA/PEI Oranı 1:3



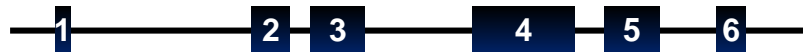
Şekil 16. HEK293 hücrelerinin pEGFP-N1/PEI kompleksleri ile transfeksiyonu. Hücreler 12-kuyulu plaklarda (1×10^5 hücre/kuyu) bir gece üretildi ve 2 μg plazmit DNA ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra floresan mikroskop ile hücreler yeşil floresan protein için incelendi.

6.3. Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinlerinin Western Melezleme Yöntemi ile Belirlenmesine İlişkin Veriler

İnsan *ACTB* geni 7 no'lu kromozomun 7p22.1 kolunda yer alan bir genidir (Şekil 10). Hücrelerde bu gen üzerinden ~42 kD ağırlığında bir protein sentez edilir. Bu çalışmada pCHA-ACTB plazmitine klonlanan tam boyutta *ACTB* geninde belirli ekzonlar delesyona uğratılmıştır. Delesyonlu genler üzerinden sentez edilecek ACTB proteinleri için öngörülen molekül ağırlıkları Şekil 17A'da; *ACTB* ve delesyonlu *ACTB* geni taşıyan plazmit vektörler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde bu plazmitler üzerinden sentez edilen ACTB proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme sonuçları ise Şekil 17B'de verilmektedir. Elde edilen sonuçlar, oluşturulan plazmit vektörlerin HEK293 hücrelerinde ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerini etkin bir şekilde ekspresse ettiklerini ortaya koydu. Hücrelerde sentez edilen ACTB proteinlerinin molekül ağırlıklarının Şekil 17A'da verilen değerler ile uyumlu olduğu görüldü.

A

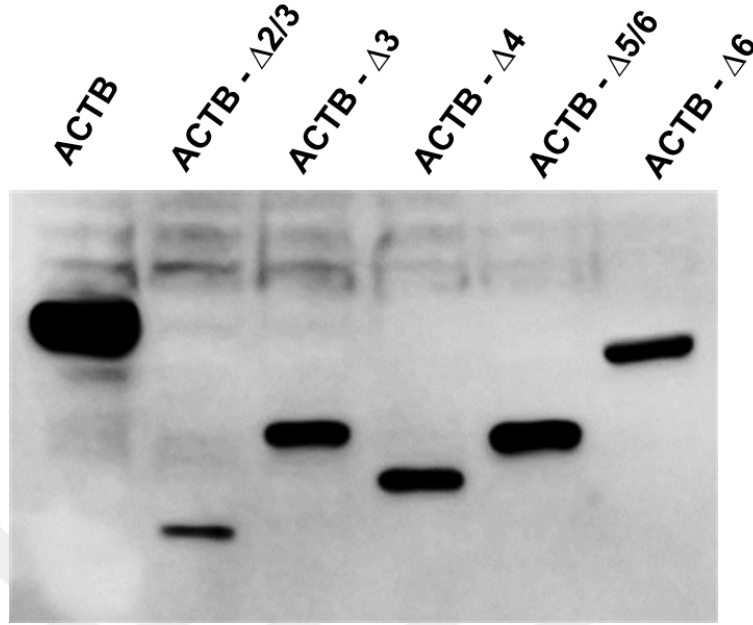
ACTB Geni



ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinleri

		<u>MW</u>	<u>MW (HA-uzantılı)</u>
	ACTB	(~41.7 kD)	(~44.0 kD)
	ACTBΔ2-3	(~28.5 kD)	(~30.8 kD)
	ACTBΔ3	(~32.6 kD)	(~34.9 kD)
	ACTBΔ4	(~25.4 kD)	(~27.7 kD)
	ACTBΔ5-6	(~29.9 kD)	(~32.2 kD)
	ACTBΔ6	(~36.4 kD)	(~38.7 kD)

B

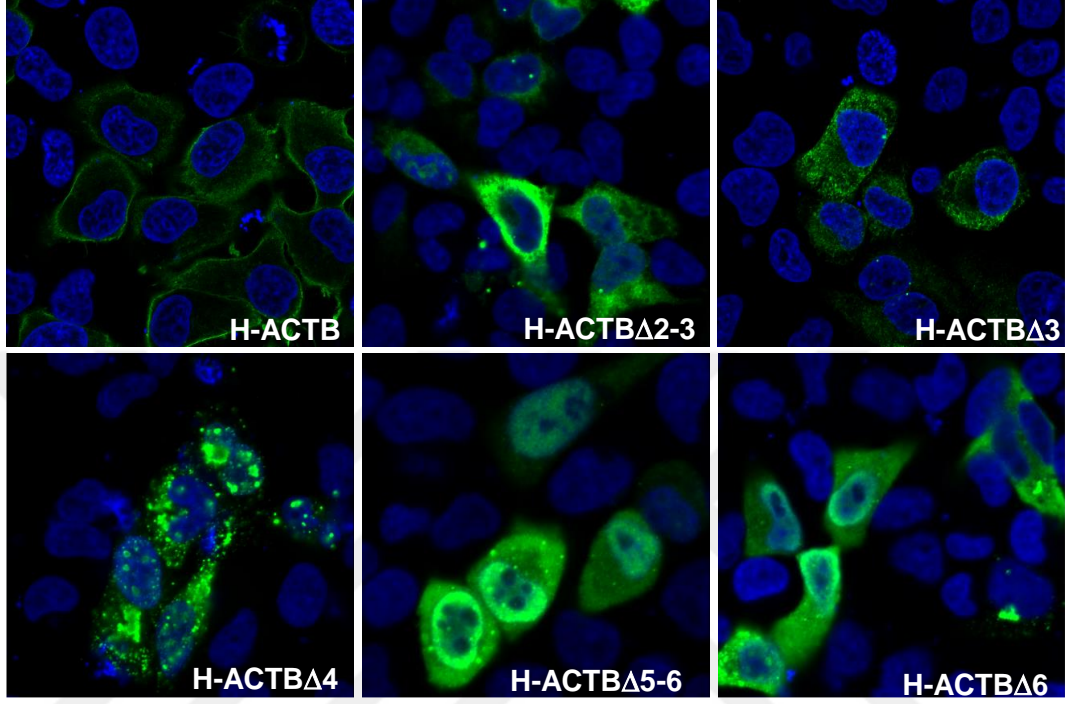


Şekil 17. İnsan *ACTB* geninin ekzon/intron yapısı (A). *ACTB* ve delesyonlu *ACTB* proteinlerinin şematik gösterimi ve amino asit kompozisyonlarına göre belirlenen molekül ağırlıkları (B). pCHA-*ACTB*, pCHA-*ACTB*Δ2-3, pCHA-*ACTB*Δ3, pCHA-*ACTB*Δ4, pCHA-*ACTB*Δ5-6 ve pCHA-*ACTB*Δ6 plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK-293 hücrelerinde sentezlenen HA uzantılı *ACTB* proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelenmesi. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA IgG antikor, sekonder antikor olarak ise HRP konjuge keçi anti-fare IgG antikor kullanıldı. Elektroforez işlemi 100x100x1 mm boylularında %10 poliakrilamid jeller kullanılarak, 70 V/jel sabit gerilim altında 60-80 dakikada tamamlandı. Protein bantları kemilüminesans substrat ile görüntüledi. Görüntüleme DNR Bio marka jel görüntüleme cihazı kullanıldı.

6.4. *ACTB* ve Delesyonlu *ACTB* Proteinlerinin Hücre içi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler

pCHA plazmit vektörü üzerinden kodlanan *ACTB* ve delesyonlu *ACTB* proteinlerinin HeLa hücrelerinde hücre içi lokalizasyonları immünfloresan yöntemlerle saptandı. Bölüm 5.26'de anlatıldığı şekilde transfekte edilen HeLa hücrelerde sentez edilen *ACTB* proteinleri, plazmit vektörler üzerinden kodlanan bu proteinler HA uzantıları taşıdığı için, anti-HA antikorları ile işaretlendi. Sekonder

antikor olarak Alexa-488 konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Farklı plazmitler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmitler üzerinden sentez edilen ACTB proteinlerinin lokalizasyonları **Şekil 18**'de verildi.



Şekil 18. pCHA-ACTB, pCHA-ACTB Δ 2-3, pCHA-ACTB Δ 3, pCHA-ACTB Δ 4, pCHA-ACT Δ 5-6 ve pCHA-ACTB Δ 6 plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin HeLa hücrelerindeki lokalizasyonları. Primer antikor olarak fare orijinli monoklonal anti-HA antikorunu ve sekonder antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Hücre nükleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss LSM 700) ile incelendi.

İmmünfloresan sonuçları plazmit üzerinden sentezlenen HA uzantılı ACTB proteininin doğal ACTB proteinine benzer bir şekilde sitoplazma içerisinde hücre membranına yakın bölgelerde ışınal görünümde yoğunlaşmış olduğunu gösterdi. ACTB proteininin amino-terminalini oluşturan ekzon (2-3)'ün veya tek başına ekzon 3'ün karşılığı olan bölgenin yokluğu, delesyonlu proteinin sitoplazmada daha homojen bir dağılım göstermesine yol açtı. Ekzon 4'e karşılık gelen orta bölgeye sahip olmayan delesyonlu ACTB proteininin agregatlar halinde sitoplazmada yer aldığı belirlendi.

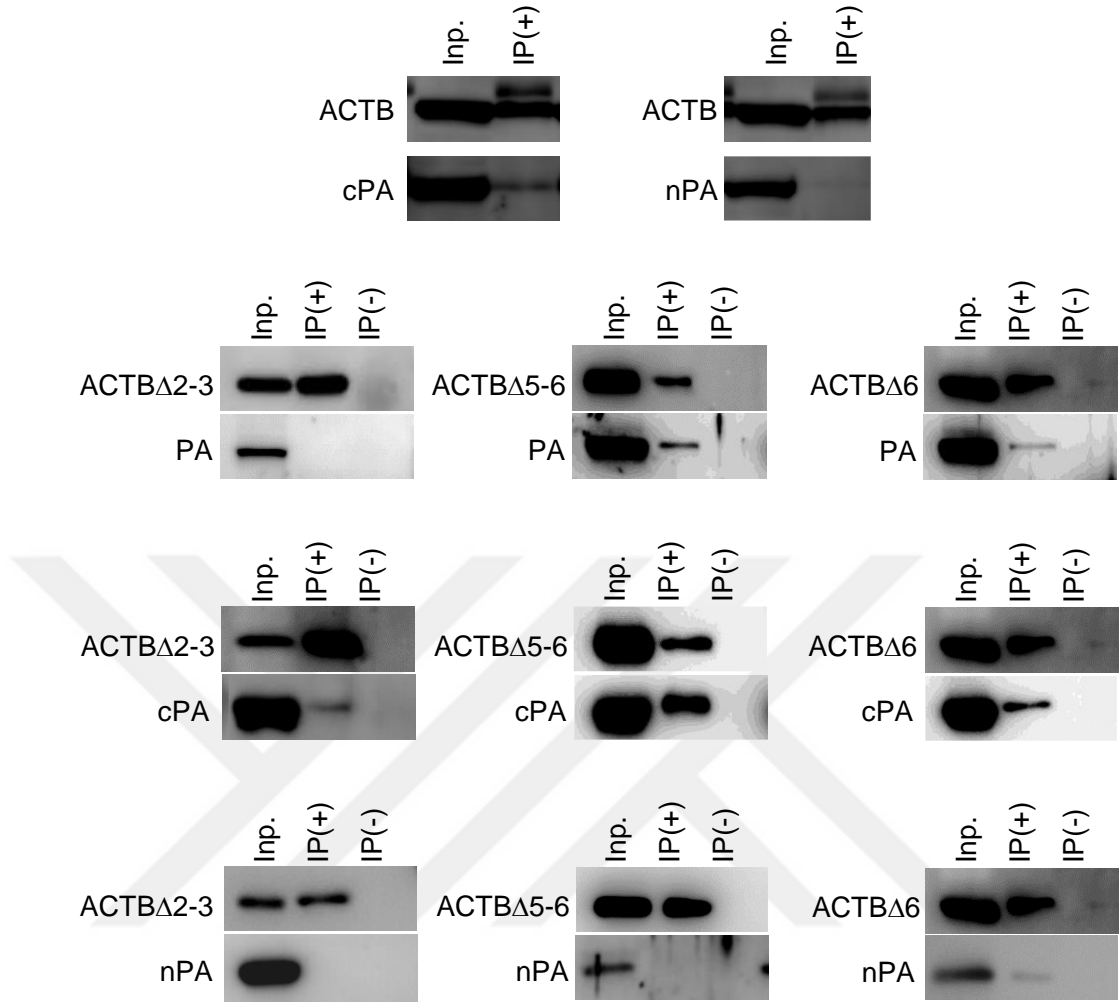
Buna karşın karboksi terminalde, ekzon (5-6) ya da tek başına ekzon 6'ya karşılık gelen bölgeleri taşımayan ACTB proteinleri, daha çok nukleusta olmakla birlikte nukleo-sitoplazmik lokalizasyon gösterdi.

6.5. ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinleri ile PA Proteini Arasındaki İlişkinin Araştırılması ile İlgili Bulgular

İnsan orijinli hücrelerde birlikte sentez edilen influenza A virüsü PA proteini ile ACTB proteinleri arasındaki olası etkileşimlerin araştırılmasında iki farklı yol izlendi: *i.* Anti-HA antikorları ile HA uzantılı ACTB proteinlerini çöktürerek, PA proteinlerinin de birlikte çöküp çökmediği SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile araştırıldı. *ii.* Hücrede birlikte sentezlenen bu proteinlerin immünfloresan teknikler ile hücre içi lokalizasyon profilleri saptandı.

6.5.1. Birlikte immün-çöktürme testleriyle elde edilen sonuçlar

Proteinlerin işlevlerinin ve farklı proteinler ile ilişkilerinin saptanmasında izlenen önemli biyokimyasal yöntemlerden biri özgün antikorlar kullanarak proteinleri birlikte çöktürme (*İng. co-immunoprecipitation*) yöntemidir. Bu çalışmada plazmit transfekte edilen HEK-293 hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile birlikte sentez edilen HA uzantılı ACTB proteinleri anti-HA antikorları ile çöktürüldü. Protein çökeltisi hem ACTB proteinleri hem de PA proteinleri için SDS-PAGE / Western melezleme tekniğiyle analiz edildi (**Şekil 19**). Birlikte immün-çöktürme testleri, influenza A virüsü PA proteini karboksi-terminal bölgesinin ACTB protein ile birlikte çökeldiğini gösterdi. Tam boyutta PA proteininin delesyonlu ACTB (ACTB Δ 5-6 ve ACTB Δ 6) proteinleri ile birlikte çökeldiği, buna karşın amino-terminal bölgesi delesyonlu ACTB (ACTB Δ 2-3) proteini ile çökemediği saptandı. Diğer taraftan influenza A virüsü PA proteininin karboksi-terminal bölgesinin (cPA) ACTB Δ 5-6 ve ACTB Δ 6 proteinleri ile çok daha güçlü etkileşim içinde olduğu görüldü. İnfluenza A virüsü PA proteininin amino-terminal bölgesinin (nPA) sadece ACTB Δ 6 ile çok düşük miktarda çökeldiği saptandı. ACTB Δ 4 proteini ile yapılan immün-çöktürme testlerinden istenilen sonuç alınamadı.

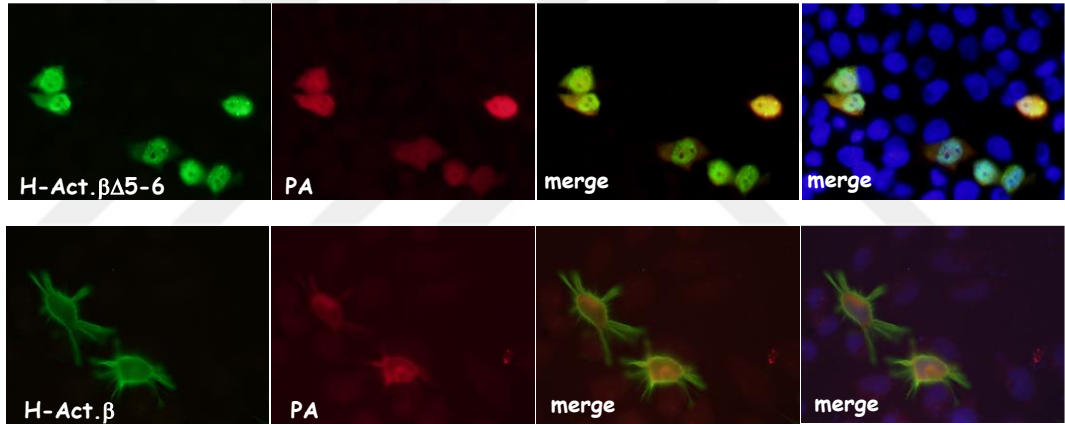


Şekil 19. İnsan ACTB proteini ve İnfluenza PA proteininin arasındaki ilişkinin immün çöktürme testleri ile analizi. ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin (ACTBΔ2-3, ACTBΔ 5-6 ve ACTBΔ6 proteinleri) ve influenza virüsü PA proteinini kodlayan plazmit DNA'ları HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlar, **5.25.1**'de ayrıntılı verilen işlemlerden geçirildi ve SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Proteinler nitroselüloz membranlarda spesifik antikorlarla işaretlendi. Elektroforez işlemi **Şekil 17**'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.5.2. ACTB ve PA proteinlerinin birlikte hücre içi lokalizasyonları ile ilgili veriler

Memeli hücrelerde birlikte sentez edilen proteinlerin hücre içerisinde aynı noktalarda lokalize olup olmadıklarının immünfloresan yöntemler ile saptanması, söz konusu proteinler arasındaki ilişki hakkında önemli ipuçları vermektedir. Bu çalışma

kapsamında da immün-çöktürme testlerinde pozitif sonuç veren PA ile ACTB ve karboksi-terminal bölgesi delesyonlu ACTB Δ 5-6 proteinlerinin birlikte sentez edildiklerinde hücre içi lokalizasyonlarının nasıl olacağı araştırıldı. PA ve ACTB kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA proteinleri poliklonal anti-PA (tavşan), HA uzantısı taşıyan ACTB proteinleri ise monoklonal anti-HA (fare) antikoru ile işaretlendi. Deneylerde sekonder antikolar olarak, alexa-488 (anti-fare IgG) ve alexa-568 (anti-tavşan IgG) antikoru kullanıldı. Farklı florokromlar ile PA ve ACTB proteinleri DP72 peltier, soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskop ile incelendi (Şekil 20). PA ve ACTB proteinleri için aynı hücrede farklı florokromlar kullanılarak alınan görüntüler üst üste çakıştırılarak sonuçlar değerlendirildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, iki farklı proteinin de hücrenin aynı yerlerinde lokalize olduğu görüldü (Şekil 20).

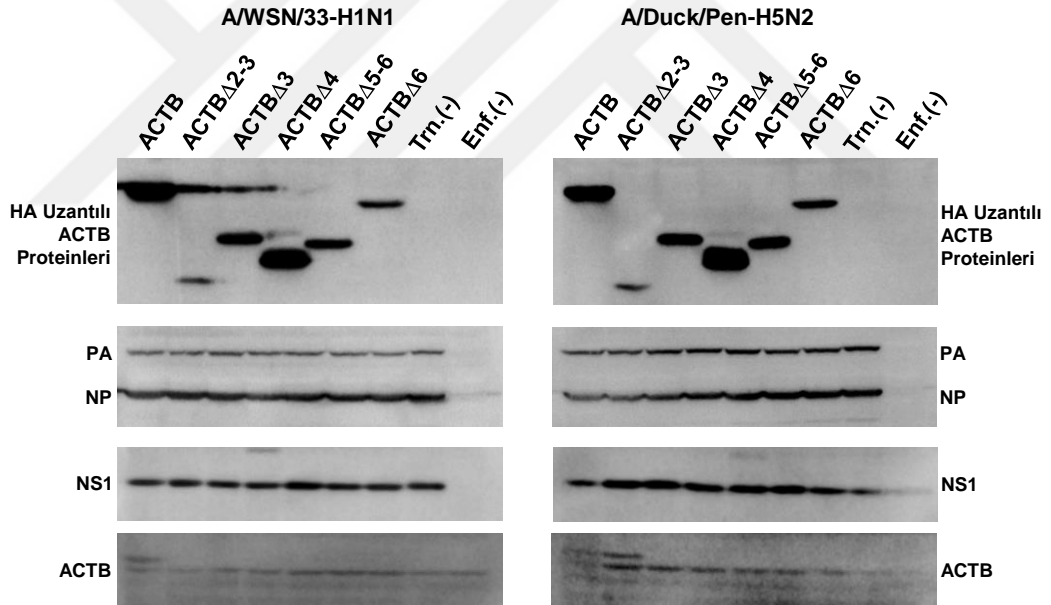


Şekil 20. İnfluenza A virüsü PA proteini ve ACTB proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve ACTB proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu. Primer antikoru olarak PA proteini için poliklonal tavşan anti-PA antikoru, ACTB proteinleri için ise monoklonal fare anti-HA antikoru; sekonder antikoru olarak ise, Alexa-568 konjuge anti-tavşan IgG ve Alexa-488 konjuge anti-fare IgG antikoru kullanıldı.

6.6. HEK293 Hücrelerde Fazla Miktarlarda Sentez Edilen ACTB ve Delesyonlu ACTB Proteinlerin İnfluenza Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile İlgili Veriler

HEK293 hücreleri *ACTB* geni taşıyan plazmitler ile transfekte edilerek, ACTB proteinlerinin hücre içi miktarları yapay olarak artırıldı. Daha sonra bu hücreler insan

tipi (WSN) ve kuş tipi (DkP) influenza A virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücrelerde influenza A virüsü replikasyonunun hangi düzeyde olduğu viral proteinlerin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi ile değerlendirildi. Enfekte hücrelerin örnek tamponunda parçalanması ile elde edilen lizatlarda influenza A virüsüne ait PA, NP ve NS1 proteinleri; plazmitler üzerinden kodlanan HA uzantılı ACTB proteinleri ve hücrelerin doğal ACTB proteinlerine ait SDS-PAGE/Western melezleme sonuçları **Şekil 21**'de verildi. Transfekte edilen hücrelerde HA uzantılı ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin farklılık gösterdiği saptandı. Hücrelerde HA uzantılı ACTB ve ACTB Δ 4 daha yüksek düzeylerde sentez edildiği, buna karşın ACTB Δ 2-3'ün daha düşük düzeylerde sentez edildiği görüldü. Buna karşın HA uzantılı ACTB proteinlerinin aşırı eksprese olduğu hücrelerde incelen viral PA, NP ve NS1 protein miktarlarında önemli farklılıklar saptanamadı.



Şekil 21. Plazmit transfeksiyonu ile ACTB ve delesyonlu ACTB protein düzeyi arttırılan HEK293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnfluenza A virüsleri enfekte ettikleri konak hücreden aldıkları bir zar ile çevrilmiş sekiz adet tek iplikli negatif polarite gösteren RNA genomu taşırlar (Bouvier ve Palese, 2008). Bu RNA'lar 5. RNA segmenti üzerinden kodlanan nuklear proteinler (NP) ile kompleks oluşturarak viral ribonukleoprotein partikülleri (vRNP) halinde bulunur (Ferhadian ve ark., 2018). Viral enfeksiyonun ilk aşamalarında, influenza A virüsü vRNP'leri konak hücre sitoplazmasından nukleer porlar aracılığıyla nukleusa taşınır. İnfluenza virüslerinin replikasyon ve transkripsiyon olayları hücre nukleusunda gerçekleşir (Samji, 2009). İnfluenza A virüsleri insan sağlığı açısından çok büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle bu virüslerin replikasyon mekanizmalarının aydınlatılması birçok bilimsel araştırmanın odak noktasını oluşturmaktadır. İnfluenza virüslerinin membran taşımaları, genomlarının çok parçalı olması, viral genomun replikasyon ve transkripsiyonlarının hücre nukleusunda gerçekleşmesi virüsün yaşam döngüsü ile ilgili aydınlatılması gereken bir dizi olayın temel kaynağıdır. Hücre sitoplazmasında serbest kalan vRNP'lerin nukleer por kompleksleri ile nukleusa taşınması ve yeni sentez edilen vRNA'ların vRNP'ler halinde paketlenmesi ve tekrar nukleer por kompleksleri aracılığıyla sitoplazmaya taşınması özel mekanizmalar gerektirmektedir. Bu mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Heldt ve ark., 2012; Matsuoka ve ark., 2013; Mikulasova ve ark., 2000; Resa-Infante ve ark., 2011). İnfluenza A virüsü yaşam döngüsü ile ilgili yanıt bekleyen en önemli sorulardan biri de enfekte hücrede oluşan yeni vRNP'lerin bir takım halinde hücre zarına taşınmaları ve virüs partikülünün kurulması mekanizmasıdır. Bu olayda rol alan virüs ya da konak hücreye ait hangi proteinlerin işlev gördüğü konusunda sınırlı düzeyde veri bulunmaktadır. Bu tez çalışmasına konu olan hücresel proteinlerden sitoplazmik ACTB proteini, hücre için iskelet görevi görmesinin yanı sıra; hücre içi hareketler ve kasılma, hücre bölünmesi ve sitokinezi, vezikül ve organel hareketleri, hücre sinyal iletimi ve hücreler arası bağlantıların oluşturulması gibi önemli olaylarda rol alır (Dominguez ve Holmes, 2011; Lee ve Dominguez, 2010; Visa ve Percipalle, 2010; Zhao ve ark., 2017). ACTB proteininin influenza A virüsü vRNP'lerinin hücre içi trafiğindeki rolü bilinmemektedir. Bu çalışmada ACTB proteininin influenza vRNP'lerinin yapısında

yer alan ve viral RNA polimeraz enziminin bir alt ünitesi olan PA proteini ile olası ilişkisi araştırılmıştır.

İnfluenza A virüsü PA proteini yem (bait) olarak kullanılarak HEK293 cDNA'sı tarafından kodlanan proteinlerin viral PA ile etkileşimleri bakımından maya ikili-hibrit metodu ile tarandığı bir çalışmada (yayımlanmamış veri) insan ACTB proteininin maya hücrelerinde PA proteinleri ile etkileşim gösterdiği saptanmıştır. Bu proteinin memeli hücrelerinde de influenza virüsü PA proteini ile ilişkisi DNA teknolojilerinden yararlanılarak oluşturulan yapay sistemler ile değerlendirildi. Bunun için *ACTB* genini hem bir bütün olarak hem de belirli ekzonları delesyonlu bir şekilde taşıyan memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu (**Şekil 12**). Memeli hücrelerinde, elde edilen bu vektörler üzerinden kodlanan ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerinin influenza virüsü PA proteini ile ilişkisi birlikte immün çöktürme ve immünfloresan teknikler ile analiz edildi.

Fiziksel olarak ilişkili olan proteinlerde, etkileşim gösteren bölgelerin saptanmasında, belirli bölgeleri (domein) taşımayan proteinlerin hücrelerde yapay olarak sentez edilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi en geçerli yaklaşımlardan biridir (Blonar ve Rutter, 1992; Mayer ve ark., 1992; Phizicky ve Fields, 1995). Bunun için insan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile hücresele ACTB proteini arasındaki olası ilişkiyi araştırmak için bu proteinleri bütün olarak ya da belirli bölgelerini kodlayan plazmit vektörlerden yararlanıldı. Bu plazmit vektörlerden delesyonlu ACTB proteini kodlayanlar bu çalışma kapsamında oluşturuldu ve plazmitlerin doğrulukları DNA dizi analizleri ile ortaya kondu (**Şekil 15**). İnsan orijinli hücrelerde plazmitler üzerinden geçici olarak sentez edilen ACTB proteinlerini endojen ACTB proteinlerinden ayırmak için genler HA uzantılı ACTB proteini kodlayacak şekilde klonlandı. Bu plazmitlerin HEK293 hücrelerinde HA uzantılı ACTB ve delesyonlu ACTB proteini kodlayıp kodlamadıkları SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile ortaya kondu (**Şekil 17**). Çalışmada yararlanılan tam boyutlu PA ve PA proteinlerinin farklı bölgelerini kodlayan plazmitler (pCAGGS-PA, pCAGGS-cPA ve pCAGGS-nPA) ise danışmanım Dr. Turan tarafından başka bir proje kapsamında oluşturulmuştur.

Ökaryotik hücrelerde birbiri ile ilişkili olan proteinlerin hücre içi lokalizasyonları, aynı noktalarda bulunup bulunmaması ve lokalizasyonlarının

zamanla değişip değişmemesi gibi veriler proteinlerin işlevlerini belirlemek için büyük önem taşır. İnsan ACTB proteini doğal haliyle daha çok hücre membranına yakın bölgelerde yoğunlaşan bir şekilde sitoplazmik lokalizasyon gösteren bir proteindir (Simiczjew ve ark., 2017) ve çoğunlukla aktin filamentleri halinde bulunur. Aktin filamentlerinin oluşumu ve bozulması dinamik bir özellik gösterir. Bu dinamik yapı hücre hareketi, morfogenez ve endositoz gibi temel hücre işlevleri için gereklidir (Kotila ve ark., 2018). Çalışmada plazmit vektörler üzerinden kodlanan özellikle delesyonlu ACTB proteinlerinin doğal ACTB proteininden farklı davranması beklenen bir durumdur. Bu bağlamda HeLa hücrelerinde geçici olarak sentez edilen HA uzantılı ACTB proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile analiz edildi. Plazmit üzerinden kodlanan, delesyon taşımayan HA uzantılı ACTB proteinin, doğal ACTB proteinine benzer bir lokalizasyon gösterdiği, sitoplazma içerisinde hücre membranına yakın bölgelerde yoğunlaşmış olduğu saptandı. HA uzantılı ACTB proteinlerinin hücre membranına yakın bölgelerde ışınsal bir dağılım göstermeleri, doğal ACTB proteinleri ile aktin filamentlerin oluşumuna katıldığını gösterdi (**Şekil 18**). Buna karşın amino-terminal bölgesinde 3.ekzonu ve 2/3.ekzonları delesyonlu ACTB proteinlerinin (ACTB Δ 3 ve ACTB Δ 2-3) hücre sitoplazmasında daha homojen dağılım gösterdiği saptandı (**Şekil 18**). Bu proteinlerin ışınsal dağılım göstermemeleri, aktin filament oluşumuna katılmadıklarını düşündürmektedir. Karboksil-terminal bölgede delesyon taşıyan ACTB proteinlerinin (ACTB Δ 5-6 ve ACTB Δ 6) nukleo-sitoplazmik lokalizasyon gösterdiği belirlendi. Orta bölgesinde ekzon-4'e karşılık gelen amino asit dizisini taşımayan ACTB proteininin (ACTB Δ 4) ise sitoplazmada gruplar (agregatlar) halinde lokalize olduğu görüldü (**Şekil 18**). Ökaryotik hücrelerde proteinler arası etkileşimler ve proteinlerin taşıdıkları sinyal dizileri proteinlerin lokalizasyonları ve hücre içi trafiğini etkileyen önemli faktörlerdir. Nukleo-sitoplazmik taşınmalarda özellikle nuklear por kompleksi proteinleri ve diğer bazı proteinler hedef moleküllerin taşınmasında etkilidirler (Mattaj ve Englmeier, 1998; Williams ve ark., 1997). Proteinlerin taşıdıkları sinyal peptitlerinin hücrelerde protein trafiğinin düzenlenmesinde işlev gördüğü birçok çalışmada kanıtlanmıştır (Schutze ve ark., 1994; Stornaiuolo ve ark., 2003). Özellikle membran proteinlerinin, ribozomlarda mRNA üzerinden kodlanmaya başlamasından itibaren hücre membranına yönlendirilmesinde sinyal görevi gören diziler işlev görürler (Blobel ve

Dobberstein, 1975a; Blobel ve Dobberstein, 1975b). Sinyal dizileri, proteinlerin sadece hücre membranlarına yönlendirilmesinde değil, aynı zamanda hücredeki organellere ve sitoplazmadan nükleusa taşınmasında da önemli görevler üstlenirler (Kalderon ve ark., 1984; Schwartz, 1990; Stornaiuolo ve ark., 2003; Teasdale ve Jackson, 1996). Sinyal dizileri arasında SV40 virüsüne ait T antijeni nüklear lokalizasyon (NLS) sinyali (PKKKRKV) ökaryotik hücrelerde proteinlerin sitoplazmadan nükleusa taşınmasında iş gördüğü saptanan ilk dizidir. Bunun dışında birçok farklı tipte nüklear lokalizasyon sinyali dizileri saptanmıştır (Dingwall ve ark., 1988). Diğer taraftan belirli bölgelerinin uzaklaştırılması ya da SV40 T antijeni NLS dizisinin eklenmesi gibi durumlarda proteinlerin hücre içi lokalizasyon profillerinin değişmesi beklenen bir durumdur (Kakar ve ark., 2007; Kosugi ve ark., 2009). Dolayısıyla delesyona uğratılan ACTB proteinlerinin lokalizasyonlarında görülen farklılaşmaları bu bağlamda değerlendirmek gerekir. ACTB proteininde ekzonlar temel alınarak yapılan delesyonların proteinin sitoplazmada doğal ışınal lokalizasyonunu değiştirdiği ve büyük olasılıkla polimerleşme özelliğinin kaybolmasına yol açtığı görülmüştür.

Hücrelerde sentez edilen proteinlerin fonksiyonlarının ve diğer hücrel proteinler ile ilişkilerinin saptanması birçok biyokimyasal, mikrobiyolojik ve moleküler biyoloji teknikleri ile analizler gerektirmektedir. Maya ikili hibrit metodu (Letteboer ve Roepman, 2008) ve memeli ikili hibrit metodu (Lievens ve ark., 2009); canlı hücre içerisinde belirli bir transkripsiyon aktivatörünün aktivasyon bölgesi veya bağlanma bölgesi ile füzyon halinde sentez edilen iki ya da daha fazla proteinin etkileşimine bağlı olarak anlatım yapan çeşitli işaret (reporter) genlerinin ekspresyonuna dayalı önemli tekniklerdir. Bu çalışmada da insan ACTB proteinin influenza A virüsü PA proteinin interaktörü olarak belirlenmesinde maya ikili-hibrit metodu ile elde edilen veriler temel alınmıştır. Proteinlere özgü antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen birlikte immün çöktürme testlerinde ise ilgili proteinleri sentez eden hücrelerin parçalanması ile elde edilen hücre lizatlarında, aday proteinlerin spesifik antikor ve antikorları bağlayan protein-A-sefaroze (ya da protein-G-sefaroze) ile çöktürülen proteinlerin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi temeline dayanır (Lin ve Lai, 2017; Takahashi, 2015). Bu gibi durumlarda proteinlere özgü antikorlara gereksinim vardır. Hücrelerde sentez edilen tüm proteinler için özgün

antikor üretmek her zaman mümkün olmadığı için rekombinant olarak sentez edilen proteinlerin amino- ya da karboksil-terminallerine HA (YPYDVPDYA), Flag (DYKDDDDK), Myc (EQKLISEEDL) ya da His (HHHHHH) gibi antikorlar için epitop uzantıları (tag) eklenir (Gloeckner ve ark., 2009; Krachmarova ve ark., 2017). Bu çalışmada da insan *ACTB* genleri HA uzantılı *ACTB* proteinleri kodlayacak şekilde klonlanmış ve proteinler HEK293 ya da HeLa hücrelerinde HA uzantılı olacak şekilde sentez edilmiştir. Bu şekilde gerek immün çöktürme testlerinde gerekse immünfloresan teknikler ile yapılan analizlerde rekombinant *ACTB* proteinlerinin hücrelerde doğal olarak sentez edilen *ACTB* proteinlerinden ayırt edilebilmesi sağlanmıştır.

Çalışmada influenza PA proteini ile insan *ACTB* proteini arasındaki ilişkinin saptanmasında birlikte immün çöktürme tekniği uygulandı. HA uzantılı *ACTB* proteinleri ve influenza PA proteini sentez eden HEK293 hücreleri parçalanarak lizatlar elde edildi. Hücre lizatlarına, anti-HA antikor eklenerek HA uzantılı *ACTB* ve delesyonlu *ACTB* proteinlerine bağlanması ve oluşan komplekslerin protein A sefaroza ile çöktürülerek lizattan ayrışması sağlandı. Protein-A-sefaroza ile çökelen proteinler arasında hem *ACTB* proteinleri hem de influenza PA proteininin varlığı SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar anti-HA antikorları ile HA uzantılı *ACTB* proteinlerinin beklediği şekilde çöktüğü görüldü (Şekil 19). Delesyon taşımayan insan *ACTB* proteini ve influenza A virüsü PA proteini karboksi-terminal bölgesini kodlayan plazmitler (pCHA-*ACTB* ve pCAGGS-cPA) ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlanan lizatlarda anti-HA antikorları ile çöktürülen *ACTB* proteini ile birlikte influenza A virüsü cPA proteininin de çöktüğü saptandı (Şekil 19). Benzer şekilde insan *ACTB* proteini ve influenza A virüsü PA proteininin amino- ya da karboksil-terminal kısmını kodlayan plazmitler (pCHA-*ACTB* ve pCAGGS-nPA ya da pCAGGS-cPA) ile transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlarda ise *ACTB* proteini ile birlikte karboksil-terminal PA proteininin etkin bir şekilde çöktüğü, buna karşın amino-terminal PA proteininin ise çökmediği ortaya kondu (Şekil 19). Bu veri influenza A virüsü PA proteininin karboksil-terminal yarımının (cPA) insan *ACTB* proteini ile etkileşimde önemli olabileceği sonucunu verdi.

Rekombinant DNA teknolojileri sadece proteinlerin fonksiyonlarının ve diğer proteinler ile ilişkilerinin belirlenmesine yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda genler üzerinde gerçekleştirilen delesyonlar ya da kodon değişiklikleri ile ilgili proteinlerin işlevsel bölgelerinin ve işlevsel amino asit bakiyelerinin saptanmasına da olanak tanır. Genlerde gerçekleştirilen delesyonlar, proteinde bir ya da birkaç amino asitin değişmesine ya da belirli bir ekzon dizisine karşılık bir bölgenin ortadan kaldırılmasına olanak sağlar. Bu çalışmada sadece PA proteininin amino- ve karboksil-terminalleri değil aynı zamanda ACTB proteininin de farklı bölgeleri delesyona uğratarak elde edilen proteinler ile immün çöktürme testleri gerçekleştirildi. Dolayısıyla ACTB proteini üzerinde de PA ile ilişkide önemli olabilecek bölge araştırıldı. Delesyonlu *ACTB* geni taşıyan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde delesyonlu proteinlerin de etkin bir şekilde ekspresse olduğu saptandı (**Şekil 17**). İnfluenza A virüsü PA proteini ve amino-terminal bölgede ekzon 2/3'e karşılık gelen kısmı taşımayan *ACTBΔ2-3* proteininin birlikte sentez edildiği hücrelerden hazırlanan lizatlar ile yapılan immün çöktürme testleri bu iki proteinin birlikte çökmediğini gösterdi (**Şekil 19**). Buna karşın PA proteininin, karboksil-terminal bölgede ekzon 5/6 ya da sadece ekzon 6'ya karşılık gelen kısmı taşımayan *ACTBΔ5-6* ve *ACTBΔ6* proteinleriyle birlikte çökmediği görüldü. İmmün çöktürme testleri delesyonlu ACTB proteinleri ile PA proteininin amino-terminal yarımı veya karboksil-terminal yarımı ile de gerçekleştirildi. Karboksil-terminal PA (cPA) proteininin özellikle *ACTBΔ5-6* proteini ile diğer delesyonlu ACTB proteinlerine göre daha yüksek oranlarda çökmediği ortaya kondu. *ACTBΔ2-3* proteini ile birlikte çok düşük düzeyde cPA proteininin çökmediği saptandı. Amino-terminal PA (nPA) proteininin cPA'nın aksine *ACTBΔ5-6* proteinleriyle birlikte çökmediği görüldü. Bu proteinin *ACTBΔ6* proteini ile iz miktarlarda çökmediği, *ACTBΔ2-3* proteini ile ise hiç çökmediği ortaya kondu (**Şekil 19**).

Protein moleküllerinin hücre içi lokalizasyonları kendi yapısal özelliklerinin yanı sıra diğer proteinler ile etkileşimlerden de etkilenebilmektedir. Çalışmada, immün çöktürme testleri ile pozitif reaksiyon veren PA ve ACTB proteinlerinin HeLa hücrelerinde birlikte sentez edildikleri durumda hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile analiz edildi. Bu testlerde PA protein ile delesyon taşımayan ACTB ya da immün çöktürme testlerinde güçlü interaksiyon gösteren

ACTBΔ5-6 proteinlerinin lokalizasyonları incelendi. Plazmit vektörler üzerinden birlikte sentez edilen PA ve ACTB proteinlerinin HeLa hücrelerinde aynı bölgelerde lokalizasyon gösterdikleri belirlendi (**Şekil 20**). Bu veriler immün çöktürme deneyleri ile elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

ACTB ve PA proteinleri ile ilgili immün çöktürme ve immünfloresan testleri sonucu elde edilen veriler değerlendirildiğinde, PA proteinin karboksil-terminal yarımı ile ACTB proteinin amino-terminal bölgesinin bu iki proteinin etkileşimleri açısından önemli olduğu sonucuna varıldı. Delesyonlu ACTB proteinleri ile elde edilen sonuçlar tam boyutta ACTB proteini ile elde edilen sonuçlar ile paralellik gösterdiği görüldü.

ACTB proteinlerinin, enfekte hücrelerde gerçekleşen bazı virüs replikasyonları ile ilgili olaylarda etkili olduğu gösterilmiştir. Yuan ve diğerleri, yaptıkları biyokimyasal analizler sonucunda rotavirus VP6 kapsit proteininin beta aktin, tropomisin 1 ve 40S ribozomal protein S16 ile ilişkili olduğunu, aktin beta proteinin domuz rotavirusü (PoRV) yaşam döngüsünde hayati rol oynadığını göstermişlerdir (Yuan ve ark., 2016). Lui ve diğerleri, enterovirus 71 (EV71) virüs replikasyonu için ACTB proteininin gerekli olduğunu ve annexin2 gibi proteinler ile birlikte EV71'in vesiküler transportunda rol aldığını ileri sürmüşlerdir (Lui ve ark., 2013). Benzer şekilde ACTB proteinin insan immün yetmezliği virüsü tip 1 (HIV-1) replikasyonu ile ilişkili olduğu (Kimura ve ark., 1996) ve coronavirus'leri kurulumunda (Wang ve ark., 2009) rol aldığı bildirilmiştir. Literatür verileri arasında insan ACTB proteini ile influenza A virüsü proteinleri arasında bir ilişki olduğunu gösteren bir veriye rastlanmamıştır. Buna karşın ACTB proteinleri hücre içerisinde birçok molekül ya da vesiküllerin transportunda işlev gören filamentlerin yapı taşlarıdır (Persson ve ark., 2013; Schuh, 2011). İnfluenza A virüsü PA proteini viral RNA polimeraz enzimini oluşturan alt ünitelerden biridir. Bu protein polimeraz enziminin diğer alt üniteleri olan PB2 ve PB1 proteinleri ile birlikte virüste vRNP'lere bağlı olarak taşınmaktadır. Dolayısıyla, elde edilen sonuçlar ACTB proteinlerinin influenza virüsü vRNP partiküllerinin sitoplazmada hücre membranına taşınmasında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Hüresel proteinlerin viral replikasyona etkilerini incelemek için yapay yollarla ilgili proteinlerin hücre içi miktarlarında değişiklik yapmak ve bu hücrelerde

viral replikasyonun seyrini gözlemlemek izlenen yöntemler arasında yer almaktadır (Agrawal ve ark., 2003; Kim ve Rossi, 2008). Hücrelerde ilgili transkript düzeyini, dolayısıyla protein düzeyini düşürmek için özgün siRNA'lerden (*İng. RNA interferens*) yararlanmak yaygın olarak uygulanan bir yöntemdir. Bu çalışma kapsamında siRNA tekniği uygulanmamıştır. Hücrelerde belirli bir proteinin miktarını arttırma için ise, bu proteini kodlayan genlerin kopya sayısını arttırmak etkili bir yoldur. Bunun için hücreler, bu genleri uygun promotör dizilerinin kontrolünde taşıyan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilir. Bu tez çalışması kapsamında da insan ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerini kodlayan plazmit vektörler HEK293 hücrelerine transfekte edildi ve bu proteinlerin hücre içi miktarları arttırıldı (**Şekil 21**). Daha sonra bu hücreler belirli dozlarda influenza A virüsleri ile enfekte edildi ve enfeksiyondan 8 saat sonra hücreler parçalanarak, belirli viral proteinlerin miktarları Western melezleme tekniği ile incelendi (**Şekil 21**). Çalışmada viral PA, NP ve NS1 protein miktarları karşılaştırıldı. Farklı ACTB proteini sentezlenen hücrelerde viral proteinler arasında belirgin bir farklılık gözlenmedi. Bu sonuç ACTB ve delesyonlu ACTB proteinlerindeki artışın influenza virüsü replikasyonunun ilk 8 saatlik diliminde viral RNA polimeraz enzimini (veya polimer enzimin PA alt ünitesini) interfere edici bir etki yapmadığını düşündürdü. HA uzantısı taşıyan ACTB proteinin endojen ACTB proteini gibi filament oluşumuna katılması ve hücrelerin ACTB proteinleri bakımından zengin olması, bu protein miktarındaki ilave artışın viral replikasyonun seyrini etkilememesi olağan karşılanabilir bir durumdur. Benzer şekilde immün çöktürme deneylerinde PA proteini ile negatif sonuç veren amino-terminal bölgesi delesyonlu ACTB Δ 2-3/ACTB Δ 3 proteinler ve ACTB Δ 4 proteini için de aynı sonuca varılabilir. Buna karşın, hücrelerde PA proteini ile etkileşim gösterdiği saptanan karboksil-terminal bölgesi delesyonlu ACTB Δ 5-6 ve ACTB Δ 6 proteinlerindeki artışın viral replikasyonu etkilemesi beklenirdi. Bu sonucun nedeni, hücrelerde normalde fazla miktarlarda bulunan doğal endojen ACTB proteinlerin baskın olmasından kaynaklanabilir. Bir diğer olasılık ise, hücre içi viral protein sentezi düzeyini etkilemekle birlikte, daha ileri evrede virüs kurulumu üzerinde etkili olabilir. Bunun için enfekte kültürlerde serbestleşen virüs miktarlarının titrasyonu gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında, daha önce maya ikili hibrit metodu ile yapılan çalışma sonucunda influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitesi

PA proteini ile ilişkisi saptanan insan ACTB proteininin, memeli hücresinde de olası ilişkisi birlikte immün çöktürme testleri ve immünfloresan teknikler ile araştırıldı. Birlikte immün çöktürme testleri ACTB proteininin özellikle amino-terminal bölgesinin viral PA proteini ile ilişkili olduğu; bu ilişki de PA proteinin karboksil-terminal yarımının (cPA) önem taşıdığı ortaya kondu. Plazmitler üzerinden HeLa hücrelerinde geçici olarak sentez edilen ACTB ve PA proteininin immün lokalizasyon sonuçları immün çöktürme testleri ile elde edilen bulguları destekler nitelikte bulundu. Bu veriler influenza virüsü kurulumu açısından önemli olan vRNP'lerin sitoplazmada taşınması sürecinde ACTB proteinlerinin rolü olabileceğini gösterdi.



8. KAYNAKLAR

- Abdelwhab EM, Hafez HM: An overview of the epidemic of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Egypt: epidemiology and control challenges. *Epidemiol Infect* 2011;139:647-657.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK: RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003;67:657-685.
- Asha K, Kumar B: Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J Clin Med* 2019;8.
- Baglioni C, Maroney PA, West DK: 2'5'Oligo(A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon-treated HeLa cells. *Biochemistry* 1979;18:1765-1770.
- Ball LA: Induction of 2'5'-oligoadenylate synthetase activity and a new protein by chick interferon. *Virology* 1979;94:282-296.
- Basu D, Walkiewicz MP, Frieman M, Baric RS, Auble DT, Engel DA: Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J Virol* 2009;83:1881-1891.
- Blancar MA, Rutter WJ: Interaction cloning: identification of a helix-loop-helix zipper protein that interacts with c-Fos. *Science* 1992;256:1014-1018.
- Blobel G, Dobberstein B: Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol* 1975a;67:852-862.
- Blobel G, Dobberstein B: Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 1975b;67:835-851.
- Bonjardim CA: Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect* 2005;7:569-578.
- Bouvier NM, Palese P: The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008;26 Suppl 4:D49-53.

- Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR: Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. *J Virol* 2000;74:1781-1786.
- Bunn SJ, Ait-Ali D, Eiden LE: Immune-neuroendocrine integration at the adrenal gland: cytokine control of the adrenomedullary transcriptome. *J Mol Neurosci* 2012;48:413-419.
- Burleigh LM, Calder LJ, Skehel JJ, Steinhauer DA: Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J Virol* 2005;79:1262-1270.
- Büchen-Osmond. International Committee on Taxonomy of Viruses Index of Viruses - Orthomyxovirus (2006). In: ICTVdB-The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York.
- Carroll TD, Matzinger SR, Barry PA, McChesney MB, Fairman J, Miller CJ: Efficacy of influenza vaccination of elderly rhesus macaques is dramatically improved by addition of a cationic lipid/DNA adjuvant. *J Infect Dis* 2014;209:24-33.
- Centers for Disease C, Prevention: Evaluation of rapid influenza diagnostic tests for detection of novel influenza A (H1N1) Virus - United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:826-829.
- Chelbi-Alix MK, Thang MN: Multiple molecular forms of interferon display different specific activities in the induction of the antiviral state and 2'5' oligoadenylate synthetase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;141:1042-1050.
- Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J: Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* 2007;89:713-718.
- Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL: Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol* 2018;9:320.
- Cooper GM. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Boston University: Sinauer Associates, Inc.
- Couch RB, Kasel JA: Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:529-549.
- Couch RB: Orthomyxoviruses; in th, Baron S (eds): *Medical Microbiology*. Galveston (TX), 1996.
- Çalışkan Eryeğen K, Solunumsal Patojen Virüsler ve İnfluenza A H1N1 (domuz gribi)'nin Multipleks PZR Yöntemleri ile Tanısı; Afyon Kocatepe Üniversitesi,

2011.

Çıblak Akçay M, Türkiye’de İnfluenza A (H1N1, H3N2) İzolatlarında Antiviral

Direnç Mutasyonlarının Araştırılması; İstanbul, İstanbul University, 2011.

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

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

Dingwall C, Robbins J, Dilworth SM, Roberts B, Richardson WD: The nucleoplasmin nuclear location sequence is larger and more complex than that of SV-40 large T antigen. *The Journal of cell biology* 1988;107:841-849.

Dominguez R, Holmes KC: Actin structure and function. *Annu Rev Biophys* 2011;40:169-186.

Dou D, Revol R, Ostbye H, Wang H, Daniels R: Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front Immunol* 2018;9:1581.

Drubin DG, Jones HD, Wertman KF: Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol Biol Cell* 1993;4:1277-1294.

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

Ferguson L, Olivier AK, Genova S, Epperson WB, Smith DR, Schneider L, Barton K, McCuan K, Webby RJ, Wan XF: Pathogenesis of Influenza D Virus in Cattle. *J Virol* 2016;90:5636-5642.

Ferhadian D, Contrant M, Printz-Schweigert A, Smyth RP, Paillart JC, Marquet R: Structural and Functional Motifs in Influenza Virus RNAs. *Front Microbiol* 2018;9:559.

Fiore AE, Fry A, Shay D, Gubareva L, Bresee JS, Uyeki TM, Centers for Disease C, Prevention: Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of influenza recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* 2011;60:1-24.

Fletcher DA, Mullins RD: Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 2010;463:485-492.

- Flint, S. J. (2004) Principles of virology : molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses, 2nd ed., ASM Press, Washington, D.C.
- Flynn O, Gallagher C, Mooney J, Irvine C, Ducatez M, Hause B, McGrath G, Ryan E: Influenza D Virus in Cattle, Ireland. *Emerg Infect Dis* 2018;24:389-391.
- Fukuyama S, Kawaoka Y: The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr Opin Immunol* 2011;23:481-486.
- Galabru J, Hovanessian A: Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem* 1987;262:15538-15544.
- Garulli B, Castrucci MR: Protective immunity to influenza: lessons from the virus for successful vaccine design. *Expert Rev Vaccines* 2009;8:689-693.
- Gelderblom HR: Structure and Classification of Viruses; in th, Baron S (eds): *Medical Microbiology*. Galveston (TX), 1996.
- Gething MJ, Bye J, Skehel J, Waterfield M: Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. *Nature* 1980;287:301-306.
- Gloeckner CJ, Boldt K, Ueffing M: Strep/FLAG tandem affinity purification (SF-TAP) to study protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci* 2009;Chapter 19:Unit19 20.
- Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW: TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. *J Immunol* 2007;178:5200-5208.
- Graham FL, van der Eb AJ: A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 1973;52:456-467.
- Grigoryan G, Moore DT, DeGrado WF: Transmembrane communication: general principles and lessons from the structure and function of the M2 proton channel, K(+) channels, and integrin receptors. *Annu Rev Biochem* 2011;80:211-237.
- Grove J, Marsh M: The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol* 2011;195:1071-1082.

- Gultyaev AP, Fouchier RA, Olsthoorn RC: Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int Rev Immunol* 2010;29:533-556.
- Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC: The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci* 2015;128:2009-2019.
- Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM: Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol* 1983;64 (Pt 1):177-182.
- Hanukoglu I, Tanese N, Fuchs E: Complementary DNA sequence of a human cytoplasmic actin. Interspecies divergence of 3' non-coding regions. *J Mol Biol* 1983;163:673-678.
- 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.
- Hay AJ, McCauley JW: The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)-A future perspective. *Influenza Other Respir Viruses* 2018.
- Heldt FS, Frensing T, Reichl U: Modeling the intracellular dynamics of influenza virus replication to understand the control of viral RNA synthesis. *J Virol* 2012;86:7806-7817.
- Honda A, Mukaigawa J, Yokoiyama A, Kato A, Ueda S, Nagata K, Krystal M, Nayak DP, Ishihama A: Purification and molecular structure of RNA polymerase from influenza virus A/PR8. *J Biochem* 1990;107:624-628.
- Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A: RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. *J Biochem* 1988;104:1021-1026.
- Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM: Influenza pandemics: past, present and future. *J Formos Med Assoc* 2006;105:1-6.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96:23-28.
- Isaacs A, Lindenmann J: Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987;7:429-438.

- Janmey PA, Lamb JA, Ezzell RM, Hvidt S, Lind SE: Effects of actin filaments on fibrin clot structure and lysis. *Blood* 1992;80:928-936.
- Jones HW, Jr., McKusick VA, Harper PS, Wu KD: George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol* 1971;38:945-949.
- Jones LD, Nuttall PA: Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989;83:712-714.
- Kakar M, Davis JR, Kern SE, Lim CS: Optimizing the protein switch: altering nuclear import and export signals, and ligand binding domain. *J Control Release* 2007;120:220-232.
- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE: A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 1984;39:499-509.
- Kawaoka Y, Neumann G: Influenza viruses: an introduction. *Methods Mol Biol* 2012;865:1-9.
- Kim D, Rossi J: RNAi mechanisms and applications. *Biotechniques* 2008;44:613-616.
- Kimura T, Hashimoto I, Nishikawa M, Fujisawa JI: A role for Rev in the association of HIV-1 gag mRNA with cytoskeletal beta-actin and viral protein expression. *Biochimie* 1996;78:1075-1080.
- Koonin EV, Senkevich TG, Dolja VV: The ancient Virus World and evolution of cells. *Biol Direct* 2006;1:29.
- Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H: Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin alpha. *J Biol Chem* 2009;284:478-485.
- Kotila T, Kogan K, Enkavi G, Guo S, Vattulainen I, Goode BL, Lappalainen P: Structural basis of actin monomer re-charging by cyclase-associated protein. *Nat Commun* 2018;9:1892.
- Krachmarova E, Tileva M, Lilkova E, Petkov P, Maskos K, Ilieva N, Ivanov I, Litov L, Nacheva G: His-FLAG Tag as a Fusion Partner of Glycosylated Human Interferon-Gamma and Its Mutant: Gain or Loss? *Biomed Res Int* 2017;2017:3018608.
- Kuchipudi SV, Nissly RH: Novel Flu Viruses in Bats and Cattle: "Pushing the Envelope" of Influenza Infection. *Vet Sci* 2018;5.

- 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. *Biomed Pharmacother* 2000;54:188-195.
- La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC: A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007;85:85-92.
- Lagace-Wiens PR, Rubinstein E, Gumel A: Influenza epidemiology--past, present, and future. *Crit Care Med* 2010;38:e1-9.
- Lamb RA, Choppin PW: Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4908-4912.
- Lamb RA, Choppin PW: The gene structure and replication of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 1983;52:467-506.
- Lee SH, Dominguez R: Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Mol Cells* 2010;29:311-325.
- Leser GP, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology* 2005;342:215-227.
- Letteboer SJ, Roepman R: Versatile screening for binary protein-protein interactions by yeast two-hybrid mating. *Methods Mol Biol* 2008;484:145-159.
- 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. *J Infect Dis* 2015;212:1726-1734.
- Lievens S, Lemmens I, Tavernier J: Mammalian two-hybrids come of age. *Trends Biochem Sci* 2009;34:579-588.
- Lin JS, Lai EM: Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol Biol* 2017;1615:211-219.

- Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.
- Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ: Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol* 2013;529:227-240.
- Lui YL, Lin Z, Lee JJ, Chow VT, Poh CL, Tan EL: Beta-actin variant is necessary for Enterovirus 71 replication. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;433:607-610.
- Ma W, Kahn RE, Richt JA: The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. *J Mol Genet Med* 2008;3:158-166.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Matsuoka Y, Matsumae H, Katoh M, Eisfeld AJ, Neumann G, Hase T, Ghosh S, Shoemaker JE, Lopes TJ, Watanabe T, Watanabe S, Fukuyama S, Kitano H, Kawaoka Y: A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC Syst Biol* 2013;7:97.
- Mattaj IW, Englmeier L: Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem* 1998;67:265-306.
- Mayer BJ, Jackson PK, Van Etten RA, Baltimore D: Point mutations in the abl SH2 domain coordinately impair phosphotyrosine binding in vitro and transforming activity in vivo. *Mol Cell Biol* 1992;12:609-618.
- McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL: Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* 2019;10:39.
- McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz HG, Weeds AG: Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 1993;364:685-692.
- Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A: Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication. *J Virol* 1999;73:1186-1194.
- Merrick WC: Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 1992;56:291-315.

- Mikulasova A, Vareckova E, Fodor E: Transcription and replication of the influenza A virus genome. *Acta Virol* 2000;44:273-282.
- Moasser E, Moasser A, Zaraket H: Incidence of antiviral drug resistance markers among human influenza A viruses in the Eastern Mediterranean Region, 2005-2016. *Infect Genet Evol* 2019;67:60-66.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G: The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* 1999;19:1069-1098.
- Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ: The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Crit Care Med* 2010;38:e10-20.
- Nagano Y, Kojima Y: [Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1958;152:1627-1629.
- Nakajima K: [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. *Nihon Rinsho* 2003;61:1897-1903.
- Nakajima-Iijima S, Hamada H, Reddy P, Kakunaga T: Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:6133-6137.
- 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. *EMBO J* 2000;19:6751-6758.
- Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA: Influenza B virus in seals. *Science* 2000;288:1051-1053.
- Palese P, Schulman JL: Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *J Virol* 1976;17:876-884.
- Palese P, Howley P.M., *Orthomyxoviridae: The Viruses And Their Replication*, Philadelphia, 2007.
- Parrish CR, Murcia PR, Holmes EC: Influenza virus reservoirs and intermediate hosts: dogs, horses, and new possibilities for influenza virus exposure of humans. *J Virol* 2015;89:2990-2994.

- Persson M, Gullberg M, Tolf C, Lindberg AM, Mansson A, Kocer A: Transportation of nanoscale cargoes by myosin propelled actin filaments. *PLoS One* 2013;8:e55931.
- Phizicky EM, Fields S: Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* 1995;59:94-123.
- Plotch SJ, Bouloy M, Ulmanen I, Krug RM: A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell* 1981;23:847-858.
- Raynard RS, Murray AG, Gregory A: Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. *Dis Aquat Organ* 2001;46:93-100.
- Reed SE, Staley EM, Mayginnes JP, Pintel DJ, Tullis GE: Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods* 2006;138:85-98.
- Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J: The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. *RNA Biol* 2011;8:207-215.
- Rubenstein PA: The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays* 1990;12:309-315.
- Samji T: Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* 2009;82:153-159.
- Samson M, Pizzorno A, Abed Y, Boivin G: Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res* 2013;98:174-185.
- Samuel CE: Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:778-809, table of contents.
- Schuh M: An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol* 2011;13:1431-1436.
- Schutze MP, Peterson PA, Jackson MR: An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *The EMBO journal* 1994;13:1696-1705.
- Schwartz AL: Cell biology of intracellular protein trafficking. *Annual review of immunology* 1990;8:195-229.
- Sen GC: Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001;55:255-281.

- Shortridge KF: The 1918 'Spanish' flu: pearls from swine? *Nat Med* 1999;5:384-385.
- Simiczjew A, Mazur AJ, Dratkiewicz E, Nowak D: Involvement of beta- and gamma-actin isoforms in actin cytoskeleton organization and migration abilities of bleb-forming human colon cancer cells. *PLoS One* 2017;12:e0173709.
- Smith BJ, Colman PM, Von Itzstein M, Danyelec B, Varghese JN: Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase. *Protein Sci* 2001;10:689-696.
- Song JM, Wang BZ, Park KM, Van Rooijen N, Quan FS, Kim MC, Jin HT, Pekosz A, Compans RW, Kang SM: Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PLoS One* 2011;6:e14538.
- Stambas J, Guillonneau C, Kedzierska K, Mintern JD, Doherty PC, La Gruta NL: Killer T cells in influenza. *Pharmacol Ther* 2008;120:186-196.
- Stinebring WR: Introduction: the interferon system. *In Vitro Monogr* 1974:1-3.
- Stornaiuolo M, Lotti LV, Borgese N, Torrisi MR, Mottola G, Martire G, Bonatti S: KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Molecular biology of the cell* 2003;14:889-902.
- Straus WL: The United States vaccine supply: challenges in preparing for an avian influenza pandemic. *Yale J Biol Med* 2005;78:255-264.
- Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M: Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* 2017;8:1580-1591.
- Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA: 2009 H1N1 influenza. *Mayo Clin Proc* 2010;85:64-76.
- Takahashi Y: Co-immunoprecipitation from transfected cells. *Methods Mol Biol* 2015;1278:381-389.
- Taubenberger JK: The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. *Arch Virol Suppl* 2005:101-115.
- Teasdale RD, Jackson MR: Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annual review of cell and developmental biology* 1996;12:27-54.

- Thomis DC, Samuel CE: Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* 1993;67:7695-7700.
- Tscherne DM, Garcia-Sastre A: Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *J Clin Invest* 2011;121:6-13.
- Turan K, Mibayashi M, Sugiyama K, Saito S, Numajiri A, Nagata K: Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res* 2004;32:643-652.
- Us AD, Pandemik İnfluenza İnfeksiyonunda Etyopatogenez ve Laboratuvar Tanı Yöntemleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010;41:13-27.
- Vandekerckhove J, Weber K: At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 1978;126:783-802.
- Vavricka CJ, Li Q, Wu Y, Qi J, Wang M, Liu Y, Gao F, Liu J, Feng E, He J, Wang J, Liu H, Jiang H, Gao GF: Structural and functional analysis of laninamivir and its octanoate prodrug reveals group specific mechanisms for influenza NA inhibition. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002249.
- Vindin H, Gunning P: Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity. *J Muscle Res Cell Motil* 2013;34:261-274.
- Visa N, Percipalle P: Nuclear functions of actin. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a000620.
- Wagner RR: The Interferons: Biologic Basis for Their Role in Viral Infections. *Postgrad Med* 1964;35:512-517.
- Waldburger JM, Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Peretti M, Landmann S, Reith W: Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class II expression. *Immunol Rev* 2000;178:148-165.
- Wang J, Fang S, Xiao H, Chen B, Tam JP, Liu DX: Interaction of the coronavirus infectious bronchitis virus membrane protein with beta-actin and its implication in virion assembly and budding. *PLoS One* 2009;4:e4908.

- Weber F, Haller O, Kochs G: MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. *J Virol* 2000;74:560-563.
- Williams BR: Type I interferons (IFN) are essential mediators of innate and specific immunity against viruses. *Viral Immunol* 2002;15:1-2.
- Williams SC, Angerer ND, Johnson PF: C/EBP proteins contain nuclear localization signals imbedded in their basic regions. *Gene expression* 1997;6:371-385.
- Yang G, Wang Y, Zhao X, Han F, Wu S, Hou Y: [Antiviral effect of recombinant antibody to influenza virus HA antigen]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2002;16:337-340.
- Yewdell JW, Bennink JR: Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:579-606.
- Yuan J, Zhang X, Shi H, Chen J, Han X, Wei P, Feng L: The interaction of Rotavirus A pig/China/NMTL/2008/G9P[23] VP6 with cellular beta-actin is required for optimal RV replication and infectivity. *Vet Microbiol* 2016;197:111-121.
- Zhao M, Wang L, Li S: Influenza A Virus-Host Protein Interactions Control Viral Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 2017;18.
- Zmora P, Pöhlmann S. *New approaches to influenza therapy* Editors: A. Méndez-Vilas. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* Publisher: Formatex Research Center. 2015.
- Zykov MP: [Modern protection from influenza]. *Feldsher Akush* 1982;47:6-10.

9. EKLER

POSTERLER / POSTERS

P-089

Investigation of the Relationship Between Influenza A Virus RNA Polymerase and Human Actin Beta Protein

Nazife Gelmez¹, Erkan Rayaman¹, Atsushi Kawaguchi², Kadir Turan¹

¹Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Marmara University, Istanbul-Turkey

²Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan

Abstract

Influenza A viruses have segmented RNA genome composed of eight single stranded negative sense RNA molecules. Replication and transcription of viral RNAs are entirely dependent on the viral RNA polymerase. Viral RNA polymerase is a trimeric structure including of PB1, PB2 and PA subunits. These proteins are more conserved than other viral proteins in different influenza virus subtypes. This makes the viral RNA polymerase an ideal target for development of anti-influenza virus drugs. Therefore, elucidation of the relationship between viral RNA polymerase and host proteins have a vital importance.

In this work, we screened the potential human interactor proteins for influenza viral RNA polymerase PA subunit with yeast two-hybrid method. More than 15 host proteins, including actin beta were found related with PA protein in yeast cells. The interaction between human actin and viral PA protein was also investigated in human cells. Human actin beta complete cDNA was cloned into pCHA mammalian expression vector and obtained pCHA-ActB plasmid. A series of plasmid vectors encoding beta actins deleted some exonic domains were derived with inverse PCR from pCHA-ActB. The expression of actin genes and the localization of native and deleted actin proteins in transiently transfected HEK293 and/or HeLa cells were defined with western blotting and immunofluorescence techniques. The interaction between PA and actin proteins were investigated with co-immunoprecipitation assays and co-localization analysis of the proteins in the cells. Co-localization analysis of viral and host proteins was carried out with immunofluorescent staining and proximity ligation assay.

Immunoprecipitation and western blot analyses revealed interactions between virus PA protein and actin proteins in mammalian cells. It was observed that the N-terminal domains of actin and C-terminal half of PA have a role in interaction. This interaction was supported with confocal microscopic examinations. Actin beta proteins are essential components of actin filaments and highly conserved between species. The results obtained in this work suggest that actin filaments may have a role in intracellular traffic of influenza vRNPs consisting of the viral RNA, RNA polymerase subunits and NP in human cells.

*This work was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (grant number 112S518).

Keywords

Influenza A viruses, viral RNA polymerase, PA protein, human actin beta

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	NAZİFE	Soyadı	GELMEZ
Doğum Yeri	YENİMAHALLE	Doğum Tarihi	04.02.1992
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	30526780124
E-mail	n.gelmezz@hotmail.com	Tel	05388128843

Eğitim Bilgileri

	Mezun Olduğu Yer/Bölüm	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Biyokimya	2019
Lisans	Atatürk Üniversitesi/Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
Lise	Cahit Zarifoğlu Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Stajyer	Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	04.08.2014-12.09.2014

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	91,25							

Yabancı Dil Bilgisi

	Okuyup Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

Sınav Bilgileri

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES	74,085	73,590	66,559

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
MC Office Programları	İyi

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