



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNFLUENZA VİRÜSÜ NUKLEAR EKSPORT PROTEİNİ İLE
NUKLEOPORİN PROTEİNLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

BURÇAK ŞENBAŞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kadir TURAN

İSTANBUL – 2019

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)
Tez Sahibi : Burçak ŞENBAŞ AKYAZI
Tez Başlığı : İnfluenza Virüsü Nuklear Eksport Proteini ile Nukleoprotein
Proteinleri Arasındaki İlişkinin Moleküler Düzeyde Araştırılması
Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 27.03.2019

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Kurumu

İmza

Prof. Dr. Kadir TURAN

Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi



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 ..0.3./Nisan/..2019. tarih ve 3.2 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 çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burçak ŞENBAŞ

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi çalışmam boyunca bana her türlü imkânı sağlayan, tez konusunun belirlenmesi, çalışmanın planlanmasından uygulanmasına kadarki tüm süreçlerde ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşmayı kendine görev edinmiş olan, akademik çalışma ve bilimsel etik konularında kendime örnek aldığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum tez danışmanım sayın Prof. Dr. Kadir TURAN'a minnetle teşekkürlerimi sunarım.

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

Laboratuvar çalışmalarında desteğini benden esirgemeyen, hem okul hayatımda hem sosyal hayatımda çok kıymet verdiğim değerli dostum Şeyma ÖZAYDIN'a, bilgi birikiminden ve tecrübesinden sıkça yararlandığım Ayşegül PİRİNÇAL'a ve laboratuvar çalışmalarında bana eşlik eden ve her konuda yardımını gördüğüm Tuğba KOÇMAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca bana her konuda destek olan, bugünlere gelmemde emeği geçen, attığım her adımın arkasında duran ve çalışmalarım süresince bana anlayış ve fedakârlık gösteren değerli annem Hülya ŞENBAŞ ve kıymetli babam Şerafettin ŞENBAŞ 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın geri kalanına ortak olan, tüm çalışmalarında elinden gelen her türlü desteğini benden esirgemeyen, bana güç veren varlığını hep yanımda hissettiğim biricik eşim Yunus AKYAZI ' ya teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde ayrıca emeği olan herkese tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Burçak ŞENBAŞ

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Konu / No: İnfluenza Virüsü Nuklear Eksport Proteinini ile Nukleoporin Proteinleri Arasındaki İlişkinin Moleküler Düzeyde Araştırılması / SAG-C-YLP-131016-0438) ve TÜBİTAK (Konu/No: İnfluenza Virüs Patogenezinde Viral RNA Polimeraz Enzimi ve Konak Hücre Proteinlerinin Rolünün Araştırılması / 112S518) tarafından desteklenmiştir.

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

I. İÇİNDEKİLER

1 ÖZET	1
2 SUMMARY	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ	3
4 GENEL BİLGİLER	5
4.1. İnfluenza Virüsleri	5
4.2. Nukleoporinler ve Nukleusu ile Sitoplazma Arasında Moleküllerin Taşınması	18
4.3. Nuklear Transport Sisteminde NUP214 Proteininin Rolü	22
4.4. İnfluenza NS2 proteini ile Nuklear Por Kompleks Proteinleri Arasındaki İlişki	24
5 GEREÇ VE YÖNTEM	25
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
5.2. Enzimler	27
5.3. Ticari Kitler	27
5.4. Antikorlar	27
5.5. Cihaz ve Gereçler	28
5.6. Besiyerleri	29
5.6.1. Luria bertani (LB) sıvı besiyeri	29
5.6.2. Luria bertani agar (LBA) katı besiyeri	29
5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri	29
5.6.4. YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) besiyerleri	29
5.6.5. Sentetik dekstroz /+his+ade (SD+HA) besiyeri	29
5.6.6. Sentetik dekstroz /+trp+leu+his+ade (SD+TLHA) besiyeri	29

5.6.7. Sentetik dekstroz /+leu+his+ade (SD+LHA) besiyeri	30
5.7. Çözeltiler	30
5.7.1. Akrialmid/bis-akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid – a/h)	30
5.7.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (% 10 – a/h)	30
5.7.3. Bloklama çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu)	31
5.7.4. Etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml)	31
5.7.5. %70 Etil alkol	31
5.7.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0,5 M, pH: 8,0)..	31
5.7.7. Fenol : Kloroform : İzooamil Alkol (25:24:1)	31
5.7.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)	31
5.7.9. Glikoz çözeltisi (1 M)	32
5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)	32
5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)	32
5.7.12. Kapatma çözeltisi	32
5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0,55M)	32
5.7.14. % 10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi	32
5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi	32
5.7.16. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M) ...	32
5.7.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (% 40 – a/h)	33
5.7.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1,25 M)	33
5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi	33
5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)	33
5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2,5 M)	33
5.7.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (% 7,5)	33
5.7.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10 –a/h)	33
5.7.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (% 10 –a/h)	33
5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)	33
5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M)	34
5.7.27. Tripsin çözeltisi (% 0,25 –a/h)	34
5.7.28. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h)	34
5.7.29. Tween-20 çözeltisi (%10-w/v)	34

5.7.30. 10x Konsantre amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (Drop Out: DO)	34
5.7.31. 100x Konsantre lösin (Leu) çözeltisi	34
5.7.32. 100x Konsantre histidin (His) çözeltisi	34
5.7.33. 100x Konsantre triptofan (Trp) çözeltisi	34
5.7.34. 50x Konsantre adenin (Ade) çözeltisi	35
5.7.35. 3- Amino-1, 2, 4-triazole (3-AT) çözeltisi (1 M)	35
5.7.36. Dekstroz çözeltisi (% 20 –a/h).....	35
5.7.37. Lityum asetat çözeltisi (1M)	35
5.7.38. Lityum asetat/PEG/ssDNA çözeltisi	35
5.7.39. Lityum asetat/TE çözeltisi (100 mM LiAc / 10 mM Tris-Cl / 1mM EDTA).....	35
5.7.40. Magnezyum sülfat çözeltisi (0,5 M)	35
5.7.41. Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM)	35
5.7.42. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM)	36
5.7.43. Sodyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM)	36
5.7.44. Di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM)	36
5.7.45. Sodyum karbonat çözeltisi (1M)	36
5.7.46. Salmon sperm DNA (ssDNA) çözeltisi (5 mg/ml)	36
5.7.47. Orto-nitrofenil β -galaktozid (ONPG) çözeltisi (4 mg/ml)	36
5.8. Tamponlar	37
5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu	37
5.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8,0)	37
5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0,2 N NaOH, % 1 SDS)	37
5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum: 5 M Asetat) ...	37
5.8.5. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu	37
5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu	37
5.8.7. 10x Konsantre MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonik asit] tamponu.....	37
5.8.8. 4x Konsantre ayırma jel tamponu (1,5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8,8).....	38

5.8.9. 4x Konsantre paketleme jel tamponu (0,5 M Tris, % 0,4 – a/h SDS, pH:6,8).....	38
5.8.10. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0,125 M Tris,1,25 M Glisin, pH: 8,3).....	38
5.8.11. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, % 0,1 – a/h SDS, pH 8,3)	38
5.8.12. Protein transfer tamponu	38
5.8.13. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0,2 bromophenol mavisi – a/h ; % 4 2-merkaptoetanol - h/h; % 40 gliserin– h/h, pH:6,8)	38
5.8.14. RIPA tamponu (50 mM Tris, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl; % 1 NP-40, % 0,5 sodyum deoksikolat; % 0,1 SDS).....	38
5.8.15. Sodyum asetat tamponu (3 M)	39
5.8.16. Tris-HCl tamponu (1 M, pH: 8,0)	39
5.8.17. Tris / EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH: 8,0)	39
5.8.18. 20x Konsantre TBS tamponu	39
5.8.19. TBS ve TBS-T tamponu	39
5.8.20. Potasyum fosfat tamponu (50 mM pH: 7,5)	39
5.8.21. Sodyum fosfat tamponu (200 mM pH: 7,0)	39
5.8.22. Z tamponu (100 mM fosfat tamponu, 10 mM KCl, 1mM MgSO4)	39
5.8.23. Z (+) tamponu	40
5.9. Pilazmit Vektörler	40
5.10. <i>Escherichia coli</i>	40
5.11. Virüsler	40
5.12. Memeli Hücre Hatları	40
5.13. Maya Hücresi	41
5.14. Çalışmada Kullanılan Oligonukleotid Primerler	41
5.15. Transformasyon için <i>Escherichia coli</i> Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi	41

5.16. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez	42
.....	
5.17. RNA Analizleri için Formaldehitli Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez	42
.....	
5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi	43
.....	
5.19. İnsan NUPL2 ve NUP214 cDNA'larının Hazırlanması	43
5.19.1. HEK-293 hücrelerinden total RNA'nın izole edilmesi	43
5.19.2. Reverz transkripsiyon ile HEK293 cDNA'larının elde edilmesi..	43
5.19.3. NUPL2 ve NUP214 cDNA'larının PZR ile çoğaltılması.....	44
5.19.4. PZR ile çoğaltılan cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılması.....	45
5.20. Maya ikili-hibrit testleri için NUPL2 ve NUP214 genlerinin pACT2 plazmitine yeniden klonlanması	46
5.20.1. pACT2 plazmir DNA'sının Ligasyon için hazırlanması.....	46
5.20.2. pACT2-NUPL2 ve pACT2-NUP214ct vektörlerin oluşturulması.....	46
5.20.3. Koloni-PZR ile transformant kolonilerin seçilmesi	47
5.20.4. Transformant kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu	48
5.20.5. Plazmit DNA'ların restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi.....	48
5.20.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırılması ve DNA dizi analizleri	49
5.21. Memeli Hücrlerinde NUPL2, NUP214 ve NS2 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması	49
5.21.1. HA uzantılı NUPL2 ve NUP214 proteinlerinin kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması	49
5.21.2. Flag uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması...	50
5.21.3. GST uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması ..	52
5.22. Orta-Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması	54
5.23. Plazmit DNA'larının Memeli Hücrlerine Transfeksiyonu	54

5.24. Memeli Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Tekniği ile Analiz Edilmesi.....	55
5.24.1. HEK-293 hücrelerinin NUPL2, NUP214 ve NS2 genleri taşıyan plazmitler ile transfeksiyonu ve hücre lizatlarının hazırlanması	55
5.24.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması	56
5.24.3. Proteinlerin PVDF membranlara transferi	56
5.24.4. Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi	57
5.25. Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının İmmünfluoresan Teknikler ile Belirlenmesi.....	57
5.26. Konak Proteinleri (NUPL2 ve NUP214) ile NS2 proteini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması	58
5.26.1. İki Farklı Proteinin Hücre İçi Birlikte-Lokalizasyonlarının İmmünfluoresan Teknikler ile Analizi	58
5.26.2. Birlikte immun çöktürme	58
5.26.3. GST ile çöktürme yöntemi	59
5.27. NUPL2 ve NUP214_{ct} Proteinlerinin Aşırı Ekspresyonlarının İnfluenza Virüs Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması	60
6 BULGULAR	61
6.1. İnsan NUP214 ve NUPL2 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Bulgular	61
6.2. İnfluenza Virüsü NS2 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Bulgular	61
6.3. Konak hücre genleri (NUP214 ve NUPL2) ve İnfluenza Virüsü NS2 geni Taşıyan Plazmit Vektörlerin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ile İlgili Veriler	78
6.3.1. İnsan NUP214 _{ct} ve NUPL2 proteinlerinin Western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları	78
6.3.2. İnsan NUP214 _{ct} ve NUPL2 proteinlerinin İmmünfluoresan teknikler ile analizi sonuçları	79
6.3.3. NS2 proteinlerinin Western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları	80

6.4. Maya İkili-Hibrit Metodu ile Elde Edilen Sonuçlar	81
6.5. Hücrelerde Birlikte Sentez Edilen İnsan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri ile NS2 Proteinlerinin Lokalizasyonlarının İmmünfluoresan Teknikler ile Analizi Sonuçları.....	82
6.6. Hücrelerde Birlikte Sentez Edilen İnsan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri ile NS2 Proteinlerinin Birlikte Çöktürme Teknikleri ile Analizi Sonuçları	86
6.7. NUP214_{ct} ve NUPL2 Protein Miktarları Arttırılan Hücrelerde İnfluenza A Virüsü Replikasyonunun Seyri ile İlgili Veriler	89
7 TARTIŞMA	91
8 KAYNAKLAR.....	100
9 EKLER	110
10 ÖZGEÇMİŞ	111

III. KISALTMALAR

°C	Santigrat derece
a/h	Ağırlık/hacim
Ade	Adenin
APS	Amonyum persülfat
Bç	Baz çifti
D'MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	Etidyum bromür
FCS	Fetal buzağı serumu
FITC	Floresan izosiyanat
Flag	DYKDDDDK (D=aspartik asit, Y=tirozin, K=lizin)
FTS	Fizyolojik tuzlu su
Gr	Gram
GST	Gulutatyon S Transferaz
g/L	Gram/litre
h/h	Hacim/hacim
HA	Hemaglutinin
HEK-293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
kDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
Leu	Lösin
LiAc/PEG	Lityum Asetat / polietilen glikol
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MOPS	3- (N-morpholino) propanesulfonik asit
NA	Nöraminidas

NEP	(İng. nuklear export protein)
NS2	(İng. non-structurel protein2) Viral yapısal olmayan protein 2
NUP214	Nukleoporin 214 proteini
NUPL2	(İng. Nucleoporin-like 2) Nukleoporin benzeri 2 proteini
OD	Optik dansite
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PEI	Polietilenimin
PIPES	1,4-piperazindietansülfonik asit
PKA	Protein kinaz A
PVDF	polivinilidenflorit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIPA	ing. Radioimmunoprecipitation Assay
RNP	Ribonükleoprotein kompleksi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ssDNA	Salmon sperm DNA
TAE	Tris-Asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin
U	Ünite
UV	Ultraviyole
YNB	Maya azot kaynağı (yeast nitrogen base)
YPAD	Maya özütü (adenin içeren) besiyeri
w/w	Ağırlık/ağırlık
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnfluenza A virüslerinin enfeksiyon yaptığı organizmalar ve virüs tipleri	6
Şekil 2. İnfluenza A virüslerinde nokta mutasyonları sonucu meydana gelen antijenik sapmalar	7
Şekil 3. İnfluenza A virüslerinde büyük antijenik değişmelere yola açan antijenik kaymalar (antijenik shift)	8
Şekil 4. İnfluenza A virüsü M2 kanal proteinin inhibe eden amantadin ve rimantadinin molekül yapıları (A), bu moleküllerin M2 kanal proteinine bağlanma şekli (B) ve virüsün endozomdan serbest kalmasını bloke etme mekanizmaları (C)	10
Şekil 5. İnfluenza virüslerinin konak hücrelere tutunmasında işlev gören reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri (A), virüs replikasyonunun son evresini inhibe eden sialik asit analogu olan NA inhibitörleri (B) ve NA inhibitörlerinin etki mekanizması (C)	11
Şekil 6. Tek iplikli RNA molekülünün NP ve PNA polimeraz enzimi alt üniteleri ile oluşturduğu viral ribonukleoprotein partikül (vRNP) (A) İnfluenza A virüslerin genomunu oluşturan RNA segmentleri ve bu RNA'lar üzerinden kodlanan proteinler (B)	13
Şekil 7. İnfluenza virüs partikülü çizimsel görünümü	14
Şekil 8. İnfluenza A virüs moleküler yapısı ve yaşam döngüsü. 1. Tutunma (adsorbsiyon), 2. Giriş (penetrasyon), 3. Kot atma, 4. Transkripsiyon, 5. Translasyon, 6. Replikasyon, 7. Kurulma, 8. Serbestleşme	15
Şekil 9. İnfluenza virüsü 8.RNA segmenti ve bu segment üzerinden kodlanan yapısal olmayan (<i>Ing. non-structurel: NS</i>) proteinler (NS1 ve NS2)	17
Şekil 10. Nuklear por kompleksinin yapısı	19
Şekil 11. Moleküllerin NPC aracılığıyla nukleus-sitoplazma arası taşınması	21
Şekil 12. İnsan nuklear por kompleksi yapısına katılan nükleoporinlerin ve bu proteinlerin lokalizasyonu	23

Şekil 13. HEK293 hücrelerden izole edilen total RNA'ların formaldehitli agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	62
Şekil 14. HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan NUP214 _{ct} ve NUPL2 cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	66
Şekil 15. BglIII restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pACT2 plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	66
Şekil 16. NUP214 _{ct} ve NUPL2 cDNA'larının pACT2 plazmitine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları	67
Şekil 17. DraI ve XbaI restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen pACT-NUP214 _{ct} (A) ve pCHA-NUPL2 (B) plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	67
Şekil 18. pACT2 plazmitine klonlanan NUP214 _{ct} ve NUPL2 genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	68
Şekil 19. EcoRV restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	69
Şekil 20. NUP214 _{ct} ve NUPL2 cDNA'larının pCHA plazmitine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları	69
Şekil 21. pCHA-NUP214 _{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmit vektörlerin restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	70
Şekil 22. pCHA plazmitine klonlanan NUP214 _{ct} ve NUPL2 genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları	71
Şekil 23. pGBD-NS2 plazmit vektörü üzerinden PZR ile çoğaltılan başlangıç ve bitim kodonları taşıyan doğal NS2 (1), bitim kodonu taşımayan NS2 (2) ve 5'-ucunda flag uzantısı taşıyan NS2 (3) cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	72
Şekil 24. Flag ya da GST uzantılı NS2 kodlayan vektörlerin oluşturulmasında kullanılmak üzere restriksiyon enzimi ile kesilerek ya da terz PZR ile çoğaltarak doğrusal hale getirilen plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	73
Şekil 25. pCAGGS plazmitinde iki farklı oryantasyonda Flag uzantısı taşıyan NS2 geninin klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları	74

Şekil 26. pCAGGS plazmitinde iki farklı oryantasyonda GST uzantısı taşıyan NS2 geninin klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları	74
Şekil 27. HindIII restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen pCAGGS-Flag.NS2 (1) ve pCAGGS-NS2.Flag (2) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	75
Şekil 28. HindIII restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen pCAGGS-NS2.GST (1) ve pCAGGS-GST.NS2 (2) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi	76
Şekil 29. pCAGGS plazmitinde Flag ya da GST uzantılı olarak klonlanan NS2 genlerine ait DNA dizi analizleri kromatogramları	77
Şekil 30. pCHA-NUP214 _{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde HA uzantılı NUP214 _{ct} (1) ve NUPL2 (2) proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme ile incelenmesi	78
Şekil 31. pCHA-NUP214 _{ct} veya pCHA-NUPL2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı H-NUP214 _{ct} ve H-NUPL2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi	79
Şekil 32. Flag ya da GST uzantılı NS2 proteinleri kodlayan plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde Flag.NS2 (1), NS2.Flag (2), NS2.GST (3) ve GST.NS2 (4) proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelenmesi	80
Şekil 33. pACT2-NUP214 _{ct} /pGBD-NS2, pACT2-NUPL2/pGBD-NS2 ve pACT2/pGBD-C1(kontrol) plazmit çiftleri ile transforme edilen <i>S. cerevisiae</i> PJ69-4A maya ırkının SD(-) seçici besi ortamında gösterdiği üreme profilleri	81
Şekil 34. pCAGGS-NS2.Flag veya pCAGGS-Flag.NS2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan Flag uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi	82
Şekil 35. pCAGGS-NS2.GST veya pCAGGS-GST.NS2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan GST uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi	83
Şekil 36. H-NUP214 _{ct} ve NS2 kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde H-NUP214 _{ct} ile flag ya da GST uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi	84

Şekil 37. H-NUPL2 ve Flag uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi	85
Şekil 38. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-NUP214 _{ct} proteini ve NS2 proteinlerinin birlikte çöktürme ve sonrasında SDS-PAGE/Western melezleme tekniği analiz edilmesi	87
Şekil 39. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-NUPL2 proteini ve GST uzantılı NS2 proteinlerinin glutatyon sefaroza ile birlikte çöktürme ve sonrasında SDS-PAGE/Western melezleme tekniği analiz edilmesi	88
Şekil 40. pCHA-NUP214 _{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmitleri ile transfekte edilen ve transfeksiyondan 48 saat sonra influenza A virüsleri ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinde H-NUP214 _{ct} (1), H-NUPL2 (2) ve influenza A virüsü PA proteinlerinin Western melezleme ile analiz edilmesi	90

i. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında kullanılan oligonukleotid primerler 41



Başlık : **İnfluenza Virüsü Nuklear Eksport Proteini ile Nukleoporin Proteinleri Arasındaki İlişkinin Moleküler Düzeyde Araştırılması**

Öğrencinin Adı : Burçak ŞENBAŞ

Danışman : Prof. Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı : Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: İnfluenza A virüsleri insanlarda tekrarlayan grip salgınlara yol açan viral bir patojendir. Diğer RNA virüslerinin aksine bu virüslerin replikasyon ve transkripsiyonları konak hücre nükleusunda gerçekleşir. Dolayısıyla viral ribonukleoprotein partiküllerinin nükleo-sitoplazmik transportu gereklidir. Virüs replikasyonu için önemli olan bu olayda viral nüklear eksport proteini (NEP) olarak da bilinen NS2 proteini ve konak hücre nükleoporinleri işlev görmektedir. Transport olayının moleküler düzeyde mekanizması çok iyi bilinmemektedir. Bu çalışmada, nüklear transportta iş gören NUP214 ve NUPL2 proteinleri ile viral NS2 proteininin memeli hücrelerinde ilişkilerinin aydınlatılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Farklı bir çalışma kapsamında maya ikili-hibrit metodu ile ilişkilendirilen NUP214 ve NUPL2 ile viral NS2 proteinleri arasındaki etkileşimi memeli hücrelerinde araştırmak için birlikte immün-lokalizasyon ve birlikte çöktürme testlerinden yararlanıldı. Bunun için insan NUP214 ve NUPL2 ile viral NS2 proteinlerini kodlayan plazmitler oluşturuldu. Bu plazmitler ile geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde nüklear por kompleksi proteinleri ile influenza A virüsü NS2 proteinin hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile saptandı. Benzer şekilde plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlanan lizatlarda spesifik antikorlar kullanılarak ya da glutatyon sefaroza ile söz konusu proteinler çöktürüldü ve çökelen proteinler SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile analiz edildi.

Bulgular ve Sonuç: İmmünfloresan testler, geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde NS2 ve NUP214 proteinlerinin birlikte lokalize olduklarını saptadı. İmmün çöktürme ve glutatyon sefaroza ile çöktürme testlerinde de NS2 ve NUP214 proteinlerin birlikte çöktüğü görüldü. HEK293 hücrelerinde NUP214'ün aşırı ekspresyonunun influenza A virüsü replikasyonunu negatif yönde etkilediği saptandı. İnfluenza NS2 proteini ile NUPL2 arasında uygulanan koşullarda beklenen etkileşim saptanamadı.

Anahtar Kelimeler: Nukleoporin, NUP214, NUPL2, NS2, İnfluenza

2. SUMMARY

Title : Investigation of the Relationship between Influenza Virus Nuclear Export Protein and Nucleoporins at Molecular Level

Student's name : Burçak ŞENBAŞ

Supervisor : Prof. Dr. Kadir TURAN

Department : Department of Biochemistry

Aim: Influenza A viruses are viral pathogens that cause recurrent epidemics in humans. Unlike other RNA viruses, replication and transcription of influenza occur in the cell nucleus. Therefore, nucleic-cytoplasmic transport of vRNPs are required. In this event, which is important for virus replication, NS2 protein (also known as NEP), ve nucleoporins are involved. The molecular mechanism of the transport is not known well. In this study, we aimed to elucidate the relationship between NUP214 and NUPL2 proteins and NS2 in mammalian cells.

Material and Methods: To investigate the interaction between NUP214 and NUPL2 and viral NS2 proteins in mammalian cells, are relationship was shown with yeast two-hybrid method in a different project, co-immunolocalization and co-precipitation tests were carried out. For this, the plasmids encoding human NUP214 and NUPL2 and viral NS2 proteins were constructed. The localization of influenza NS2 ve nuclear por complex proteins in transiently transfected HeLa cells was detected by immunofluorescence technique. Similarly, the lysates were prepared form transiently transfected HEK293 cells and, the proteins precipitated using specific antibodies or with Glutathione Sepharose form lysates were analyzed by SDS-PAGE / western blotting technique.

Results and Discussion: It was found that NS2 and NUP214 proteins were co-localized in HeLa cells, which were transiently transfected with immunofluorescence assay. The NS2 ve NUP214 proteins were co-recipitated with specific antibodies or with Glutathione Sepharose. The over- expression of NUP214 in HEK214 cells negatively affected the influenza A virus replication. The expected interaction between influenza NS2 protein and NUPL2 was not detected under applied conditions.

Keywords: Nucleoporin, NUP214, NUPL2, NS2, Influenza

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan membranlı ve tek iplikli RNA genomuna sahip bir virüstür (Apostolov ve Flewett, 1969). Mukozadaki musin tabakalarına ilgilerinden dolayı *Myxovirus* olarak kabul edilmiştir. Antijenik yapılarındaki temel farklılıklara göre influenza virüsleri A, B ve C olmak üzere üç ana gruba ayrılırlar. Bu virüsler içerisinde insan sağlığı açısından büyük riskler taşıyan virüsler influenza A virüsleridir. İnfluenza A virüsleri geniş bir konak yelpazesine sahiptirler (Leahy ve ark., 1997). Başta kuşlarda olmak üzere, birçok deniz memelisinde, kedilerde, köpeklerde, atlarda, domuzlarda ve insanlarda enfeksiyon yapabilmektedirler (Rapor-WHO, 1980; Alexander, 2007; Fouchier ve ark., 2005; Hinshaw ve ark., 1983; Webster ve ark., 1992). İnfluenza virüsleri insan sağlığı açısından büyük risk taşımaktadır. Özellikle A tipi influenza virüsler çok hızlı genetik değişikliklere uğrayarak zaman zaman tüm dünyayı etkileyen pandemilere neden olmaktadır. Bu nedenle influenza A virüslerine karşı geliştirilen antiviral ilaçların ve aşılarda sürekli olarak güncellenmesi gerekmektedir (Kalarikkal ve Jaishankar, 2018). Bu bağlamda influenza virüsü replikasyonunun ve bu olayda rolü olan hücresel ve viral proteinler arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde iyi bilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmaya konu olan NS2 proteini influenza A virüsünün en küçük RNA segmenti (8.segment) üzerinden mRNA'nın alternatif işlenmesi sonucunda sentez edilen bir proteindir (Alonso-Caplen ve ark., 1992). Bu protein infekte hücrelerde viral ribonükleopartiküllerinin (vRNP) nukleustan sitoplazmaya taşınmasında rol alır. Bu nedenle NS2 proteini, nuklear eksport protein (*İng. nuclear export protein-NEP*) olarak tanımlanmıştır (Lommer ve Luo, 2002). NS2 proteini vRNP'lerin nukleustan sitoplazmaya taşınması işlevini nukleus por kompleksi ile ilişkili proteinler ile birlikte gerçekleştirmektedir. Bununla birlikte, konak hücreye ait hangi proteinlerin bu olaya katıldığı ve bu proteinler ile influenza virüsü NS2 proteini arasında ne tür bir etkileşim olduğu çok iyi bilinmemektedir (Lamb ve Choppin, 1979). Diğer taraftan influenza A virüsü vRNP'lerinin hücre nukleusundan sitoplazmaya taşınması, viral replikasyonun sonuçlanması açısından hayati önem taşımaktadır (Lo ve ark., 2018). Bu bağlamda vRNA transport mekanizmalarının aydınlatılması, influenza A virüsü replikasyonunu kontrol altına almak için potansiyel hedefler sunacaktır.

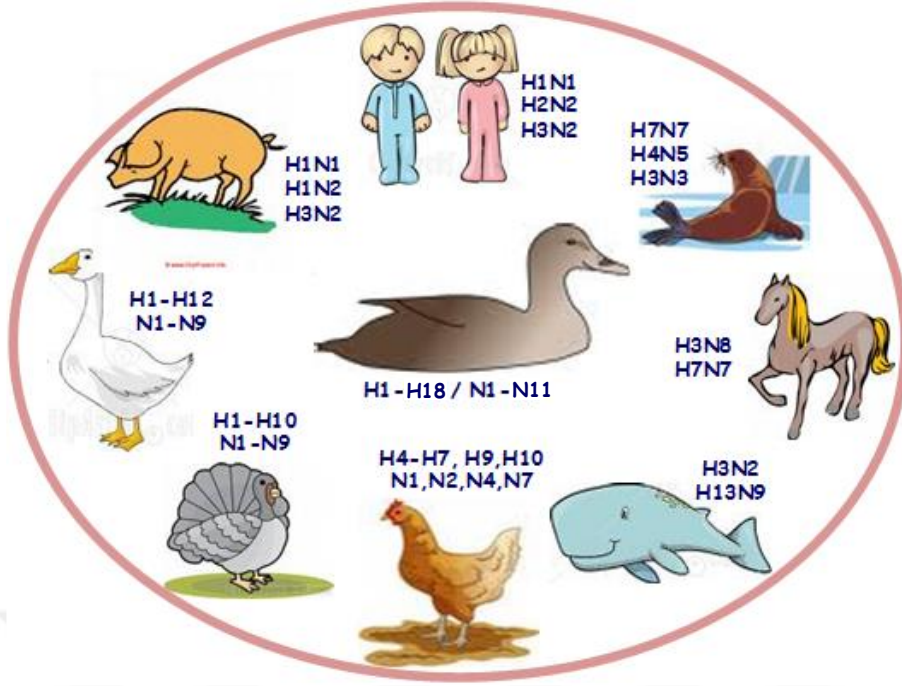
Hücre içerisinde iki protein arasındaki ilişkinin, dolayısıyla proteinlerin işlevlerinin saptanmasında yaygın olarak yararlanılan önemli metotlardan biri maya ikili-hibrit metodudur. Daha önce, tez danışmanımın yürütücülüğünde tamamlanan bir proje (TÜBİTAK 1001 / 112S518) kapsamında influenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait NS2 proteini yem (bait) olarak kullanılarak maya ikili-hibrit metodu ile yapılan tarama çalışması sonucunda belirlenen NS2 ile ilişkili aday proteinlerden ortalama 214 kD boyutunda nukleer por kompleks proteini (NUP214) ve nukleoporin benzeri 2 (NUPL2) proteinleri bu çalışma kapsamına alınmıştır. Nukleus ve sitoplazma arasında moleküllerin taşınmasında işlev gören bu proteinlerin influenza A virüsü vRNP'lerinin taşınması ile ilişkileri daha önce rapor edilmemiştir. Bu çalışmada, maya hücrelerinde, influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkisi saptanan, insana ait NUP214 ve NUPL2 proteinlerinin, memeli hücrelerinde de benzer etkileşimi gösterip göstermedikleri, bu proteinlerin influenza A virüsü replikasyonunu nasıl etkiledikleri ve viral replikasyon için önemli olup olmadıkları sorularına yanıt aranmıştır. İnsan orijinli HEK293 ve HeLa hücreleri ile yapılan çalışmalar sonucunda özellikle NUP214 proteinin influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkili olduğu ve viral replikasyon açısından önem taşıdığı saptanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri insanlarda yaygın olarak üst solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan önemli bir patojendir. Bu virüsler nükleoprotein (NP) ile kompleks halinde yedi ya da sekiz adet tek iplikli negatif polarite gösteren RNA molekülünden oluşan genoma sahiptirler (Bancroft ve Parslow, 2002; Baudin ve ark., 1994; Zheng ve Tao, 2013). Çok parçalı virüs genomu, enfeksiyon sırasında viral proteinlerin katılması ile değişikliğe uğratılan konak hücre zarı ile çevrilmiştir (Long ve ark., 2019). İnfluenza A ve B virüslerinde viral genom sekiz parçalıdır. Buna karşın influenza C ve D virüslerinde yedi parçalı RNA genomu bulunmaktadır (Asha ve Kumar, 2019; Flynn ve ark., 2018).

İnfluenza virüsleri taşıdıkları nükleoprotein ve M1 proteininin antijenik özelliklerine göre gruplandırılır. Buna göre influenza virüsleri, son yıllarda ayrı bir grup olarak sınıflandırılan influenza D virüsleri ile birlikte A, B ve C olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılırlar (Rapor-WHO, 1979). Antijenik özellikleri bakımından farklılık gösteren bu dört influenza virüsü grubu içerisinde insan sağlığı açısından büyük risk taşıyanları influenza A virüsleridir. İnfluenza A virüsleri sadece insanlarda değil diğer memeli organizmalar ve kanatlılarda da enfeksiyon yapabilen geniş bir konak yelpazesine sahiptir (Şekil 1). Özellikle kuşlarda olmak üzere, birçok deniz memelisinde, kedilerde, köpeklerde, atlarda, domuzlarda ve insanlarda enfeksiyon yapabilmektedirler (Abdelwhab ve Hafez, 2011).



Şekil 1. İnfluenza A virüslerinin enfeksiyon yaptığı organizmalar ve virüs tipleri

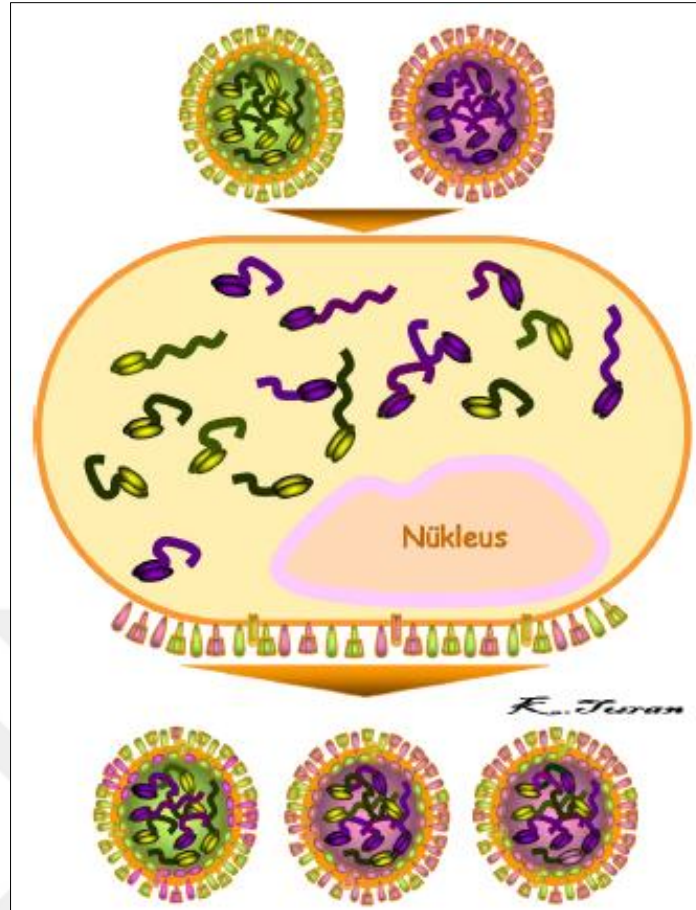
İnfluenza A virüslerinin membranında viral genom üzerinde kodlanan üç farklı protein bulunur. Viral membran üzerinde en fazla bulunan, hemaglutinin (HA) proteinidir (Leser ve Lamb, 2005). Miktar olarak ikinci sırada nöraminidaz (NA) proteinleri bulunmaktadır (McAuley ve ark., 2019). Virüs membranında HA ve NA proteinlerine oranla çok az miktarlarda M2 kanal proteinleri yer almaktadır (de Vries ve ark., 2018; Leser ve Lamb, 2005). HA ve NA proteinleri influenza A virüslerinin temel yüzey antijenik proteinleridir. Bu iki proteinin antijenik özelliklerine göre influenza A virüsleri çok sayıda alt gruba ayrılır. Bugüne kadar influenza A virüslerinde immünolojik olarak farklılık gösteren 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) proteini tanımlanmıştır (Kawaoka ve Neumann, 2012). Bu proteinler virüs partiküllerinde farklı kombinasyonlarda yer alabilmektedir. Dolayısıyla teorik olarak farklı HA ve NA proteinlerinin bir araya gelmesi ile çok sayıda farklı influenza tipinin ortaya çıkması olasıdır. Bilinen influenza A virüslerinin tüm alt tipleri kuşlarda tanımlanmıştır (Straus, 2005). Fakat insanlarda dolaşımda olan influenza virüsü tipleri H1N1, H2N2 ve H3N2 tipleri ile sınırlıdır. Bununla birlikte zaman zaman özellikle kuşlarda geçişler ile farklı influenza A virüsü tipleri insanlarda enfeksiyon yapabilmektedir. İnsana kuşlardan geçiş yapan influenza A virüsleri çok daha büyük riskler taşımaktadır (de Vries ve ark., 2018).

İnfluenza A virüslerinin en önemli özelliği insanlarda sıklıkla tekrarlayan enfeksiyonlara yol açmalarıdır. Bunun en önemli nedeni bu virüslerin genetik yapılarında meydana gelen hızlı değişimlerdir. İnfluenza A virüslerinde mutasyon frekansı çok yüksektir ve genom parçaları farklı kombinasyonlarda yeniden bir araya gelebilmektedir (*İng. reassortment*). Virüs genomunda meydana gelen mutasyonlar özellikler HA ve NA yüzey antijenik glikoproteinlerinin yapısal özelliklerini değiştirmektedir (Goto ve ark., 2013). Bu değişiklikler sonucunda yeni virüs tipleri ortaya çıkmakta ve daha önce virüse karşı bağışıklık kazanılmış olsa bile tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza virüsü antijenik yapı değişiklikleri iki önemli olguya dayanır. Birincisi, viral RNA polimeraz enziminden kaynaklanan değişikliklerdir. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimlerinin replikasyon sırasında hata yapma frekansları yüksektir. Buna karşın, ortaya çıkan hatalı sentezi düzeltecek mekanizmalara sahip değildirler. Bu da viral genlerde mutasyonların birikmesine neden olur. Virüs genetiğinde meydana gelen bu tip değişiklikler antijenik sapma (*İng. antigenic drift*) olarak da adlandırılır (Şekil 2) (Couch, 1996).



Şekil 2. İnfluenza A virüslerinde nokta mutasyonları sonucu meydana gelen antijenik sapmalar (antijenik drift) (Pirinçal, 2014).

İnfluenza A virüslerinde görülen genetik değişimlerden ikincisi, farklı tipte virüslere ait genomların karışması ve yeni virüs tiplerinin ortaya çıkmasıdır (Bouvier ve Palese, 2008; Nakajima, 2003). İnfluenza A virüslerinin segmentli genom yapıları bu tip karışmalara olanak vermektedir (Şekil 3).



Şekil 3. İnfluenza A virüslerinde büyük antijenik değişmelere yola açan antijenik kaymalar (antijenik shift). Konak hücrelerin aynı anda farklı influenza alt tipleri ile infekte olması sonucu bu tip değişiklikler meydana gelmektedir (Pirinçal, 2014) .

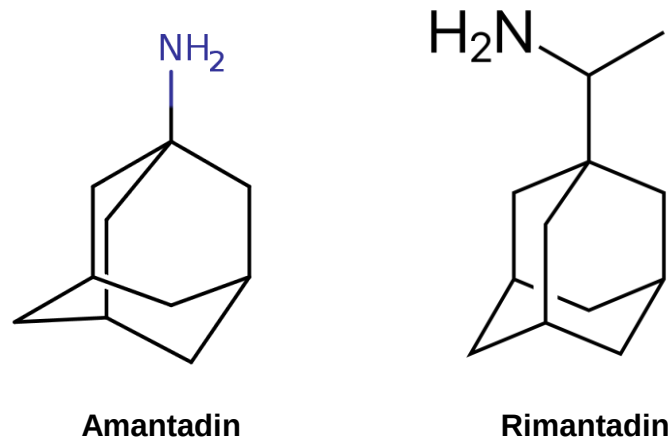
İnfluenza A virüslerinde viral RNA segmentlerindeki karışmalar, insan sağlığı açısından çok daha büyük bir risk oluşturmaktadır. Bu yolla ortaya çıkan yeni virüs tipleri, dünyada yaşayan tüm insanları etkileme potansiyeline sahiptirler. İnfluenza pandemileri olarak tanımlanan bu tip önemli olgular tarihi kayıtlara geçmiştir (Mascagni ve ark., 2012). İnfluenza virüsü pandemileri ile ilgili en eski tarihi kayıtlar 1580 yılına aittir (Falsey ve ark., 1995). Geçen yüzyılda 1918 -1919 (influenza A H1N1), 1957 - 1958 (influenza A H2N2) ve 1968 -1970 (influenza A H3N2) yıllarında üç büyük influenza A virüsü pandemisi ortaya çıkmıştır (Johnson ve Mueller, 2002). Kayıtlara geçen bilinen en büyük influenza A virüsü salgını 1918 - 1920 yıllarında ortaya çıkmış ve tüm dünya genelinde tahminen 40-50 milyon insanın ölümüne neden olmuştur (Taubenberger ve ark., 2005). İspanyol gribi olarak da adlandırılan bu salgının, kuş tipi influenza A H1N1 tipi virüsün mutasyonlar sonucu insana adaptasyon sağlamasıyla çıktığı ileri sürülmektedir (Shortridge, 1999). 1957–1958 Asya gribi ve 1968-1970 Hong Kong gribi etkeni olan virüsler insan ve kuş tipi influenza virüsü genomlarının karışması (reassortment)

sonucu ortaya çıkmıştır. 1977–1978 yıllarında ise daha önce ortaya çıkan influenza A H1N1 virüsleri, bu virüslere karşı bağışık olmayan daha ziyade genç kuşağı etkileyen ve Rus gribi olarak da isimlendirilen yeni bir salgına yol açmıştır (Morens ve ark., 2010).

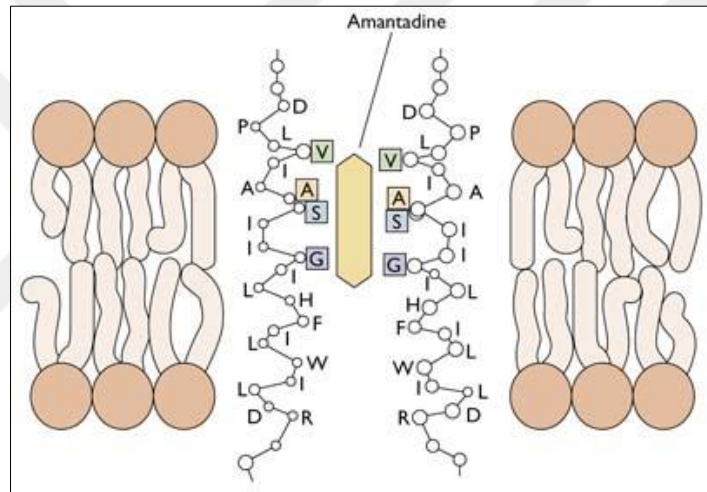
İnfluenza virüsü enfeksiyonları çoğunlukla konak organizmanın doğal savunma mekanizmaları ile kontrol altına alınabilmektedir. Bununla birlikte yukarıda da değinildiği gibi büyük antijenik değişiklikler sonucu ortaya çıkan yeni virüs tiplerinin yol açtığı hastalıklarla ölüm oranları yükselmektedir (Couch ve Kasel, 1983). Günümüzde özellikle influenza A virüs enfeksiyonları ile mücadelede iki temel yol kullanılmaktadır. Bunlardan biri korunma amaçlı kullanılan influenza virüsü aşılardır. İnfluenza virüsü aşları %100 koruma sağlamamakla birlikte özellikle risk grubu içinde yer alan insanlarda enfeksiyonların daha hafif atlatılmasına olanak vermektedir (Zykov, 1982). İnfluenza enfeksiyonlarına karşı kullanılan aşları her yıl yenilenmektedir. Bir sonraki sezonda uygulanacak influenza virüs aşlarının hangi virüs alt tiplerin içereceği Dünya Sağlık Örgütü (WHO: World Health Organization) ve Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA: U.S. Food ve Drug Administration) tarafından belirlenmektedir (Hay ve McCauley, 2018). İnfluenza A virüslerine karşı korunmada kullanılan diğer araçlar antiviral ilaçlardır. İnfluenza virüsü enfeksiyonlarına karşı kullanılan antiviral ilaçlar iki ana grup altında değerlendirilebilir. Bu ilaçların bir grubu, virüsün hücre içerisinde endozomlardan serbestleşmesinde işlev gören M2 proteinini inhibe eden iyon kanalı blokerleridir (Şekil 4). Amantadin ve türevleri bu grup içerisinde değerlendirilen ilaçlardır. Bu ilaçlar influenza A virüsleri üzerinde etkilidirler. Bununla birlikte yapılan çalışmalar, insan popülasyonunda dolaşımda olan İnfluenza A virüslerinin büyük bir çoğunluğunun amantadin ve türevi ilaçlara dirençli olduğunu göstermiştir (Uhnou ve ark., 2003). Diğer taraftan M2 inhibitörleri influenza B virüslerine karşı etki göstermezler.

İnfluenza virüslerine karşı etkili diğer ilaçlar, influenza virüslerine ait NA enzimini bloke eden, enfekte hücre membranında kurulmuş virüs partiküllerinin hücrelerden ayrılarak serbest kalmalarını engelleyen nöraminidaz inhibitörleridir (Smith ve ark., 2001). Oseltamivir, zanamivir, peramivir ve laninamivir NA enzimini inhibe eden antiviral ilaçlardır. NA inhibitörleri yapısal olarak konak hücre reseptörlerine bağlı sialik asit (N-asetil nöraminik asit) bakiyelerine benzer moleküllerdir (Şekil 5) (Vavricka ve ark., 2011).

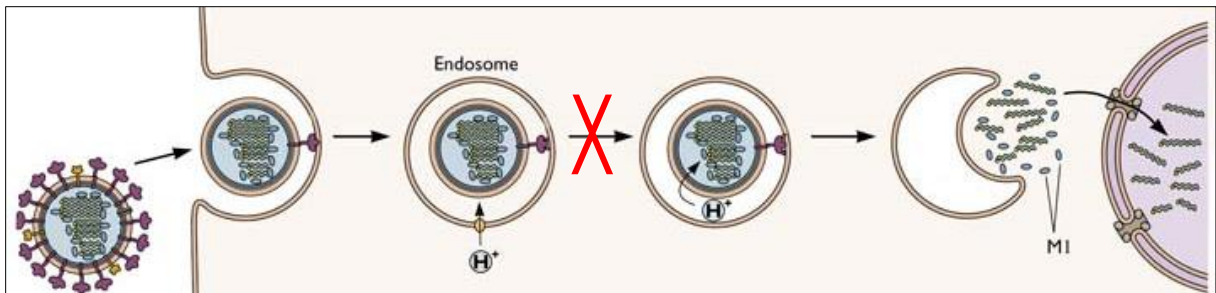
A



B

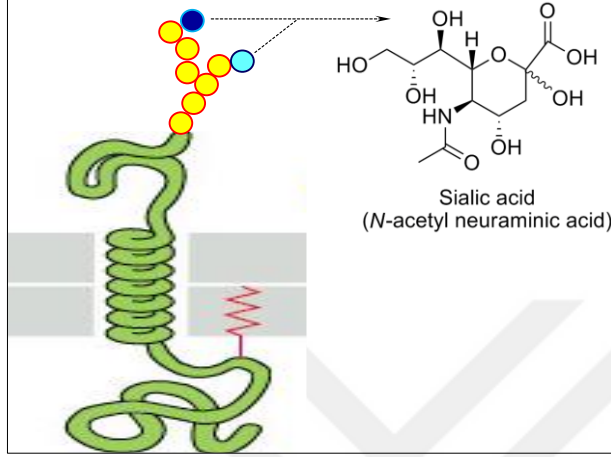


C

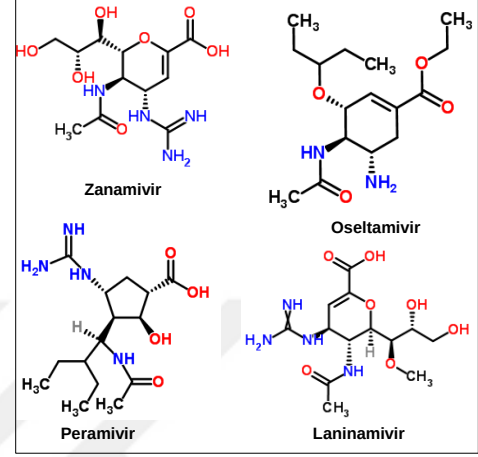


Şekil 4. İnfluenza A virüsü M2 kanal proteininin inhibe eden amantadin ve rimantadinin molekül yapıları (A), bu moleküllerin M2 kanal proteinine bağlanma şekli (B) ve virüsün endozomdan serbest kalmasını bloke etme mekanizmaları (C).
(<https://www.pharmacology2000.com/Antiviral/antiviral409.htm> Erişim tarihi: 19.02.2019)

A

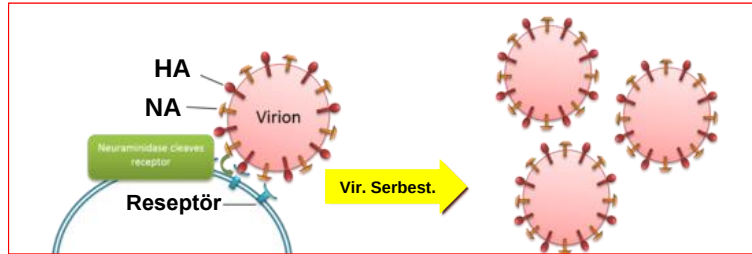


B

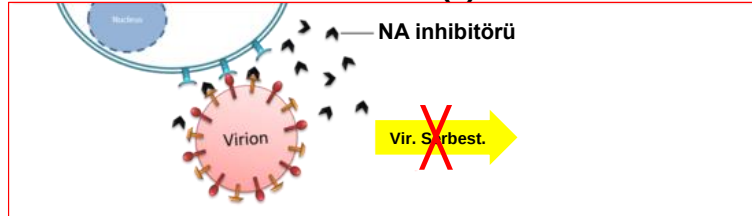


C

NA Inhibitörü (-)



NA Inhibitörü (+)

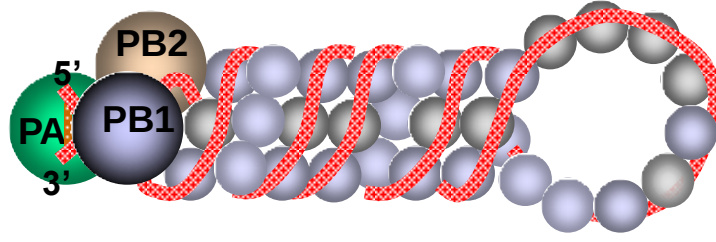


Şekil 5. İnfluenza virüslerinin konak hücrelere tutunmasında işlev gören reseptörlere bağlı sialik asit bakiyeleri (A), virüs replikasyonunun son evresini inhibe eden sialik asit analogu olan NA inhibitörleri (B) ve NA inhibitörlerinin etki mekanizması (C).

NA inhibitörleri M2 kanal blokerlerinin aksine hem influenza A hem de influenza B virüslerine karşı çok daha etkili olan ilaçlardır. Bununla birlikte, virüsün NA enziminde meydana gelen nokta mutasyonları, bu grup antiviral ilaçlara karşı da direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Moasser ve ark., 2019). Dolayısıyla özellikle influenza A virüslerine karşı korunmada mevcut aşılar yetersiz kalmakta, kullanımda olan antiviral ilaçlara karşı dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkabilmektedir. Bu bakımdan influenza virüslerine karşı korunmada yeni yolların araştırılması ve yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Yeni korunma stratejilerinin geliştirilmesi, influenza virüslerinin replikasyonunun moleküler düzeyde iyi bilinmesinin yansısı viral proteinler ile konak hücre proteinleri arasındaki etkileşim mekanizmalarının da aydınlatılmasına bağlıdır.

İnfluenza A virüslerinin yapısı ve replikasyon mekanizmaları oldukça iyi bilinmektedir. Genomu oluşturan tek iplikli viral RNA (vRNA) moleküllerinin her biri nükleoproteinler (NP) ile ribonükleoprotein partikülleri (vRNP) halinde paketlenmiştir (Bouvier ve Palese, 2008). Virüsün sekiz adet vRNA segmenti üzerinden P proteinleri (PB1, PB2 ve PA), NP, HA, NA, matriks proteinleri (M1 ve M2) ve yapısal olmayan proteinler (NS1 ve NS2) sentez edilir (Şekil 6) (Kawaoka ve Neumann, 2012).

A



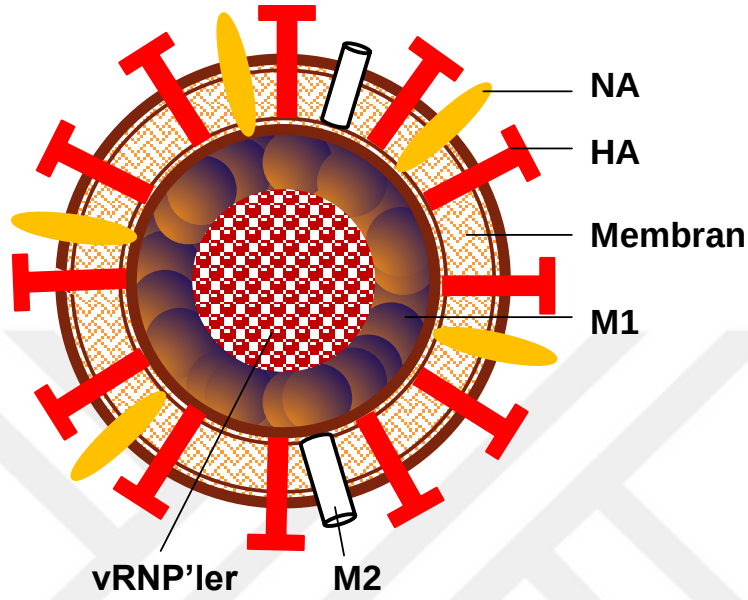
B

Segment	Boyut (b)	vRNA	mRNA	Protein
1	2341	3'--5'	5'-AAA-3'	PB2
2	2341	3'--5'	5'-AAA-3'	PB1
3	2233	3'--5'	5'-AAA-3'	PA
4	1778	3'--5'	5'-AAA-3'	HA
5	1565	3'--5'	5'-AAA-3'	NP
6	1413	3'--5'	5'-AAA-3'	NA
7	1027	3'--5'	5'-AAA-3'	M1 M2
8	890	3'--5'	5'-AAA-3'	NS1 NS2

Şekil 6. Tek iplikli RNA molekülünün NP ve RNA polimeraz enzimi alt üniteleri ile oluşturduğu viral ribonukleoprotein partikül (vRNP) (A) İnfluenza A virüslerin genomunu oluşturan RNA segmentleri ve bu RNA'lar üzerinden kodlanan proteinler (B) (Pirinçal, 2014).

Virüsün RNA molekülünün replikasyonu ve mRNA'larının sentezi PB2, PB1 ve PA proteinlerinden oluşan RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir (Krug ve Berger, 1989). Bu proteinler, NP ve vRNA'ların oluşturduğu vRNP'lere bağlı olarak virüs partikülünde (virion) taşınır. Virüsün ribonukleoprotein partikülleri, konak hücre kaynaklı bir membran ile çevrilidir. Bu nedenle influenza virüsleri membranlı virüsler içinde sınıflandırılmaktadır (Bouvier ve Palese, 2008). Virüs hücreye girdiğinde viral genler üzerinden kodlanan bazı proteinler membranın yapısına katılır ve membranın protein içeriğini değiştirir. Bu proteinlerden biri kırmızı kan hücrelerini aglutine etme yeteneğine sahip olduğundan hemagglutinin (HA) olarak adlandırılır. Virüs membranında yer alan ikinci önemli protein ise nöraminidaz (NA) proteindir. NA proteini hücre yüzeyinde HA moleküllerinin bağlandığı sialik asit bakiyelerini kesen bir enzimdir. Bu nedenle, viral enfeksiyon sırasında hücre

membranında oluşmuş olan (kurulma) virüs partiküllerinin tomurcuklanma ile serbest kalmasında işlev görür ve enfekte hücrelere yeni virüslerin tutunmasını engeller (Bouvier ve Palese, 2008). Membran üzerinde lokalize olan bir diğer viral protein M2 proteinidir (Şekil 7).

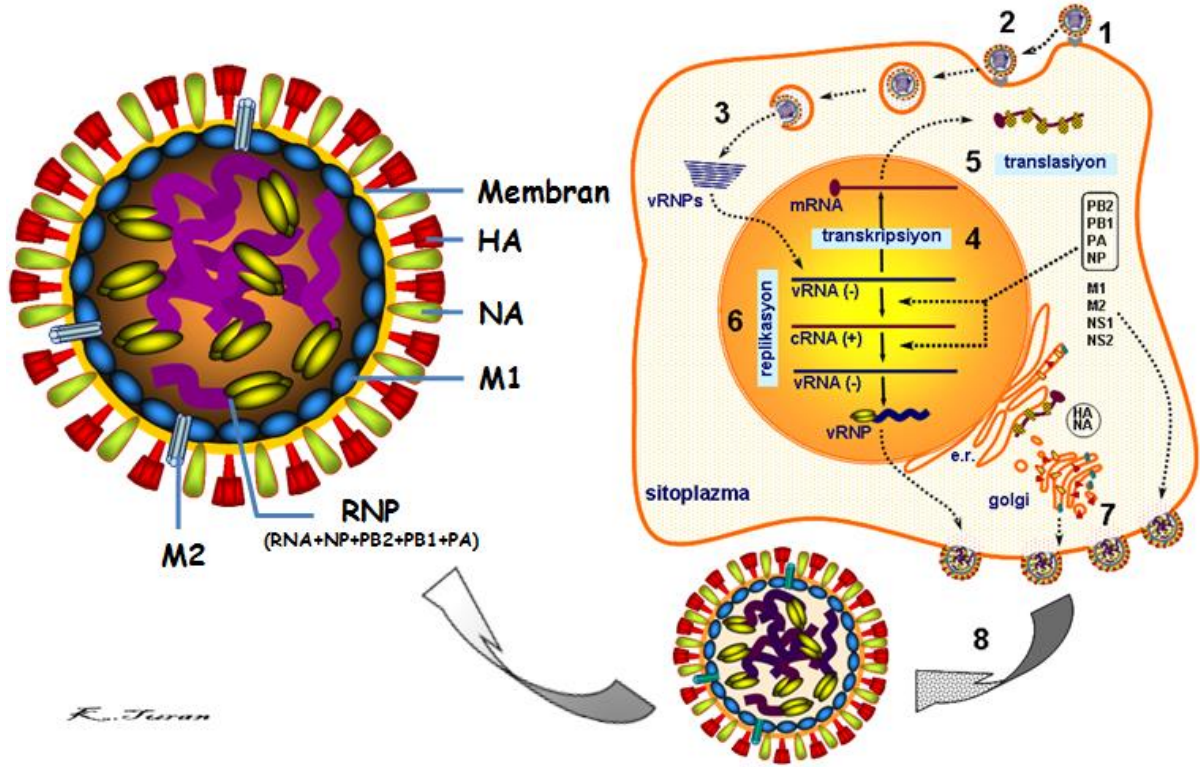


Şekil 7. İnfluenza virüs partikülünün çizimsel görünümü

İnfluenza virüslerinin replikasyonu, diğer birçok RNA virüsünün aksine konak hücrenin nükleusunda gerçekleşir. HA protein ile konak hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyeleri taşıyan reseptörlere bağlanan virüsler endositozla hücre içine alınır. Yine HA proteinin füzyon aktivitesi ile viral membran ve endozom membranının kaynaşması sonucunda nükleokapsidler sitozolde serbest kalır. Viral RNP'lerin sahip oldukları özel nüklear translokasyon dizileri sayesinde porlarından geçerek nükleusa taşınırlar (Bouvier ve Palese, 2008). Virüsün replikasyonu ve translokasyonu nükleus içerisinde gerçekleşir. Yeni sentezlenen viral RNA molekülleri (vRNP) hücre sitoplazmasına taşınır. Bu olayda tez çalışmasına konu olan NS2 (NEP) proteinleri konak hücrelere ait nuklear por proteinleri ile birlikte işlev görür.

İnfluenza virüslerinde konak hücreye tutunması, viral HA molekülünün globüler yapıdaki dış uzantılarının reseptör bağlanma bölgesi ile konak hücre zarı üzerinde bulunan sialik asit bakiyelerine bağlanması ile gerçekleşir (Bouvier ve Palese, 2008). Virüsler tutunmanın ardından endositoz yolu ile hücre içerisine alınır. Endozom içeriğinin asidik yapısı virüs için iki açıdan çok önemlidir. Birincisi; düşük pH değeri, HA molekülünün yapısında değişikliğe sebep olur ve membranların füzyonunu tetikleyen hidrofobik bölgenin açığa

çıkmasını sağlar (Temiz ve ark., 2010). Aktifleşen HA proteini endozom membranı ile viral membranın füzyonunu sağlar. İkinci olarak; virion içerisindeki asiditenin artışı, proteinler arası (NP-M1) etkileşimi bozar ve vRNP'lerin matriks proteininden ayrılmasını sağlar. Sonuçta vRNP'ler hücre sitoplazmasında serbest kalırlar (Şekil 8) (Bouvier ve Palese, 2008).



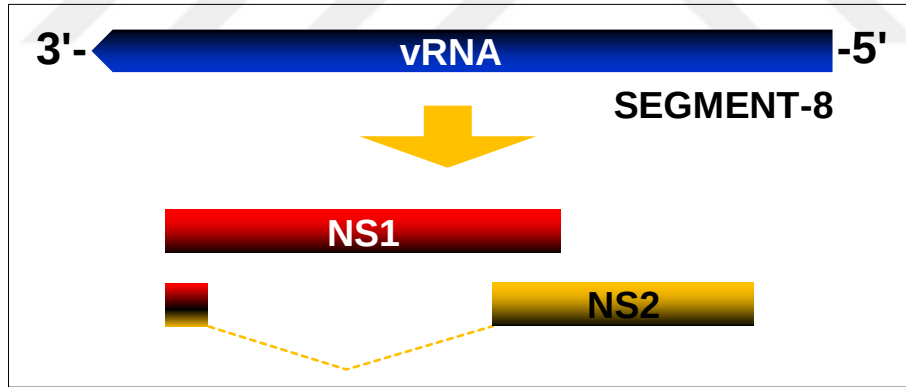
Şekil 8. İnfluenza A virüs moleküler yapısı ve yaşam döngüsü. 1. Tutunma (adsorbsiyon), 2. Giriş (penetrasyon), 3. Kot atma, 4. Transkripsiyon, 5. Translasyon, 6. Replikasyon, 7. Kurulma, 8. Serbestleşme (Turan, 2010).

İnfluenza virüslerinde vRNA'ların transkripsiyon ve replikasyonları hücrelerin nukleusunda gerçekleşir. Sitoplazmada serbest kalan vRNP'ler özel transfer sinyallerinin yardımıyla hücrelerin nukleusuna taşınır. Nukleusta vRNP'ler ile taşınan viral RNA polimeraz enzimleri, negatif polarite gösteren vRNA'ları kalıp olarak kullanır ve iki farklı RNA sentezini kataliz ederler. Bu RNA'lardan biri viral proteinlerin sentezinde kullanılacak olan mRNA'dır. Diğeri ise genomik RNA'ların sentezinde kalıp olarak kullanılacak olan komplementer RNA (cRNA)'lardır (Bouvier ve Palese, 2008). RNA moleküllerini kalıp olarak kullanan RNA polimeraz enzimi, vRNA segmentlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Bu enzim üç farklı polipeptitten oluşur. Bunlar PB2, PB1 ve PA proteinleridir. Fakat influenza virüsü RNA polimeraz enzimi, işlev görebilmek için konak hücre RNA polimeraz II enzimine ihtiyaç duyar.

Bu özelliği ile influenza A virüsleri, konak hücrelerde replikasyon ve transkripsiyon bölgeleri bakımından diğer birçok RNA virüsünden farklılık gösterir. İnfluenza RNA polimeraz enzimleri, konak hücre RNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenen mRNA'ların 5'-CAP yapısını vRNA'ların mRNA kopyalarını sentezlemek için primer olarak kullanır. Bu yönüyle influenza virüsleri, kendi mRNA'larını sentezlemek için konak hücrenin nukleusuna bağımlılık gösterirler (Krug ve Berger, 1989; Plotch ve ark., 1981). İnfluenza viral RNA'ların transkripsiyonu için, RNA polimeraz enziminin PB2 alt biriminin konak hücrede yeni sentezlenmekte olan mRNA'ların 5'-CAP yapısını tanıması gerekir. Bu tanımadan sonra enzimin PB1 alt birimi, endonükleaz aktivitesi ile konak mRNA'nın 5'-CAP yapısını keser ve viral transkripsiyon başlamış olur. vRNA'nın 5'-ucundaki kodlama yapmayan bölgesinde 5-7 adet urasil bakiyesinden oluşan poli-A sinyali bulunmaktadır (Bouvier ve Palese, 2008). Viral RNA polimeraz enzimi, transkripsiyon sırasında bu bölgeyi adenin molekülleri ile eşler ve poly-A kuyruğunu şekillendirir. Sonuçta 5'-CAP yapısı ve 3'-poli-A kuyruğu taşıyan viral mRNA molekülleri sentez edilir. Viral mRNA nukleustan sitoplazmaya taşınır ve hücresel translasyon mekanizmaları ile viral protein sentezinde kalıp olarak kullanılır. Virüs membranında yer alan HA, NA ve M2 proteinlerinin sentezi endoplazmik retikuluma bağlı olan ribozomlarda gerçekleşir. Bu proteinler hem endoplazmik retikulumda hem de golgi komplekslerinde postranslasyonel modifikasyonlara uğrar ve membran trafiğiyle hücre membranına yönlendirilirler. Hücre sitoplazmasında serbest ribozomlar üzerinde sentez edilen PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri nukleusa taşınır ve pozitif polarite gösteren cRNA'lardan negatif polarite gösteren genomik vRNA sentezinde rol alırlar. Yeni sentezlenen vRNA'nın büyük bir bölümü yeni virüs partikülleri için viral genom oluştururken, bir kısmı da tekrar mRNA sentezine katılırlar. Genomik vRNA sentezinde viral mRNA transkripsiyonundan farklı olarak moleküle poli-A ya da 5'-CAP yapısı eklenmez (Temiz ve ark., 2010). Tam boyutta cDNA'lar vRNA'lara replike edilir, NP proteinleri ve viral polimeraz enziminin de yapıya katılması ile vRNP'ler oluşturulur. İnfluenza virüsü vRNP'lerin nukleustan taşınması NEP olarak da isimlendirilen NS2 proteini ve M1 ile düzenlenir. M1 proteini hem NP hem de vRNA'lar ile etkileşim halindedir. Bu etkileşim, M1'in bu iki yapıyı vRNP olarak bir araya getirmesini sağlar. Ayrıca M1, NEP ile de etkileşim halindedir ve bu durum M1-RNP kompleksini nukleoporin proteinleri ile sitozole geçişinde rol oynar (Bancroft ve Parslow, 2002; Fujii ve ark., 2003a; Fujii ve ark., 2003b). M1, sitozolde sentezlendikten sonra nukleusa döner ve vRNP-NEP kompleksini hücre membranına yönlendirir (Bouvier ve Palese, 2008). Bu yönlendirme işleminden sonra vRNP'ler HA, NA ve M2 proteinlerinin katılması ile değişime uğrayan membran üzerinde bir araya gelerek kurulma işlemi gerçekleşir. Konak hücre yüzeyinde virionun tomurcuklanması,

M1 proteinin sitoplazmik membranının altında birikmesi ile başlar. Tomurcuklanma sırasında membranda yer alan HA proteinleri, virionların hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyelerine bağlı kalmasına neden olur (Shimizu ve ark., 2011; Wang ve ark., 2011). Bu durum virionun serbest kalmasını güçleştirir. Bu aşamada viral membranda yer alan diğer bir protein olan NA enzimi, konak hücre membranındaki sialik asit bakiyelerini keser ve virüs partiküllerinin serbest kalmasını sağlar (Şekil 5). İnfluenza A virüsü NA enziminin işlevi sadece kurulma aşamasında yeni virüs partiküllerinin serbest kalmasını sağlamak değildir, aynı zamanda enfeksiyonun başlangıç aşamasında solunum yolu mukozasında sialik asit bakiyelerini keserek virüs partikülünün mukopolisakkaritlerle kaplı epitel hücrelerine ulaşmasını sağlamaktadır (Halder ve ark., 2011).

Bu tez çalışmasına konu olan NS2 proteinini, influenza virüslerinin en küçük RNA segmenti (8. segment) üzerinden kodlanır (Jakeman ve ark., 1989). Virüsün 8. RNA segmenti üzerinden, viral mRNA'nın alternatif işlenmesi sonucunda oluşan transkriptten yapısal olmayan iki protein sentez edilir. Bunlar NS1 ve NS2 proteinleridir (Şekil 9) (Lamb ve Choppin, 1979).



Şekil 9. İnfluenza virüsü 8. RNA segmenti ve bu segment üzerinden kodlanan yapısal olmayan (*İng. non-structurel: NS*) proteinler (NS1 ve NS2)

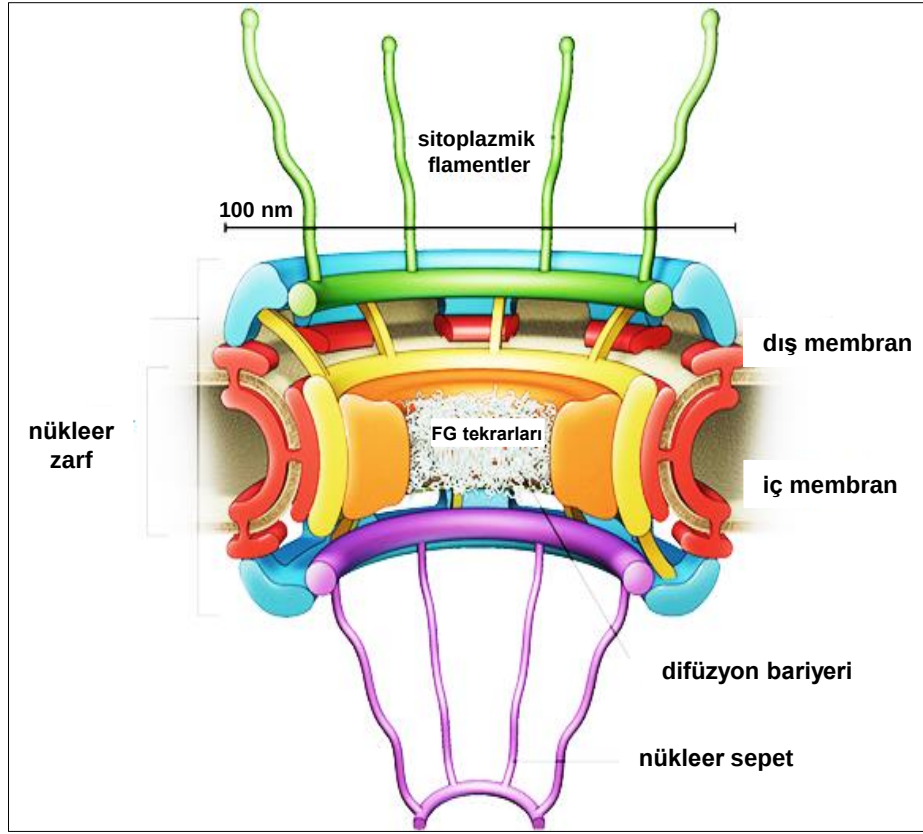
Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, NS2 proteininin vRNP'lerin nukleustan sitoplazmaya taşınmasında işlev gördüğü saptanmış ve nuklear eksport protein (*İng. nuclear export protein: NEP*) olarak isimlendirilmiştir (Lommer ve Luo, 2002). Hem influenza A hem de influenza B virüslerine ait NEP proteinlerinin amino terminal uçlarında HIV-1 virüsü nuklear eksport sinyaline (*İng. HIV-1 Rev-like nuclear export signal: NES*) benzeri bölgeler taşıdığı ve bu bölgeler ile hücresel inportinler ile etkileşim halinde olduğu rapor edilmiştir

(Lommer ve Luo, 2002). Dolayısıyla hücrel nuklear eksport proteinlerinin NEP proteini ile etkileşim halinde olması, bu proteinin influenza virüsü replikasyonundaki önemi hakkında yoğun çalışmaların yapılmasına neden olmuştur (Alonso-Caplen ve Krug, 1991; Alonso-Caplen ve ark., 1992).

4.2. Nukleopporinler ve Nukeus ile Sitoplazma Arasında Moleküllerin Taşınması

Ökaryotik hücreleri bakteriler gibi daha basit yapılı mikroorganizmalardan ayıran en önemli özelliklerden biri hücrenin membranla kompartımanlara ayrılmasıdır. Ökaryotlarda kalıtım materyali nukleus zarları ile sınırlanmıştır. Nukleus zarı, hücrede DNA'yı çevreler ve nukleusu sitoplazmadan ayıran bir hat oluşturarak nukleus bölmesini ayırır. Bu zarf, iki adet iç içe geçmiş zardan oluşmaktadır (Antonin, 2009). Nukleusun bu iç ve dış zarları, birbirlerinin devamı olduğu halde farklı protein bileşenlere sahiptir. Nukleusun iç zarında, kromatin ve bu zar için yapısal destek sağlayan nukleus laminasının protein ağı için bağlayıcılık işlevi gören proteinleri bulundurur (Rafikova ve ark., 2009). İç zarın endoplazmik retikulum ile bağlantı yaptığı yerler, nukleusun dış zarını oluşturmaktadır. Bu kısımda endoplazmik retikulum gibi nukleusun dış zarında da protein sentezinden sorumlu ribozomlar vardır ve bu ribozomlar üzerinde oluşturulan proteinler çekirdek iç ve dış zarları arasındaki boşluğa (perinuklear boşluk) taşınırlar (Lim ve Fahrenkrog, 2006). Sitoplazma ve nukleus arasında süreklilik gösteren çift yönlü bir molekül ya da partikül trafiği bulunmaktadır. Nukleusta işlev gören birçok protein, yapıldıkları yer olan sitoplazmadan nukleusa seçilerek alınırlar. Nukleusa alınma işleminde olduğu gibi, sitoplazmaya taşınma işlemi de oldukça seçicidir (Rafikova ve ark., 2009).

Nukleusta lokalize olan DNA molekülleri üzerinden sentez edilen mRNA moleküllerinin translasyonu sitoplazmada gerçekleşir. Bu da RNA moleküllerinin sitoplazmaya taşınmasını zorunlu hale getirir (Fernandez-Martinez ve ark., 2016; Li ve ark., 2019). Aynı şekilde hücre sitoplazmasında sentezlenen proteinlerin bir kısmı da işlev gördükleri nukleusa taşınırlar. Amino asitler ve nükleotidler gibi metabolitler ile karşılaştırıldığında oldukça büyük olan bu moleküllerin taşınması nukleus porlarından nukleopporinlerin yardımıyla gerçekleşir. Nukleus porları çok sayıda nukleopporin adı verilen protein ailelerinin bir araya gelmesi ile oluşmuş kompleks yapılardır ve nuklear por kompleksi (*İng. Nuclear Pore Complex-NPC*) olarak tanımlanır (Şekil 10) (Kapon ve ark., 2010).

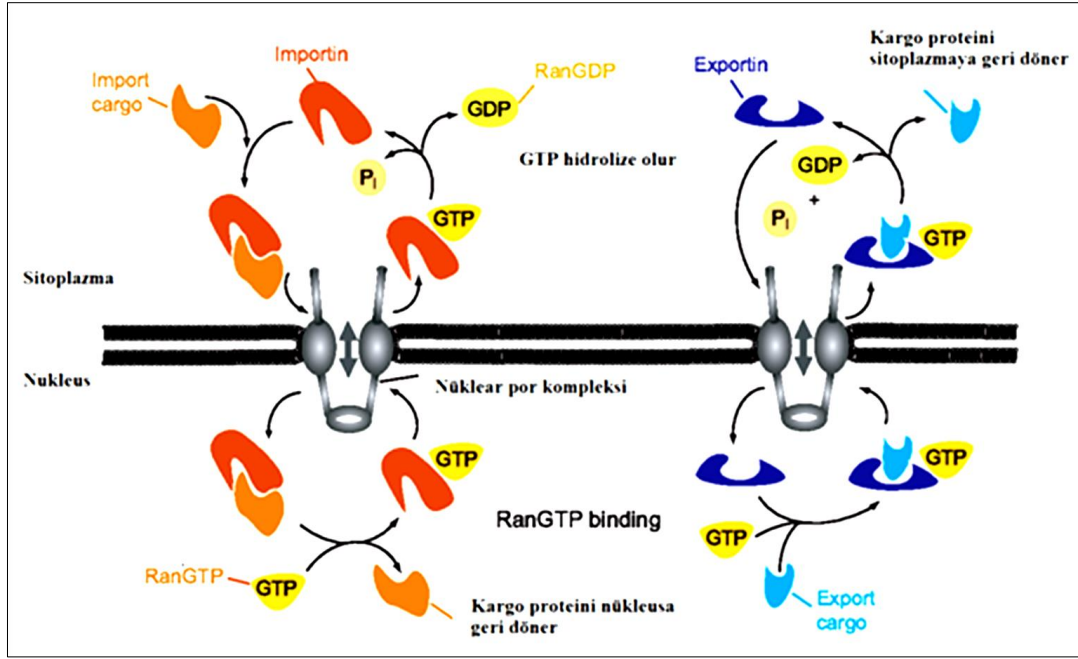


Şekil 10. Nuklear por kompleksinin yapısı (<https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-the-nuclear-pore-complex-32456> / erişim tarihi: 24.12.2018)

Tüm ökaryotik canlılarda nukleus zarfları üzerinde çok sayıda nuklear por kompleksi bulunur. Yüksek organizasyonlu ökaryotlarda bu oluşumların her biri yaklaşık 125 milyon moleküler kütleye sahiptir ve 30'dan fazla farklı proteinden oluşmaktadır (Jamali ve ark., 2011). Nuklear por kompleksini oluşturan bu proteinlere nukleoporin denir ve sekizgen olarak düzenlenmişlerdir (Pienta ve Coffey, 1984) . Her bir nukleusta bulunan total nuklear por kompleksi sayısı farklı hücre tipleri arasında büyük farklılıklar gösterdiği gibi, hücre farklılaşması sırasında da değişimler olduğu bilinmektedir. Tipik bir ökaryotik hücre nukleus zarında, yaklaşık olarak 1000 adet nuklear por kompleksi bulunur (Maul ve Deaven, 1977). Nuklear por komplekslerini oluşturan nukleoporinler çok yüksek hızda nukleus-stoplazma arasında molekül transport gerçekleştirdiler (Kapon ve ark., 2010). Bir nuklear por kompleksi dakikada ortalama 60,000 protein molekülünün nuklear membranı geçmesini sağlar (Ierardi ve ark., 1983; Pienta ve Coffey, 1984).

Nuklear por kompleksi, merkezi bir kanal (~90 nm uzunluğunda) etrafında dizilmiş sekiz çubuk ve çubukların tutunduğu halkalardan oluşur. Bu yapı iç ve dış nuklear membranla birleşmiştir (Jamali ve ark., 2011). Halkalardan sitoplazmik tarafa olana “Sitoplazmik Halka”, nuklear tarafa olana ise “Nuklear Halka” olarak adlandırılır. Sitoplazmik halkadan sitoplazmik filamanlar uzanır. Nuklear halkadan ise sepet filamanları uzanarak terminal halka ile birleşerek “Nuklear Sepeti” oluşturur. Bu yapı RNA ve protein moleküllerinin kontrollü olarak geçişlerini sağlar (Lim ve Fahrenkrog, 2006).

Hangi proteinlerin nukleusa taşınacağı, hangi proteinlerin ise yeniden hücre sitoplazmasına geçeceği, bu proteinlerin sahip oldukları fonksiyonel bölgeleri tarafından belirlenir. Proteinlerin bazen amino ya da karboksi-uçlarında, bazen iç bölgelerinde bazen de birden fazla bölgede yer alan, belirli amino asitlerden oluşan motifler nukleoporinler tarafından tanınmayı sağlar (Antonin, 2009). Proteinlerin nukleusa taşınmasını sağlayan bu motifler nuklear lokalizasyon sinyalleri (*İng. nuclear localization signal: NLS*) olarak tanımlanırken; bir şekilde nukleusa taşınan ve buradaki işlevi sonlanan proteinin çekirdeğe taşınmasını sağlayan motifler ise nuklear eksport sinyali (*İng. nuclear export signal: NES*) olarak tanımlanır (Moroianu, 1999). NLS ve NES arasındaki temel farkı bu motifleri oluşturan amino asit kompozisyonu ve buna bağlı olarak ortaya çıkan yük dağılımı ve konformasyonel yapılarıdır. Örneğin NLS motifleri daha çok bazik özellikte amino asitlerden oluşur ve elektropozitif özellik taşır (Yoneda ve ark., 1999). Hücre nukleusuna doğru yönelen proteinler NLS motifleri ile importin α tarafından yakalanır ve bu proteinler importin β proteinine bağlanır. Oluşan protein kompleksleri nuklear por komplekslerine ulaşır. Taşınma işlemi Ran isimli GTP parçalayıcı (GTPaz) enziminin “kargo / importin α / importin β ” kompleksine bağlanması ile sağlanır (Xu ve ark., 2010). Taşınma sonrasında importin proteinleri birbirinden ayrılır ve tekrar NPC içinden geçerek sitoplazmaya geri dönerler (Fahrenkrog, 2006). Bazı proteinler importin gereksiz NPC içinden geçmelerini sağlayacak NLS'lere sahipken bazıları importin proteinleri yerine transportin olarak adlandırılan protein ailesini kurye olarak kullanırlar (Şekil 11) (Antonin, 2009).



Şekil 11. Moleküllerin NPC aracılığıyla nukleus-sitoplazma arası taşınması. (<https://www.semanticscholar.org/paper/Importin-beta-like-nuclear-transport-receptors> / erişim tarihi: 13.02.2019)

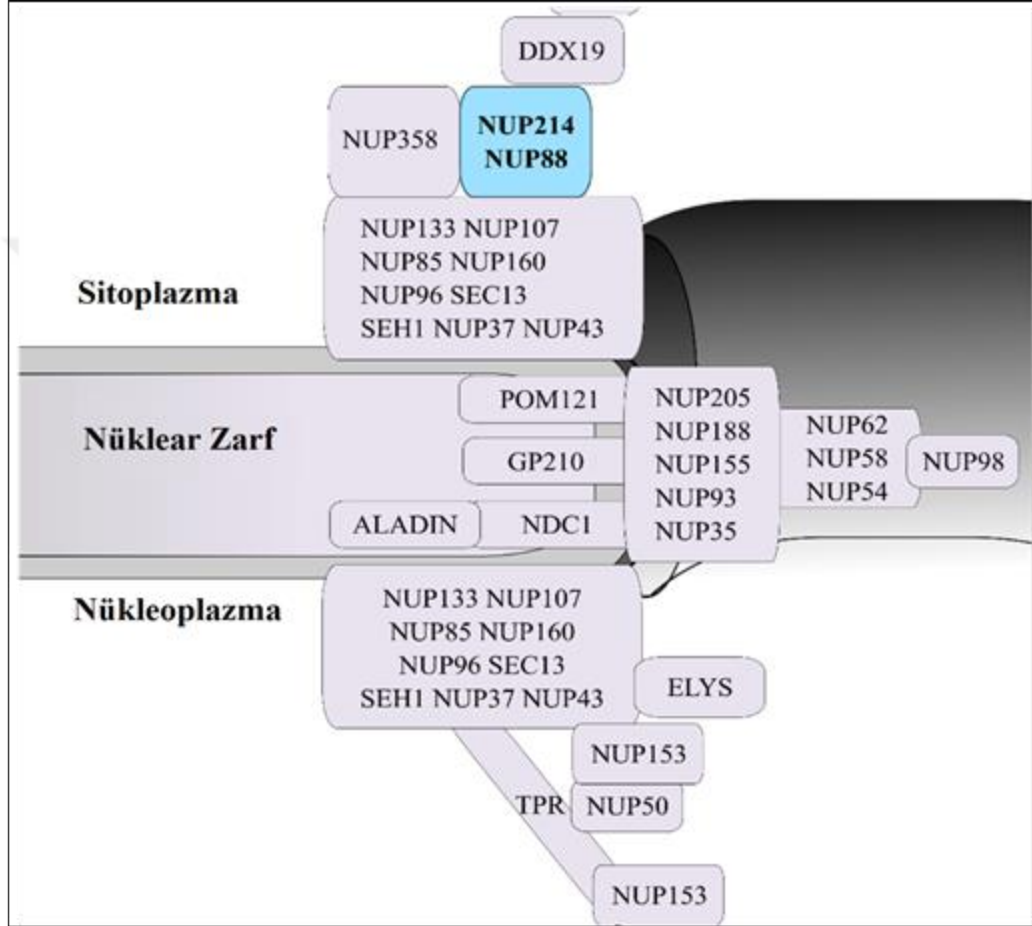
Benzer şekilde, moleküllerin nukleustan sitoplazmaya taşınması da bir dizi taşıma sinyalleri ile gerçekleşir (Moroianu, 1999). Ribozom alt birimleri ve RNA molekülleri gibi büyük moleküllerin de nukleustan sitoplazmaya taşınmaları yine nuklear porlar aracılığıyla kontrollü bir şekilde olur. Taşıma sistemi, nukleustan sitoplazmaya gönderim reseptörlerinin yanı sıra nuklear eksport sinyallerine de dayanır (Fahrenkrog, 2006). Nukleus dışına gönderim reseptörleri, yapısal olarak nukleus içine alım reseptörlerine benzese de karyoferin adı verilen farklı bir gen ailesi tarafından kodlanır (Xu ve ark., 2010). Mayada bu ailenin üyelerini kodlayan yaklaşık 14 gen bulunur (Obado ve ark., 2017; Shulga ve ark., 2000). Hayvan hücrelerinde ise bu sayı çok daha fazladır. Moleküllerin nukleus içine taşınması gibi, hücre dışına taşınma da enerji gerektiren bir olaydır (Rafikova ve ark., 2009). Yukarıda belirtilen taşıma sistemindeki gibi, hücre nukleusuna doğru yönelen proteinler NES motifleri ile tanınırlar ve bu proteinler eksportin proteinine bağlanır (Xu ve ark., 2010). Oluşan protein kompleksleri nuklear por komplekslerine ulaşır. Taşınma işlemi Ran isimli GTPaz enziminin “kargo / eksportin” kompleksine bağlanması ile sağlanır (Yoneda ve ark., 1999). Taşınma sonrasında eksportin proteinleri, taşınan kargo protein ile birbirinden ayrılır ve tekrar nuklear por kompleksi içinden geçerek nukleusa geri dönerler (Şekil 11) (Obado ve ark., 2017).

İnfluenza A virüsleri replikasyon ve transkripsiyonlarını konak hücre nukleuslarında gerçekleştirdikleri için, NP proteinleri ile kompleks halinde bulunan parçalı yapıda viral genomun nuklear por komplekslerinden geçmeleri gerekmektedir (Antonin, 2009). Bu da yukarıda belirtildiği gibi hücresel taşıma mekanizmaları ile gerçekleşir. Diğer taraftan hücre nukleusunda sentez edilen yeni vRNP'lerinin de, kurulmak üzere sitoplazmaya taşınmaları zorunludur (Moroianu, 1999). Bu aşamada viral nuklear eksport protein NS2 önemli bir rol üstlenir (Martin ve Helenius, 1991). Dolayısıyla, NS2 proteini influenza virüs replikasyonunu inhibe etmek amacıyla kullanılabilecek antiviral ajanlar için önemli bir hedef konumundadır. Bununla birlikte, NS2 ve hücresel proteinler arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde iyi bilinmesi gerekmektedir (Bui ve ark., 2000). Bu yüksek lisans tez çalışmasında da, influenza virüsü NS2 (NEP) proteininin işlevini aydınlatmaya yönelik olarak bu proteinin nukleoporin proteinlerinden NUPL2 ve NUP214 ile etkileşimleri moleküler düzeyde ele alınmıştır.

4.3 Nuklear Transport Sisteminde NUP214 Proteininin Rolü

NUP214, nuklear por kompleksinin sitoplazmik halkasına tutturulmuş bir FG (fenilalanin-glisin) nukleoporindir ve nukleoporin NUP88 ile alt kompleks oluşturur (Şekil 12) (Porter ve ark., 2010). Yapısal olarak NUP214, bir N-terminali β -pervane alanı, nuklear por kompleksinde NUP88 ve NUP214 arasındaki bağlantıyı düzenleyen iki merkezi sarmal-bobin motifleri ve nuklear por kompleksinin her iki yanında tespit edilmiş C-terminal FxFG bölgelerinden oluşur (Mendes ve Fahrenkrog, 2019). NUP214'ün nukleositolazmik taşınmadaki rolü, farelerde ve insan hücrelerinde incelenmiştir. NUP214'ün hücrede tamamen olmaması (knock-out) ya da aşırı ekspresyonu, hücre içerisinde proteinlerin ve poli-A'nın nuklear birikimine yol açmıştır (Yi ve ark., 2012). Ayrıca NUP214'ün hücre içerisinde CRM1, proteinlerin majör eksportin bölgeleri, nuklear RNA eksport faktör 1 (NXF1) ve öncül mRNA transport faktörü ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Kang ve ark., 2000; Saito ve ark., 2016). NUP214, özellikle CRM1 için çoklu bağlanma bölgeleri taşır ve tüm diğer nukleoporin proteinleri arasında CRM1'e en yüksek afinitiyi NUP214 gösterir (Akarsu ve ark., 2003). NUP214'ün mRNA taşımadaki rolü, diğer moleküllere göre daha az bilinmektedir. NUP214, amino- terminal bölgesi ile NXF1 ve ATP'ye bağlı DEAD-box helikaz 19 (DDX19) ile etkileşime girer (Lin ve ark., 2018). NUP214, DDX19'un NPC'nin sitoplazmik çevresinde lokalizasyonunu stabilize eder (Napetschnig ve ark., 2009).

Hücrede NUP214 protein düzeyindeki bozukluklar sadece nukleositoplazmik taşınımı değil aynı zamanda nuklear por kompleks yapısını etkilemeden hücre döngüsünün durması ve mitotik sapmalar ile de sonuçlanır. Dahası, NUP214 proteinin kodlayan genin inaktivasyonu (knock out), farelerde embriyonik gelişimin sonlanmasına neden olmaktadır (Mendes ve Fahrenkrog, 2019).



Şekil 12. İnsan nuklear por kompleksi yapısına katılan nükleoporinlerin ve bu proteinlerin lokalizasyonu

4.4. İnfluenza NS2 proteini ile Nuklear Por Kompleks Proteinleri Arasındaki İlişki

RNA genomu taşıyan çoğu virüslerin aksine influenza virüsleri konak hücrelerin nukleuslarında çoğalırlar (Hutchinson, 2018). Dolayısıyla virüsün temel replikasyon ve transkripsiyon birimi olan vRNA'larının nukleositoplazmik transportu zorunludur (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza virüsü vRNP'lerinin taşınmasının tek yolu nuklear por kompleksleridir (Chase ve ark., 2011). Bu taşıma olayında viral bileşenler nuklear por kompleks proteinleri ile karyoferin a, karyoferin b, RAN ve p10 gibi taşıma faktörleri ile etkileşime girerler (Kawaoka ve Neumann, 2012). İnfluenza A virüslerinde yapısal olmayan NS2 proteini, vRNP'lerin taşınmasında rol alan lösin bakımından zengin nuklear por kompleksinden geçişini sağlayan bir proteindir (Lamb ve Choppin, 1979; Yan ve ark., 2015). Bu protein, nuklear por kompleksi üzerinde bulunan bazı nukleoporin proteinler ile etkileşim içerisindedir (Lamb ve Choppin, 1979). Örneğin maya ikili hibrit metodu ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenen hNUP98 proteininin hem maya hem memeli hücrelerinde NS2 proteini ile ilişki içerisinde olduğu gösterilmiştir (Satterly ve ark., 2007; Takeda ve Yaseen, 2014; Zolotukhin ve Felber, 1999). Yapılan domain (motif) analizleri hNUP98 proteininin glisin-lösin-fenilalanin-glisin (GLFG) tekrarlarının NS2 proteini ile etkileşimde önemli olduğu bildirilmiştir (Chen ve ark., 2010). Lazer taramalı konfokal mikroskopi çalışmaları hNUP98'in NS2'ye spesifik olarak bağlandığı ve bu işlemin leptomisin B ile inhibe edildiği görülmüştür. Dolayısıyla vRNP'lerin NS2 aracılı transportunda hNUP98 proteinin amino terminalide yar alan GLFG tekrarları önem taşımaktadır (Takeda ve Yaseen, 2014). Bu veriler HEK293 ve MDCK hücrelerinde hNUP98 proteini düzeyindeki azalma ve proteinin GLFG tekrarları bölgesinin aşırı sentezinin viral replikasyona etkileri ile desteklenmiştir. Her iki durumda da viral replikasyonun yavaşladığı rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2010).

Bu tez çalışması kapsamında da, maya ikili-hibrit metodu ile yapılan tarama sonucunda influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkilendirilen, insan hücrelerinde nukleositoplazmik taşınmada işlevsel NUP214 ve NUPL2 proteinlerinin, memeli hücrelerinde işlevleri araştırılmıştır. Uygulanan farklı testler sonucunda NUP214 proteininin NS2 proteini ile memeli hücrelerinde de ilişkili olduğu ortaya konmuştur. NUPL2 proteini maya hücrelerinde NS2 proteinine bağlanarak belirteç genlerin anlatımını uyarmasına karşın, birlikte çöktürme testlerinde ve birlikte immün lokalizasyon testlerinde pozitif sonuç vermemiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adenin	Sigma Aldrich, ABD
Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Borik asit	Merck, Almanya
Dekstroz	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Fenilindiamin	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glukoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	Merck, Almanya
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
L-Glutamin	Sigma Aldrich, ABD
Lösin	Sigma Aldrich, ABD
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
MOPS [(N-morpholino)propanesülfonik asit]	Sigma Aldrich, ABD

Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Paraformaldehit	Santa Cruz, ABD
Polietilenglikol-4000	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 fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
ssDNA	Sigma Aldrich, ABD
Tetrametiletilendiamin	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	SigmaAldrich, ABD
Triptofan	SigmaAldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
293fectin	Invitrogen, ABD
2- β -Merkaptoetanol	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonükleazları:

Plazmit vektörlerin oluşturulması ve oluşturulan vektörlerin kontrolü aşamalarda *Bgl*II, *Bgl*III, *Bam*HI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I, *Pst*I, *Xba*I, *Xho*I, *Dra*I (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleaz enzimlerinden yararlanıldı.

DNA ve RNA Modifikasyon Enzimleri:

Gen klonlama çalışmalarının farklı aşamalarında, amaca uygun olarak alkalen fosfataz (SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase), Klenow enzimi, RNaz, T4 DNA Ligaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) enzimleri kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarında Taq DNA polimeraz (New England Biolabs veya Rabbit Biotech) enzimi ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 arke suşundan elde edilmiş olan, yüksek doğrulukta DNA sentez edebilme yeteneğine sahip Kod-Plus (Toyobo, Japonya) enzimi kullanıldı.

5.3. Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, DNA ligasyon kiti (Takara), orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Western melezleme ve immunfloresan teknikler ile proteinlerin analizinde, birincil antikor olarak, monoklonal fare anti-HA (Millipore: 05-904; Santa Cruz: sc-7392), monoklonal fare anti-Flag (Abcam), poliklonal tavşan anti-GST (Thermo), poliklonal tavşan anti-NS2 (Invitrogen) antikorları; ikincil antikor olarak, poliklonal anti-fare IgG-HRP (Invitrogen/Thermo:31420), poliklonal anti-tavşan IgG-HRP (Invitrogen/Thermo:31423), anti-fare IgG-alexa 488 (Abcam:ab150117), anti-tavşan IgG-alexa 488 (Abcam: ab150081) ve anti-tavşan IgG-alexa 568 (Abcam: ab175471) antikorlarından yararlanıldı.

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı Su Banyosu	GFL, Almanya
Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Labnet, ABD
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklavlar	Kermanlar, Türkiye
	Genbiotek, G.Kore
Soğutmalı Santrifüjler	Sigma, ABD
	Beckman Coulter, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Ters/Inverted Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazları	Bio-Rad, ABD
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
Luminometre	Promega, ABD
Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Floresan Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Hassas Terazî	Shimadzu, Japonya
Su Banyosu	GFL-Thermolab, Almanya
PZR Cihazları	ABI: ABD / Techne : ABD
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Mikroplaka Okuyucu Spektrofotometre	BioTek, ABD
Tüp karıştırıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
CO2 etüv	Sanyo, Japonya

5.6. Besiyerleri

Çalışmada bakteri, maya ve memeli hücrlerinin çoğalatılmasında aşağıda içerikleri verilen besiyerleri kullanıldı.

5.6.1. Luria bertani (LB) sıvı besiyeri

10 g tripton (Bacto), 5 g maya özütü (Bacto) ve 10 g sodyum klorür, deiyonize distile su içinde çözdürüldü ve toplam hacmi 1 litreye tamamlandı (Maniatis ve ark., 1982).

5.6.2. Luria bertani agar (LBA) katı besiyeri

LB sıvı besiyeri içerisine % 1,5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

Hazırlanan LB ve LBA besiyerleri, 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril hale getirildi. Gereken durumlarda besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonunda olacak şekilde 100 mg/ml konsantrasyonda stok ampisilin çözeltisi eklendi.

5.6.3. Memeli hücre kültürleri için besiyerleri

Memeli hücre hatlarının üretilmesinde besiyeri olarak glukoz konsantrasyonu 1 g/L olan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-LG) (Gibco, ABD) kullanıldı. Önce 4x konsantre stok besiyeri hazırlandı. Bunun için 20 g toz haldeki DMEM-LG, deiyonize distile su içerisinde çözüldürülerek toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Hücreleri üretmede 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. 4-5 ml % 7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek besiyerinin pH'sı 7,3-7,4'e ayarlandı.

5.6.4. YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) besiyerleri

10 g maya özütü, 20 g pepton ve 20 g agar distile su içerisinde çözüldürülerek hacmi 900 ml'ye tamamlandı. Besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav sonrası ortama 100 ml % 20 (a/h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi ve 20 ml 50x konsantre adenin eklendi ve 10 cm'lik petrilere döküldü. Oda sıcaklığında katılaştıran besiyerleri 4-8 °C'da saklandı.

5.6.5. Sentetik dekstroz /+his+ade (SD+HA) besiyeri

6,7 g amino asit içermeyen maya azot kaynağı (yeast nitrogen base: YNB) 500 ml distile su içerisinde çözüldürüldü. Çözeltiye 20 g agar eklendi ve hacim 800 ml'ye tamamlandı.

Besiyeri otoklavda 121 °C'da 20 dakikada steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra besiyerine 100 ml steril edilmiş % 20 (a/h) dekstroz ve 100 ml x10 konsantre amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (Drop Out: DO), 2 ml 100x konsantre histidin ve 4 ml 50x konsantre adenin eklendi. Besiyeri 10 cm'lik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri 4-8 °C'da saklandı.

5.6.6. Sentetik dekstroz /+trp+leu+his+ade (SD+TLHA) besiyeri

1,34 g amino asit içermeyen YNB 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltiye 2 g agar eklendi ve hacim 150 ml'ye tamamlandı. Besiyeri 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav sonrası besiyerine steril edilmiş 20 ml % 20 (a/h) dekstroz çözeltisi, 20 ml 10x konsantre DO çözeltisi, 2 ml 100x konsantre triptofan, 2 ml 100x konsantre lösin, 2 ml 100x konsantre histidin ve 4 ml 50x konsantre adenin eklendi. Besiyeri 10 cm'lik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında katılaşmaları sağlandı.

5.6.7. Sentetik dekstroz /+leu+his+ade (SD+LHA) besiyeri

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

5.7. Çözeltiler

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

29,0 g akrilamid ve 1 g bis-akrilamid deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 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 TBS ve 1 ml % 10 sodyum zid (NaN_3) eklendi.

5.7.4. Etidyum bromür çözeltisi (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)

186,1 g EDTA, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavlanarak steril edildi (EDTA, $M_w = 372,2$).

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 bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla alt fazdan uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0,1 M Tris-Cl tamponu 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:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanılmak üzere 4-8 °C'ye kaldırıldı (Maniatis ve ark., 1982).

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

40 g NaCl, 1 g KCl, 1 g KH_2PO_4 ve 21,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan T-FTS otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. Deneysel çalışmalarda steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında sulandırılarak kullanıldı.

5.7.9. Glukoz çözeltisi (1 M)

90 g glukoz, 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 (Glukoz, Mw=180,16).

5.7.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

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

5.7.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)

69,36 g kalsiyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda steril edildi (Kalsiyum klorür, Mw = 110,98).

5.7.12. Kapatma çözeltisi

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

5.7.13. Mangan klorür çözeltisi (0,55 M)

54,4 g MnCl₂.4H₂O, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı (MnCl₂.4H₂O, Mw = 197,9).

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

5 g (4,72 ml) NP-40, deyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı (NP-40, d = 1,06 g/ml).

5.7.15. Paraformaldehit çözeltisi

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

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

30,2 g PIPES, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi ve 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 tamamlandı. Çözelti 0,45 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

5.7.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1,25 M)

% 40 PEG-4000 çözeltisi ve 2,5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

5.7.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi

0,2 g polietilenimin, deiyonize distile su ile seyreltilerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtre ile steril edildi.

5.7.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

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

5.7.21. Potasyum klorür çözeltisi (2,5 M)

93,2 g potasyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı (Potasyum klorür, 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 filtreden geçirilerek steril edildi.

5.7.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (% 10 –a/h)

1 g sodyum deoksikolat, deyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve toplam hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

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.

5.7.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 g sodyum hidroksit, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Sodyum hidroksit, Mw=39,99).

5.7.26. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M)

36,6 g sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 250 ml'ye tamamlandı (Sodyum klorür, Mw=58,5).

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

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

5.7.28. Tripsin-EDTA çözeltisi (% 0.05 Tripsin, % 0,05 EDTA-a/h)

10 ml % 0,25 tripsin, 39,5 ml steril T-FTS ve 0,5 ml % 5 EDTA (pH. 7,4) karıştırılarak hazırlandı.

5.7.29. Tween-20 çözeltisi (% 10-w/v)

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

5.7.30. 10x Konsantre amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (Drop Out: DO)

3 g amino asit karışımı (Clontech, 630428) deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.7.31. 100x Konsantre lösin (Leu) çözeltisi

1 gr lösin deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.7.32. 100x Konsantre histidin (His) çözeltisi

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

5.7.33. 100x Konsantre triptofan (Trp) çözeltisi

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

5.7.34. 50x Konsantre adenin (Ade) çözeltisi

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

5.7.35. 3- Amino-1,2,4-triazole (3-AT) çözeltisi (1 M)

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

5.7.36. Dekstroz çözeltisi (% 20 –a/h)

100 gr dekstroz deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 °C'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi.

5.7.37. Lityum asetat çözeltisi (1 M)

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

5.7.38. Lityum asetat/PEG/ssDNA çözeltisi

6,7 ml % 50 PEG, 1 ml 1 M LiAc, 0,2 ml 0,5M Tris-Cl (pH 7,5), 0,02 ml 0,5M EDTA (pH 7,5) distile su ile toplam hacmi 9,6 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 0,4 ml 5 mg/ml konsantrasyonda denatüre edilmiş salmon sperm DNA'sı (ssDNA) eklendi.

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

25 ml 1M LiAc, 5 ml 0.5M Tris-Cl (pH 7,5), 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) deiyonize distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.40. Magnezyum sülfat çözeltisi (0,5 M)

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

5.7.41. Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM)

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

5.7.42. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM)

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

5.7.43. Sodyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM)

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

5.7.44. Di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM)

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

5.7.45. Sodyum karbonat çözeltisi (1M)

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

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

50 mg ssDNA 10 ml TE tamponunda (pH 8) çözündürüldü. Hazırlanan çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 1 dakika tutuldu. Otoklav sonrası DNA eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi. Bunun için DNA çözeltisine eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Karışım 4500 dev/dak hızda 15 dak oda sıcaklığında santrifüj edildi. DNA içeren üst faz ayrıldı ve üzerine, 0,1 hacim 3M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etil alkol eklendi. Çözelti tüp karıştırıcıda 4-5 sn karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10-15 dak bekletildi ve 4500 dev/dak hızda 4 °C'da 25 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi üzerine 5 ml %70 etil alkol eklendi ve tekrar 4500 dev/dak hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi oda sıcaklığında kurutuldu ve 8 ml TE tamponu içerisinde çözündürüldü. DNA konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçüldü ve konsantrasyon 5 mg/ml'ye ayarlandı. Denatüre edilmiş ssDNA örneği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra ileride kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı (Pirinçal, 2014).

5.8. Tamponlar

5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M Pipes, 2 ml 2,5 M CaCl_2 , 20 ml 2,5 M KCl ve 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6,7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55M MnCl_2 eklendi, hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0,2 μm fitreden geçirilerek steril hale getirildi.

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

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

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

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

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

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

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

242 g Tris, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek toplam hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) eklendi. Elektroforez işleminde 1: 50 oranında sulandırıldıktan sonra kullanıldı.

5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 3,45 ml % 87'lik gliserin eklenerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

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

41,8 g MOPS, 700 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı NaOH ile 7,0'ye ayarlandı. Üzerine 20 ml 1 M sodyum asetat, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8) eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 1litreye tamamlandı. Tampon 0,45 μm fitreden geçirildi.

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

91 g Tris ve 2 gr SDS, 400 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 8,8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı (Tris, Mw: 121,1).

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

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

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

15,15 g Tris ve 93,84 g glisin, distile su içinde çözündürüldü, pH'sı 8,3'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı (Glisin, Mw = 75,07).

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

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

5.8.12. Protein transfer tamponu

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

5.8.13. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M Tris; % 8 SDS – a/h; % 0,2 bromophenol mavisi – a/h ; % 4 2-merkaptetanol - h/h; % 40 gliserin– h/h, pH 6,8)

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

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

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

5.8.15. Sodyum asetat tamponu (3 M)

12,3 g sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 5,2 ye ayarlandıktan sonra toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı (Sodyum asetat, Mw: 82,03).

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

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

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

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

5.8.18. 20x Konsantre TBS tamponu

160 g NaCl, 4 g KCl ve 60 g Tris, 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7,4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

5.8.19. TBS ve TBS-T tamponu

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

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

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

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

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

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

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

5.8.23. Z (+) tamponu

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

5.9. Plazmit Vektörler

Tez kapsamında maya ikili-hibrid testlerinde kullanılacak maya ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pACT-2 (Clontech, ABD) plazmiti; influenza A virüsü NS2 proteinini ve insan NUPL2 ve NUP214 proteinlerini ve kodlayacak memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında pCAGGS (Tsai ve ark., 1995), pCHA (Nagata ve ark., 1998), pCAGGS-GSTnls (Sugiyama ve ark., 2015) ve pCAGGS-p16 (Turan ve Ata, 2011) plazmitleri kullanıldı. Maya ikili-hibrid testlerinde yem (bait) olarak kullanılan pGBD-NS2 plazmiti farklı bir proje çalışması kapsamında (TÜBİTAK-112S518) yapılan çalışmada, influenza A/WSN/1933 NS2 geni cDNA'sının pGBD-C1 plazmit vektörüne (James ve ark., 1996) klonlanması ile elde edilmiştir.

5.10. *Escherichia coli*

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında *E. coli* DH5α ve *E. coli* Mach1 bakteri suşlarından yararlanıldı.

5.11. Virüsler

Konak proteinlerinin viral replikasyona etkileri ve viral proteinler ile etkileşimlerinin saptanmasında influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri kullanıldı.

5.12. Memeli Hücre Hatları

Deneylerde HeLa ve HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücresi) hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarından HeLa hücreleri ilk kez 1951 yılında Henrietta Lacs isimli serviks kanseri bir hastasının kanserli dokusundan George Gey (Jones ve ark., 1971) tarafından izole edilmiş ve çoğaltılmıştır. Hastanın isim ve soy isminin ilk iki harfi kullanılarak hücre hattının ismi oluşturulmuştur. Diğer hücre hatlarına göre daha dayanıklı olması sebebiyle birçok çalışmada kullanılmış ve günümüze kadar devamlılığı sağlanmıştır. HEK-293 hücreleri ise, 1970'li yılların başlarında Graham ve Alex Van der Eb tarafından kültüre edilmiştir (Graham ve ark., 1977). Hızlı çoğalmaları ve transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır.

5.13. Maya Hücresi

Maya ikili-hibrid metodu ile viral ve konak hücre proteinlerinin etkilerinin test edilmesinde konak olarak aşağıda genotipi verilen *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A maya ırkı (210) kullanıldı.

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

5.14. Çalışmada Kullanılan Oligonukleotid Primerler

Çalışmada gen ya da plazmit vektörlerin PZR ile çoğaltılması, kolon PZR testleri ve DNA dizi analizlerinde Tablo 1’de nukleotid dizileri verilen oligonukleotid primerlerden yararlanıldı.

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında kullanılan oligonukleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi (5' → 3')
NUPL2-For	ATCATGGCCATTTGTCAATTCTTCC
NUPL2-Rev	ATCTAAACATTTAGAAGTTCCAGAG
NUP214/C-TRM-For	ATCATGTCCGCTGGCAGAAGCAC
NUP214/C-TRM-Rev	ATCTAGCTTCGCCAGCCACCAA
GAD sq2-For	CGATGATGAAGATACCCAC
GAD sq2-Rev	GAAAGAAATTGAGATGGTGC
pCA sq-For	GTTCCGGCTTCTGGCGTGTGA
pCA sq-1850-Rev	GGGGCTTCATGATGTCCCCATAAT
NS1-NS2(W)-For	ATGGATCCAAACACTGTGT
NS2(W)-Rev	TTGAATTCTTAAATAAGCTGAAACGAGA
NS2(W)-minus-Rev	AATAAGCTGAAACGAGAAAGTTCT
NS2(W)-Flag-For	ATGGATTATAAAGATGATGATAAAGATCCAAACACTGTGTC
GST-For	ATGGGCTCCCCTATACTAGG
GST-Vec-Rev	GGCGGCGCGAGCTCGAGG
pCA-Vec-For	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATG
GST(Gly)-Rev	TCCAGATCCTCCCAGATCCGATTTTGGAGGATGGTC
Flag-For	GATTATAAAGATGATGATAAATGAGAATTC
pCA-Vec-Rev	GGTGGCGGCGAATTCTTTG
pGEX-5'-For	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG

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

Plazmitlerin üretilmesinde ve çoğaltılmasında konak bakteri hücresi olarak *Escherichia coli* DH5α ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C’da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile steril koşullarda ekim yapıldı ve 37°C’da bir gece boyunca üretildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerin birinden örnek alındı ve 5 ml LB sıvı besiyerine steril koşullarda ekim yapıldı. Kültür 37°C’da 150 dev/dak çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5

ml'lik kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23°C'da 150 dev/dak çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültür, OD600 = 0,25 – 0,3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 4000 dev/dak hızda santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4000 dev/dak hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı (Inoue ve ark., 1990) .

5.16. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Bunun için 1 g agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 60-65°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 DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 25-30 dakikada tamamlandı. Jelde ayrıştırılan DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi.

5.17. RNA Analizleri için Formaldehitli Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Formaldehitli jel için 1,5 g agaroz, 80 ml deiyonize distile su içerisinde kaynatıldı. Üzerine 10 ml 10x konsantre MOPS tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C'a düştüğünde 9 ml % 37 formaldehit eklendi ve yatay jel kasetlerine dökülerek donması sağlandı. Elektroforez işlemi 1x konsantre MOPS içerisinde gerçekleştirildi. RNA örnekleri eşit hacimlerde 2x konsantre RNA jel yükleme tamponuyla karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 30 dakikada tamamlandı. Jeller 0,2 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 15-20 dakika bekletildi ve UV transillüminatör ile görünür hale getirilerek fotoğrafları çekildi (Maniatis ve ark., 1982) .

5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalitesi spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığı absorbans değerleri belirlendi ve aşağıda verilen formül uygulanarak miktarları hesaplandı (Maniatis ve ark., 1982).

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

[OD₂₆₀, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülen örneklerin absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; Kd, (50 µg/ml)]. DNA örneklerinin OD₂₆₀/OD₂₈₀ değerlerine bakılarak saflıkları hakkında fikir edinildi. (Bu oran kaliteli DNA için ~1,8 olmalıdır).

5.19. İnsan NUPL2 ve NUP214 cDNA'larının Hazırlanması

İnsan NUPL2 ve NUP214 proteinlerinin kodlayan genlere ait cDNA'lar, HEK293 hücrelerinden izole edilen total RNA üzerinden ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile hazırlandı.

5.19.1. HEK-293 hücrelerinden total RNA'nın izole edilmesi

DMEM besiyerinde 6 cm'lik petri kutusuna üretilen hücreler (~5x10⁵) 5-10 dakika Tripsin: EDTA çözeltisi etkisinde bırakıldı ve 5 ml besiyerinde süspanse edildi. Hücreler, 1000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çöktürmeleri, 200 µl T-FTS içerisinde yeniden süspanse edildi ve RNA izolasyonunda kullanıldı. Total RNA izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Roche) kullanıldı ve üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu üzerine 400 µl lizis çözeltisi eklendi ve tüp karıştırıcıda 5-10 saniye karıştırıldı. Hücre lizatı kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 10.000 dev/dak hızda 30 saniye santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. RNA bağlı kolon, sırasıyla 500 µl yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son aşamada kolona 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10.000 dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edilerek RNA molekülleri elüe edildi. Elde edilen total RNA, -80 °C'da saklandı.

5.19.2. Reverz transkripsiyon ile HEK293 cDNA'larının elde edilmesi

HEK-293 hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden oligo dT primerleri kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlandı. Reverz transkripsiyon reaksiyonu 20 µl hacim

içerisinde gerçekleştirildi. 1,5 ml'lik plastik tüpe 500 ng total RNA ve 50 pmol oligo dT primer eklendi ve hacim 12,5 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 °C'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin denatürasyonu sağlandı. Daha sonra reaksiyon ortamına sırasıyla 4 µl 5x konsantre reaksiyon tamponu, 0,5 µl (40U/µl) RNaz inhibitörü, 2 µl (10 mM) dNTP karışımı 1 µl (100U µl) reverz transkriptaz enzimi (Toyobo) eklendi. Reaksiyon 45 °C'da 60 dakikada tamamlandı. Elde edilen cDNA insan NUPL2 ve NUP214 genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı. Bu genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primerlerin, NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerden (NUPL2- NCBI Ref. No: NM_007342.2 / NUP214-NCBI Ref. No: NM_005085.3) yararlanılarak tasarlandı.

5.19.3. NUPL2 ve NUP214 cDNA'larının PZR ile çoğaltılması

NUPL2 ve NUP214 cDNA'larının çoğaltılmasında kullanılan sentetik oligonukleotid primerler, PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendikten sonra deneylerde kullanıldı. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C'da 1 saat bekletildi. Sonrasında 85 °C'da 5 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı.

Reaksiyon Karışımı

<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

NUPL2 cDNA'sını PZR ile çoğaltmak için Tablo 1'de dizileri verilen fosforillenmiş NUPL2-For ve NUPL2-Rev; NUP214 cDNA'sını çoğaltmak için ise NUP214-For ve NUP214-Rev primer çiftleri kullanıldı. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

<i>cDNA</i>	:	2,0 μ l
<i>Fosforillenmiş primer çifti (10 pM μl)</i>	:	2,0 μ l
<i>dNTP karışımı (2,5 mM)</i>	:	2,0 μ l
<i>MgSO₄ (25 mM)</i>	:	2,0 μ l
<i>Tampon (x10)</i>	:	4,0 μ l
<i>Deiyoize distile su</i>	:	27,5 μ l
<i>KOD-plus (1U/μl)</i>	:	0,5 μ l
Toplam hacim	:	40,0 μl
	:	

Reaksiyon koşulları, her iki gen için 95 °C da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, 95°C-15 sn / 52°C-15 sn / 68°C-1 dakika 15 saniye ve son döngü 68°C de 10 dakika olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.19.4. PZR ile çoğaltılan cDNA'ların agaroz jel elektroforezi ile saflaştırılması

Yukarıda verildiği şekilde PZR ile elde edilen ürünler fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 μ l'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol eklendi ve 5 saniye tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Ortam 15.000 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 dakika -80°C de bekletildi ve 4 °C'da 10 dakika 15.000 dev/dak hızda santrifüj edildi. DNA çökeltisi 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandıktan sonra, kurutuldu ve 15-20 μ l TE tamponunda çözündürüldü. DNA örneklerine 5: 1 oranında DNA yükleme tamponu ilave edildi ve %1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 20-25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası cDNA bantları, UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1,5 ml'lik plastik tüplere aktarıldı. DNA moleküllerinin agaroz jelden geri alınmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı. İşlemler kit için önerilen yöntemeye uygun olarak gerçekleştirildi. 25-30 μ l TE tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20. Maya İkili-Hibrit Testleri için *NUPL2* ve *NUP214* Genlerinin pACT2 Plazmitine Yeniden Klonlanması

Maya ikili hibrit metodu ile HEK293 cDNA kitaplığı (pACT2 plazmitine klonlanmış halde) kullanılarak, influenza A virüsü NS2 ile ilişkili olduğu saptanan plazmitler *NUPL2* ve *NUP214* cDNA'larının belirli bir kısmını taşımaktadır. Bu nedenle kontrol amaçlı *NUPL2*'nin tam boyutta cDNA'sı ve *NUP214* geninin 1815 bp'lik karboksi terminal domenini kodlayan bölgesi pACT2 plazmitine yeniden klonlandı.

5.20.1. pACT2 plazmit DNA'sının Ligasyon için hazırlanması

pACT2 plazmit DNA'sı GAL4-AD kodlayan diziden hemen sonra *Bgl*II noktasından kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlemler için 5 µg pACT2 plazmit DNA'sı, deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre tampon (Buffer R / Fermantas) ve 1 µl (10U) *Bgl*II restriksiyon endonükleazı eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'nın kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, daha önce belirtildiği şekilde eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi ve üst fazda kalan DNA etil alkol ile çöktürüldü. Çökelti 42,5 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, üzerine 2,5 µl 2,5 mM dNTP ve 1 µl (1U) Klenow enzimi eklendi ve 30 dakika 37 °C'da inkübe edildi. Sonrasında ortam 65 °C'da 20 dakika bekletilerek Klenow enzimi inaktive edildi. Defosforilasyon için reaksiyon ortamına 2 µl (2U) SAP (shrimp alkaline phosphatase) eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneği fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltisi 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20.2. pACT2-*NUPL2* ve pACT2-*NUP214*_{ct} vektörlerin oluşturulması

5.19.3'de belirtildiği gibi *NUPL2*-For/ *NUPL2*-Rev primer çifti kullanılarak çoğaltılan *NUPL2*, *NUP214*-For/ *NUP214*-Rev primer çifti ile çoğaltılan *NUP214* cDNA fragmentleri ve *Bgl*II restriksiyon enzimi ile doğrusal hale getirilen pACT2 plazmit DNA'larının yaklaşık konsantrasyonları agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Yaklaşık 20-30 nanogram plazmit DNA'sı ve 50-100 ng *NUPL2* veya *NUP214* cDNA örnekleri 0,2 ml'lik PZR tüplerinde karıştırıldı. Reaksiyon karışımının hacmi, deiyonize distile su ile 10 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 10 µl DNA ligasyon çözeltisi (TaKaRa ligation kit ver 2,1) eklendi. Ligasyon 15°C'de PZR cihazında yaklaşık 15-16 saatte tamamlandı.

Transformasyon için ligasyon ürünleri 1,5 ml'lik plastik tüplere aktarıldı. Üzerine daha önce 5.15'de anlatıldığı üzere hazırlanan kompetent *E. coli* Mach1 hücre süspansiyonundan 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 75 saniye 42 °C'da su banyosunda, 3 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37 °C'da gece boyu üremeye bırakıldı. Plazmit alan transformant kolonilerden rekombinant plazmit taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlanarak küçük ölçekte plazmit DNA'ları hazırlandı.

5.20.3 Koloni-PZR ile transformant kolonilerin seçilmesi

Transformasyon sonrası, katı besiyerlerinde üreyen kolonilerden ortalama 8-12 koloni steril kürdan ile alınarak 5 µl deiyonize distile su içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örnekler PZR cihazında 95 °C'da 5 dak bekletildikten sonra buz üzerine alındı. pACT2-NUPL2 plazmiti taşıyan koloniler için GAD sq2 -For / NUPL2 Rev; pACT2-NUP214 plazmiti taşıyan koloniler için GAD sq2 -For / NUP214-Rev primer çifti kullanıldı. Örneklerin üzerine aşağıda verildiği şekilde hazırlanan reaksiyon karışımından 15 µl eklendi (N: örnek sayısı).

<u>PZR İçin Reaksiyon Karışımı</u>	<u>x1</u>	<u>xN</u>
<i>İleri Primer (10 pM/µl)</i> :	1,0 µl	Nx 1,0 µl
<i>Geri Primer (10 pM/µl)</i> :	1,0 µl	Nx 1,0 µl
<i>dNTP karışımı (2,5 mM)</i> :	1.0 µl	Nx 1.0 µl
<i>MgCl₂ (50 mM)</i> :	1,0 µl	Nx 1,0 µl
<i>Reaksiyon tamponu (x10)</i> :	2,0 µl	Nx 2,0 µl
<i>Deiyonize distile su</i> :	8,9 µl	Nx 8,9 µl
<i>Taq Polimeraz (5U/µl)</i> :	0,1 µl	Nx 0,1 µl
<i>Toplam hacim</i> :	15,0 µl	Nx15,0 µl

PZR koşulları 95 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, 94 °C-15 sn / 54 °C-15 sn / 72 °C- 1,5 dakika ve bir döngü 72 °C-5 dak olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.20.4. Transformant kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu

Ligasyon ve transformasyon işlemlerinden sonra, LBA besiyerlerinde elde edilen ve koloni-PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden kontrol ve dizileme için kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları yapıldı. Plazmit DNA izolasyonları için alkali-SDS lizis yöntemi (Green ve Sambrook, 2018) kullanıldı. Seçilen kolonilerden 5 ml LB (+amp) besiyerine ekim yapıldı. Örnekler 37 °C’da bir gece boyunca 200 dev/dak hızda çalkalayıcı etüvde inkübe edildi. Elde edilen doymuş kültürler 7500 dev/dak hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltisi 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspanسیونuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanmış hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4 °C’da, 15000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA içeren üst sıvı üzerine 2,5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C’da, 14000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile doğrulukları kontrol edildi. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profilleri veren DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.20.5. Plazmit DNA’ların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi

Yukarıda belirtildiği şekilde küçük ölçeklerde hazırlanan pACT2-NUPL2 ve pACT2-NUP214_{ct} plazmit DNA’ları, bu plazmitlerin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak *XbaI* ve *DraI* restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapıldı. Bunun için yaklaşık 0,5 µg DNA örnekleri deiyonize distile su ile 18 µl’ye tamamlandı. Üzerine 2 µl x10 konsantre reaksiyon tampon ve 2-5 U arasında değişen miktarlarda restriksiyon enzimi eklendi. Örnekler 37 °C’da 1-2 saat kesime bırakıldı. Sonrasında örnekler 5: 1 oranında x6 konsantre jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve % 1’lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı. DNA bantları bir UV transillüminatör yardımıyla görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.20.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırılması ve DNA dizi analizleri

Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek konrolleri yapılan plazmit DNA örnekleri, PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı. TE tamponu içerisinde çözündürülen DNA örnekleri, eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi. DNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 1: 4 oranında PEG/NaCl (% 20/ 1,25M) çözeltisi ile iyice karıştırıldı. Örnekler 1 saat buz üzerinde tutuldu ve sonrasında 4 °C'da 15000 dev/dak hızda, 25 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü. DNA çökeltileri 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için özel bir şirketten hizmet alımı yapıldı.

5.21. Memeli Hücrlerinde NUPL2, NUP214 ve NS2 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

NUPL2, NUP214 ve NS2 genleri tavuk ovalbümin gen promotörü kontrolünde; immünfloresan testler, birlikte immün-çöktürme (ing. co-immunoprecipitation) testleri, GST ile çöktürme testleri ve western melezleme ile proteinlerin analizlerine olanak sağlaması bakımından HA, GST ya da FLAG uzantılı proteinler kodlayacak şekilde klonlandı. Bu çalışmalarda tavuk ovalbümin gen promotörü ve sözkonusu uzantıları kodlayan dizileri taşıyan pCHA (Nagata ve ark., 1998), pCAGGS-GSTnls (Sugiyama ve ark., 2015) pCAGGS (Tsai ve ark., 1995) ve pCAGGS-p16 (Turan ve Ata, 2011) plazmit vektörlerinden yararlanıldı.

5.21.1. HA uzantılı NUPL2 ve NUP214 proteinlerini kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması

Hemaglutinin (HA) uzantılı (YPYDVDPDYA) NUPL2 ve NUP214_{ct} proteinleri kodlayacak plazmit vektörlerinin oluşturulmasında HA peptidini kodlayan pCHA plazmit vektöründen yararlanıldı. Bunun için pCHA plazmit DNA'sı *EcoRV* restriksiyon endonükleazı ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve NUPL2 ya da NUP214_{ct} cDNA'ları ile ligasyona uğratıldı.

pCHA plazmit DNA'sının doğrusal hale getirilmesi

Bu işlem için 5 µg pCHA DNA'sı deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı. Üzerine 10 µl 10x konsantre tampon (Buffer R, Fermentas), 1 µl (10U/µl) *EcoRV* enzimi eklendi. 37 °C'deki su banyosunda 1-2 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilip kesilmediği agaroz

jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kesilen DNA örneği fenol: kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. Çökelti 45 µl TE içerisinde çözündürülüp, SAP ile defosforile edildi. Bu işlem için örnek üzerine 5 µl 10x konsantre SAP tamponu ve 2U SAP enzimi (1U/µl - Fermentas) eklendikten sonra 1 saat 37 °C’da inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA’sı tekrar fenol: kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. DNA çökeltisi 25 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanıldı.

pCHA plazmit DNA’sının NUPL2 ve NUP214_{ct} cDNA’ları ile ligasyonu ve transformasyon

Doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA’sı 5.19.3.’de belirtildiği şekilde, PZR ile çoğaltılan NUPL2 veya NUP214_{ct} DNA fragmentleri ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ve transformasyon deneylerinde 5.20.2.’de ayrıntılı olarak verilen yöntem izlendi. Rekombinant plazmitleri taşıyan bakteri kolonileri ilk aşamada koloni-PZR ile belirlendi. Doğru plazmit vektör taşıdıkları saptanan bakteri kolonileri 5 ml sıvı besiyerinde üretildi ve küçük ölçeklerde plazmit DNA’lar hazırlandı (bk. 5.20.4). Plazmit DNA’lar uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildi ve DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı.

5.21.2. Flag uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması

İki farklı oryantasyonda flag uzantısı (DYKDDDK) taşıyan NS2 proteini (NS2-flag ve Flag-NS2) kodlayan plazmit vektörler oluşturmak için p16 ile füzyon halinde flag peptidi kodlayan pCAGGS-p16 plazmitinden yararlanıldı.

pCAGGS ve pCAGGS-p16 plazmit DNA’sının doğrusal hale getirilmesi

Flag-NS2 kodlayan plazmit vektörün oluşturulmasında pCAGGS plazmit vektörü kullanıldı. pCAGGS plazmiti *XhoI* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve yapışkan uçlu DNA’lar Klenow enzimi ile kut uçlu hale dönüştürüldü. Bu işlem için 5 µg DNA deiyonize distile su ile 90 µl’ye tamamlandı. Üzerine 10 µl 10x konsantre tampon, 1 µl (10U/µl) *XhoI* enzimi eklendi. 37 °C’deki su banyosunda 2-3 saat inkübe edildi. Plazmit DNA’ların kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kesilen DNA örneği fenol: kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktüldü. Çökelti 42,5 µl TE içerisinde çözündürüldü, daha önce verildiği gibi (bk 5.20.1) Klenow enzimi ile işleme konu ve SAP ile defosforile edildi. Doğrusal hale getirilen ve defosforile edilen pCAGGS DNA’sı 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C’da saklandı.

NS2-Flag kodlayan plazmit vektörün oluşturulmasında pCAGGS-p16 plazmit vektöründen yararlanıldı. pCAGGS plazmit vektöründen farklı olarak pCAGGS-p16 plazmit vektörünün doğrusal hale getirilmesinde ters PZR tekniğinden yararlanıldı. pCAGGS-p16 plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, p16 proteinini kodlayan bölgesi dışında kalan plazmit DNA'sı PZR ile çoğaltıldı. Primer olarak Tablo 1'de dizisi verilen Flag-For ve pCA-Vec-Rev primer çifti kullanıldı. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. PZR için karışımı aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

pCAGGS-p16 plazmiti (25 ng/µl)	: 2,0 µl
Flag-For (10 pM µl)	: 2,0 µl
pCA-Vec-Rev (10 pM µl)	: 2,0 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	: 2,0 µl
MgSO ₄ (25 mM)	: 2,0 µl
Tampon (x10)	: 4,0 µl
Deiyozize distile su	: 25,5 µl
KOD-plus (1U/µl)	: 0,5 µl
Toplam hacim	: 40,0 µl

Reaksiyon koşulları; 97 °C'da 3 dakika ön denatürasyon sonrası 28 döngü, 97 °C'da 25 saniye / 58 °C'da 15 saniye / 68 °C'da 5 dakika ve bir döngü 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve fenol: kloroform ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltisi 20 µl TE içerisinde çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bk. 5.16.).

Flag-NS2 ve sonlandırıcı kodan taşımayan NS2 cDNA'larının hazırlanması

Flag-NS2 ve sonlandırıcı kodan taşımayan NS2 cDNA'ları pGBD-NS2 maya ekspresyon plazmiti üzerinden PZR ile çoğaltılarak elde edildi. PZR ile Flag-NS2 cDNA'sını çoğaltmak için 5.19.3'de verildiği şekilde fosforillenmiş NS2(W)-Flag-For ve NS2(W)-Rev primer çifti (Tablo 1); sonlandırıcı kodan taşımayan NS2 cDNA'sını çoğaltmak için ise NS1-NS2(W)-For ve NS2(W)-minus-Rev primer çifti kullanıldı. PZR için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

<i>pGBD-NS2 plazmit DNA'sı (10 ng/μl)</i>	: 2,0 μl
<i>NS2(W)-Flag-For veya NS1-NS2(W)-For (10 pM μl)</i>	: 2,0 μl
<i>NS2(W)-Rev veya NS2(W)-minus-Rev (10 pM μl)</i>	: 2,0 μl
<i>dNTP karışımı (2,5 mM)</i>	: 2,0 μl
<i>MgSO₄ (25 mM)</i>	: 2,0 μl
<i>Tampon (x10)</i>	: 4,0 μl
<i>Deiyoize distile su</i>	: 25,5 μl
<i>KOD-plus (1U/μl)</i>	: 0,5 μl
Toplam hacim	: 40,0 μl

PZR koşulları, 95°C de 2 dakika ön denatürasyon işleminden sonra 32 döngü olacak şekilde 95°C de 15 saniye, 53°C de 15 saniye ve 68°C de 30 saniye ve son döngü 68°C de 10 dakika olacak şekilde belirlendi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi, daha sonra agaroz jel elektroforezi tekniğı ile saflaştırıldı ve ligasyon için kullanıldı.

Plazmit DNA'larının NS2 cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

Doğrusal hale getirilen pCAGGS plazmit DNA'sı Flag-NS2 cDNA'sı ile pCAGGS-p16 plazmit vektöründen türetilen ve Flag dizisi taşıyan pCAGGS plazmit DNA'sı ise sonlandırıcı kodon taşımayan NS2 cDNA'sı ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ve transformasyon işlemleri, ortalama 25-30 ng plazmit DNA'sı ve 10-15 ng NS2 cDNA'sı kullanılarak, 5.20.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Rekombinant plazmitleri taşıyan transformant koloniler koloni-PZR ile belirlendi. Bu kolonilerden küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hazırlandı (bk 5.20.4). Plazmit DNA'lar uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildi ve DNA dizi analizlerinde kullanılmak üzere PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı.

5.21.3. GST uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması

İnfluenza A virüsü NS2 geni pCAGGS-GST vektöründe, iki farklı oryantasyonda kaynaşmış halde protein (GST-NS2 ve NS2-GST) kodlayacak şekilde, glutatyon s transferaz (GST) geninin öncesine ve sonrasına klonlandı.

pCAGGS-GST plazmit DNA'sının doğrusal hale getirilmesi

pCAGGS-GST plazmit DNA'sının doğrusal hale getirilmesinde ters (invers) PZR tekniği uygulandı. PZR ile plazmit DNA'sını GST kodlayan diziden sonraki bir noktadan (sonlandırıcı kodondan hemen önce) doğrusal hale getirmek için pCA-Vec-For/GST(Gly)-Rev primer çifti, GST kodlayan diziden önceki bir noktadan (ATG kodonundan hemen önce) doğrusal hale getirmek için ise GST-For/GST-Vec-Rev primer çifti (Tablo 1) kullanıldı. PZR için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

pCAGGS-GST plazmiti (25 ng/μl)	: 2,0 μl
pCA-Vec-For veya GST-For (10 pM μl)	: 2,0 μl
GST(Gly)-Rev veya GST-Vec-Rev (10 pM μl)	: 2,0 μl
dNTP karışımı (2,5 mM)	: 2,0 μl
MgSO ₄ (25 mM)	: 2,0 μl
Tampon (x10)	: 4,0 μl
Deiyozize distile su	: 25,5 μl
KOD-plus (1U/μl)	: 0,5 μl
Toplam hacim	: 40,0 μl

PZR koşulları; 95 °C'da 3 dakika ön denatürasyon; 32 döngü, 95 °C'da 20 saniye / 55 °C'da 15 saniye / 68 °C'da 5 dakika; 1 döngü, 68 °C'da 10 dakika olarak belirlendi. PZR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve sonrasında yukarıda verildiği gibi (bk 5.16.) agaroz jel elektroforezi tekniği ile saflaştırıldı. DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

NS2 cDNA'larının hazırlanması:

GST-NS2 füzyon genini oluşturmak için kullanılan NS2 cDNA'sı pGAD-NS2 plazmit vektörü üzerinden, NS2(W)-For ve NS2(W)-Rev primer çifti kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Bunun için 5.21.2'de NS2 cDNA'larının hazırlanmasında izlenen yöntem izlendi. NS2-GST füzyon genini oluşturmak için ise 5.21.2'de PZR ile çoğaltılan, sonlandırıcı kodon taşımayan NS2 cDNA'sı kullanıldı.

pCAGGS-GST plazmit DNA'larının NS2 cDNA'ları ile ligasyonu ve transformasyon

pCAGGS-GST-NS2 plazmit vektörünü oluşturmak için ters PZR ile GST geninin bitim noktasından açılarak doğrusal hale getirilen plazmit DNA'sı ile NS2(W)-For ve NS2(W)-Rev primer çifti kullanılarak çoğaltılan, başlangıç ve sonlandırıcı kodonlara sahip NS2 cDNA'sı ligasyona uğratıldı. pCAGGS-NS2-GST plazmit vektörünü oluşturmak için ise ters PZR ile GST geninde ATG başlangıç kodonundan önceki noktasından açılarak doğrusal hale getirilen plazmit ile sonlandırıcı kodan taşımayan NS2 cDNA'sı ligasyona uğratıldı. Ligasyon işlemleri, ortalama 40-50 ng plazmit DNA'sı ve 10-15 ng NS2 cDNA'sı kullanılarak, 5.20.2.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri kompetent *E. coli Mach1* hücrelerine transform edildi. Rekombinant plazmit taşıyan transformantlar koloni-PZR ile seçildi. Bu kolonileden hazırlanan küçük ölçeklerde plazmit DNA'lar hem restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol amaçlı kullanıldı, hem de PEG/NaCl ile çöktürme yöntemi ile kısmen saflaştırılarak DNA dizi analizlerine tabi tutuldu (bk. 5.20.6.)

5.22. Orta-Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğru olduğu kesinleşen plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli Mach1* hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml LB (+amp) besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece inkübe edilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml taze LB (+amp) besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 180 dev/dak çalkalama hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında orta-ölçekte plazmit izolasyon kit'i (Qiagen) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi, spektrofotometrede 260/280 nm dalga boylarında ölçümleri alınarak saptandı. Plazmit DNA'ları, restriksiyon haritalarına uygun olarak seçilen enzimler ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

5.23. Plazmit DNA'larının Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu

Transfeksiyon deneylerinde HeLa ve HEK-293 hücreleri kullanıldı. Bu iki hücre hattının transfeksiyon etkinliklerinin farklı olması ve farklı transfeksiyon ajanlarına farklı yanıt vermeleri nedeniyle, transfeksiyonda iki farklı yol izlendi. Transfeksiyon etkinlikleri yüksek

olan HEK-293 hücrelerin transfeksiyonunda ticari olarak geliştirilen 293fectin (Invitrogene, Cat. No. 948289) kullanıldı. Transfeksiyon etkinliği düşük olan HeLa hücrelerinin transfeksiyonunda ise katyonik polimer olan polietileniminden (PEI) yararlanıldı. Hücreler, transfeksiyondan 16-24 saat önce 6 cm'lik etrilere; 6-kuyulu plaklara, 12-kuyulu plaklara ya da 24 kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Altı cm'lik petri için 5 µg; 6-kuyulu plaklar için 3 µg; 12-kuyulu plaklar için 2 µg; 24-kuyulu plaklar için ortalama 0,5-1 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'lar 15-20 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde OPTI-MEM (Gibco, ABD) içerisinde sulandırıldı. 293fectin kullanılan deneylerde mikrogram DNA için 2 µl 293fectin kullanıldı. 293fectin 1/25 oranında OPTI-MEM içerisinde seyreltildikten sonra uygun hacimlerde DNA örnekleri ile karıştırıldı. Karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra besiyerlerine eklendi. PEI ile gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde, optimum koşulları belirlemek için mikrogram DNA için farklı miktarlarda PEI test edildi. Bu denemeler sonucunda 1: 2 (DNA/PEI) oranının uygun olduğu saptandı. OPTI-MEM içerisinde 30-40 ng/µl konsantrasyonda seyreltilerek elde edilen PEI çözeltisi eşit oranlarda DNA çözeltileri ile karıştırıldı. Karışım 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra besiyerlerine eklendi. Kültürler 45-48 saat süre ile standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler, lusiferaz aktivite testleri, Renilla lusiferaz aktivite testleri, immünfloresans ya da western melezleme çalışmalarında kullanıldı.

5.24. Memeli Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Tekniği ile Analiz Edilmesi.

Memeli ekspresyon vektörlerine klonlanan viral ve hücrel genlerin HEK293 hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) tekniği ile analiz edildi.

5.24.1. HEK-293 hücrelerinin NUPL2, NUP214 ve NS2 genleri taşıyan plazmitler ile transfeksiyonu ve hücre lizatlarının hazırlanması

HEK-293 hücreleri (5×10^5 hücre/kuyu) D'MEM içeren 12-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler, yukarıda anlatıldığı şekilde (bk. 5.23.) 293fectin kullanılarak 2 µg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası kültürler 48 saat 37 °C'da inkübe edildi. Daha sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl x1 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyrıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatı 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi ve

95-100 °C’de 5 dakika bekletilerek, proteinlerin denatüre olması sağlandı. Elde edilen hücre lizatları SDS-PAGE/western melezleme deneylerinde kullanıldı.

5.24.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x1 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller %10 ya da %15’ lik ayırma jeli ve % 5’lik paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. Jellerin %10 (a/h) ya da %15 (a/h) akrilamid içeren ayırma jelini hazırlamak için, 2 ya da 3 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi 1,5 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu ile karıştırıldı ve hacim deiyonize distile su ile 6 ml’ye tamamlandı. Çözeltiye 25 µl APS (%10 -a/h) ve 10 µl TEMED eklendi ve jel kasetlerine döküldü. Jel yüzeyinin düzgün polimerize olması için üzerine 300-500 µl distile su eklendi. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su atıldı. % 5’lik akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 0,5 ml stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 0,75 ml x4 konsantre paketleme jel tamponu, 1,75 deiyonize distile su, 10 µl APS (%10 w/v) ve 5 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı. Elektroforez işlemi tris-glisin tamponunda gerçekleştirildi. Hazırlanan jel kasetleri elektroforez tankına yerleştirildi. Analiz edilecek protein örnekleri 5 dakika kaynar suda tutularak proteinlerin denatüre edildikten sonra, her bir örnekten 10-20 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez her bir jel kaseti için ilk 20 dakika 40 volt, daha sonra 80 volt gerilim altında yaklaşık 1-1,5 saatte tamamlandı.

5.24.3. Proteinlerin PVDF membranlara transferi

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

5.24.4. Western melezleme tekniği ile proteinlerin görüntülenmesi

Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, antikörlerin olası özgün olmayan bağlanmalarını önlenmek için 1-2 saat bloklama çözeltisinde bekletildi. Daha sonra membranlar bir gece boyunca, bloklama çözeltisinde 1/500 - 1/1000 oranlarında sulandırılan primer antikörlerin etkisinde bırakıldı. Primer antikör olarak fare orijinli monoklonal anti-HA (Millipore: 05-904; Santa Cruz: sc-7392), tavşan orijinli anti NS2 (Invitrogen) ve anti-GST (Thermo) antikörleri kullanıldı. Primer antikör uygulaması sonrasında membranlar bir kez 20 dakika TBS-T, iki kez 20 dakika TBS ile yıkandı. Membranlar 30 dakika 1/5000 oranında TBS içerisinde seyreltilen yaban turpu peroksidazı (*Ing. horseradish peroxidase - HRP*) bağlı anti-fare IgG (Invitrogen / Thermo:3 1420) ya da anti-tavşan IgG (Invitrogen / Thermo: 31423) antikörleri ile işleme kondu. Sonrasında membranlar tekrar bir kez TBS-T ve iki kez TBS ile yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (H&C, RPN2232) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.25. Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının İmmünfloresan Teknikler ile Belirlenmesi

Çalışmada oluşturulan memeli ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan influenza virüsü NS2 proteini ile insan NUP214 ve NUPL2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları immünfloresan yöntemlerle saptandı. Bunun için HeLa hücreleri, 12-kuyulu plaklara (5×10^4 hücre/kuyu) steril lameller üzerine ekildi ve 37  C’da 20-24 saat  retili. Hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde PEI kullanarak plazmit DNA’lar ile transfekte edildi ve 45-48 saat süre ile 37 C’da inkübe edildikten sonra immünfloresan testlerde kullanıldı. Lameller üzerinde üretilen hücreler 10 dakika 1 ml T-FTS içerisinde bekletilerek yıkandı ve 0,5 ml %3 (a/h) paraformaldehit çözeltisinde 15 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler iki kez % 0,1 Tween-20 içeren T-FTS ve bir kez T-FTS içerisinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen bağlanmaları minimum düzeye indirmek için hücreler T-FTS içerisinde hazırlanmış % 1’lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler 1 saat % 1’lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1: 250 - 1: 500 oranında sulandırılarak hazırlanan primer antikörlerin etkisine bırakıldı. Hücreler iki kez 10 dakika T-FTS içerisinde tutularak bağlanmamış antikörler uzaklaştırıldı ve ikinci kez % 1’lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 20 dakika bekletildi. Bunu takiben hücreler 60 dakika süreyle % 1’lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1: 250 oranında sulandırılan Alexa-488 ya da Alexa-568 ile konjuge anti-fare ve/veya anti-tavşan ikincil antikörler ile muamele edildi. Hücreler tekrar iki kez 10

dakika T-FTS ile yıkandıktan sonra, üzerine 2-3 µl kapatma çözeltisi damlatılan lam üzerine kapatıldı, lamellerin çevresine şeffaf oje sürüldü ve DP72 peltier, soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskobunda incelendi.

5.26. Konak Proteinleri (NUPL2 ve NUP214) ile NS2 Proteinini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması

Maya ikili-hibrid metodu ile *S. cerevisiae* hücrlerinde ilişkileri saptanan NS2 ve konak hücre proteinlerinin memeli hücrlerinde olası etkileşimleri immünfloresans teknikler, birlikte immün-çöktürme ve/veya GST ile çöktürme teknikleri ile araştırıldı.

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

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 tez kapsamında da NS1 ve konak hücre proteinleri NUPL2 ve NUP214 proteinlerini kodlayan plazmit DNA'ları 5.23'de anlatıldığı şekilde yuvarlak lameller üzerinde üretilen HeLa hücrlerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-45 saat sonra hücrler %3 (a/h) paraformaldehit ile fikse edildi ve hem NS2 proteini, hem de konak proteinleri özgün antikorlar kullanılarak immünfloresan yöntem ile işaretlendi. Primer antikor olarak NS2 proteinleri için tavşan anti-NS2 antikorları (GST uzantılı NS2 proteinleri için tavşan anti-GST antikorları da denendi), HA uzantısı taşıyan konak proteinleri için ise fare anti-HA antikorları kullanıldı. İkincil antikorlar olarak ise Alexa-488 veya Alexa-568 ile konjuge anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorlarından yararlanıldı. İmmünfloresan testlerinde 5.25 'de anlatılan yöntem izlendi. Farklı florokromlar ile (Alexa-488 ya da Alexa-568) işaretlenen NS2 ve konak proteinleri DP72 peltier, soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskobunda incelendi. NS2 ve konak proteinleri için aynı hücrede farklı florokromlar kullanılarak alınan görüntüler üst üste çakıştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

5.26.2. Birlikte immün çöktürme

Proteinlerin işlevlerinin ve farklı proteinler ile ilişkilerinin saptanmasında izlenen önemli biyokimyasal yöntemlerden biri de proteinleri birlikte immün çöktürme yöntemidir. Bu çalışmada HA uzantılı konak hücre proteinlerini (NUPL2 veya NUP214) ve influeza virüsü

NS2 proteinlerini (flag ya da GST uzantılı) kodlayan plazmit DNA'ları 5.23.'de anlatıldığı şekilde 6-kuyulu plaklarda ya da 6 cm'lik petrilerde çoğaltılan HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-45 saat sonra hücreler, bir kez T-FTS ile yıkandı ve 0,4-0,7 ml RIPA tamponunda toplandı. Hücre süspansiyonları 1,5 ml lik plastik tüplerde aktarıldı ve en az beş kez dondurma (-80 °C) /çözme (37 °C) işlemine tabi tutuldu. Hüce lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 14.000 dev/dak hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar immün çöktürme testlerinde kullanıldı. Bunun için 250-500 µl hücre lizatına 2-4 µl fare anti-HA antikoru eklendi ve örnekler 4°C da 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Daha sonra hücre lizatına 15-30 µl protein A-sepharose süspansiyonu eklendi. Örnekler 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) süspanse edildi ve 10 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Örnekler tekrar santrifüj edilerek protein A sepharose boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler çöktürüldü. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edildi. Yıkama işlemleri sonrasında elde edilen çökelti 30-60 µl x2 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda süspanse edildi ve kaynar suda 5 dakika bekletilerek boncuklara bağlı proteinler denatüre edildi. Daha sonra örnekler hem NS2 hem de konak hücre proteinleri NUPL2 ve NUP214 için SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile analiz edildi.

5.26.3. GST ile çöktürme yöntemi

Birlikte immün çöktürme testlerinde olduğu gibi bu testlerde de 6-kuyulu plaklarda ya da 6 cm petrilerde çoğaltılan HEK293 hücreleri HA-uzantılı konak hücre proteinlerini ve GST uzantılı NS2 proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edildi. Transfekte edilen hücrelere RIPA tamponunda yukarıda anlatıldığı şekilde (bk. 5.24.1) parçalandı. Hazırlanan hücre lizatlarında GST uzantılı NS2 proteinleri glutatyon-sepharose boncuklar ile çöktüldü. Bunun için 300 µl hücre lizatına 25 µl glutatyon-sepharose süspansiyonu eklendi. Örnekler 4°C da bir gece boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Glutatyon-sepharose boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler yukarıda anlatıldığı şekilde yıkama tamponu ile yıkandı. Yıkama işlemleri sonrasında glutatyon-sepharose çökelti 30 µl x2 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda süspanse edildi ve kaynar suda 5 dakika bekletilerek boncuklara bağlı proteinler denatüre edildikten sonra hem GST uzantılı NS2 hem de HA uzantılı konak hücre proteinleri için SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile analiz edildi.

5.27. NUPL2 ve NUP214_{ct} Proteinlerinin Aşırı Ekspresyonlarının İnfluenza Virüs Çoğalmasına Etkilerinin Araştırılması

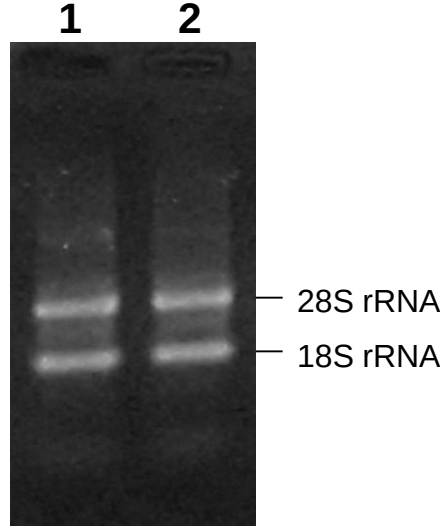
Yapay olarak NUPL2 ve NUP214_{ct} protein düzeyi arttırılan HEK293 hücrlerinde influenza virüsü replikasyonu, enfeksiyondan 8 saat sonra hücrlerde viral PA proteini miktarının SDS-PAGE /western melezleme tekniği ile anliz edilmesi ile izlendi. HEK293 hücreleri 12 kuyulu plaklara ekildi ve 20 saat standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Hücreler 5.23’de anlatıldığı şekilde HA uzantılı NUPL2 ya da NUP214_{ct} proteini kodlayan plazmit DNA’lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler OPTI-MEM besiyeri iki kez yıkandı. Hücrelere %1 BSA içeresinde 1-2 moi (*Ing. multiplicity of infection*) titresinde olacak şekilde seyreltilen insan tipi influenza A/WSN/33-H1N1 ve kuş tipi influenza (A/duck/Pennsylvania-H5N2) virüsü örneklerinden 250 μ l eklendi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C’da virüslerin tutunması için bekletildi. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve ortama 2 ml DMEM besiyeri eklendi. İnfeksiyondan 8 saat sonra hücreler 200 μ l x1 SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içeresinde bir silikon sıyrıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatları 15-20 kez insülin iğnesinden geçirildi. Virüs ile infekte edilen hücre lizatları 95-100°C’da 5 dakika bekletilerek, proteinlerin denatüre olması sağlandı. Lizatlar influenza virüsü PA proteini ve hücresel aktin beta proteini için SDS-PAGE/western melezleme tekniği ile analiz edildi.

6. BULGULAR

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında, daha önce maya ikili hibrit metodu ile influenza A virüsüne ait NS2 proteini ile ilişkisi saptanan insan hücrelerine özgü NUP214 ve NUPL2 proteinlerinin, insan orijinli hücrelerdeki olası etkileşimleri ve viral replikasyon açısından önemi moleküler düzeyde araştırıldı. Bu bağlamda, influenza NS2, insan NUP214 ve NUPL2 proteini genleri memeli ekspresyon vektörlerine klonlandı ve elde edilen vektörler farklı kombinasyonlarda hücrelere birlikte transfeke edilerek bu proteinlerin yapay olarak sentez edilemeleri sağlandı. Hücrelerde birlikte sentez edilen NS2 ve NUP214 ya da NUPL2 proteinleri arasındaki ilişki birlikte immün çöktürme teknikleri, hücre içi lokalizasyon testleri ve GST ile çöktürme teknikleri ile değerlendirildi. Diğer taraftan, H-NUP214_{ct} ve H-NUPL2 protein düzeyi yapay olarak arttırılan hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun seyri araştırıldı.

6.1. İnsan NUP214 ve NUPL2 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Bulgular

İnsan NUP214 ve NUPL2 proteinlerini kodlayan cDNA'lar HEK293 hücrelerinden izole edilen RNA molekülleri üzerinden reverz transkripsiyon – polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltılarak elde edildi. Hücrelerden izole edilen total RNA'nın kalitatif analizi RNA moleküllerinin formaldehitli agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi (Şekil 13). Analiz sonuçları, izole edilen RNA moleküllerinin istenilen kalite ve miktarlarda olduğunu gösterdi.



Şekil 13. HEK293 hücrelerden izole edilen total RNA'ların formaldehitli agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. Her bir kuyuya yaklaşık 250-300 ng total RNA yüklendi. Elektroforez işlemi 100 volt sabit akım altında 45 dakikada tamamlandı. Jel 10 µg/ml konsantrasyonda EtBr çözeltisinde 60 dakika düşük hızda karıştırıldı ve sonrasında 30 dakika deiyonize distile su ile yıkandı. RNA bantları UV ışık altında görüntülendi. **1, 2.** Aynı koşullarda hazırlanan iki farklı RNA örneğini göstermektedir.

Agaroz jel ile kontrol edilen total RNA üzerinden oligo-dT primerleri kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar elde edildi. İnsan NUP214 ve NUPL2 cDNA'ları, aşağıda verilen bu genlere ait referans dizilerinden yararlanılarak oluşturulan NUP214-For/NUP214-Rev ve NUPL2-For/NUPL-Rev primer çiftleri (Tablo 1) kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. NUP214 proteini 6270 bç uzunluğunda kodlayıcı bölgeye sahip mRNA (cDNA) üzerinden sentez edilmekte, 2090 amino asitten (214 kDa) oluşmaktadır. Bu çalışmada nispeten büyük olan bu proteinin 604 amino asitten oluşan karboksi-terminal kısmını kodlayan cDNA (1815 bç) çoğaltıldı ve deneyler NUP214 proteinin karboksi-terminal kısmı (NUP214_{ct}) ile gerçekleştirildi. Bu bölgenin seçilmesinin nedeni, daha önce tez danışmanım tarafından yapılan maya ikili hibrit metodu ile tarama çalışmalarında, yem (bait) olarak kullanılan influenza virüsü NS2 proteinin NUP214'ün karboksi terminal kısmı ile etkileşim göstermesidir. NUPL2 cDNA'sı ise tam boyutta çoğaltıldı.

Insan NUP214 cDNA's1 (NCBI: NM 005085.3)

ATGGGAGACGAGATGGATGCCATGATTCCCGAGCGGGAGATGAAGGATTTTCAGTTTATAGAGC
GCTAAAGAAGGTGAGAATCTTTGACTCCCCTGAGGAATTGCCCAAGGAACGCTCGAGTCTGC
TTGCTGTGTCCAACAAATATGGTCTGGTCTTCGCTGGTGGAGCCAGTGGCTTGCAGATTTTT
CCTACTAAAAATCTTCTTATTCAAATAAACCCGGAGATGATCCCAACAAAATAGTTGATAA
AGTCCAAGGCTTGCTAGTTCCTATGAAATTCCCAATCCATCACCTGGCCTTGAGCTGTGATA
ACCTCACACTCTCTGCGTGCATGATGTCCAGTGAATATGGTTCATTATTGCTTTTTTTTATGAT
GTTTCGCACATTCTCAAATGAGGCTAAACAGCAAAAACGCCCATTTGCCTATCATAAGCTTTT
GAAAGATGCAGGAGGCATGGTGATTGATATGAAGTGGAACCCCACTGTCCCCTCCATGGTGG
CAGTTTGTCTGGCTGATGGTAGTATTGCTGTCTGCAAGTCACGGAAACAGTGAAAGTATGT
GCAACTCTTCCTTCCACGGTAGCAGTAACCTCTGTGTGCTGGAGCCCCAAAGGAAAGCAGCT
GGCAGTGGGAAAACAGAATGGAAGTGTGGTCCAGTATCTTCCTACTTTGCAGGAAAAAAAAG
TCATTCCCTGTCTCCGTTTTATGAGTCAGATCATCCTGTCAGAGTTCTGGATGTGCTGTGG
ATTGGTACCTACGTCTTCGCCATAGTGTATGCTGCTGCAGATGGGACCCTGGAAACGTCTCC
AGATGTGGTGTATGGCTCTACTACCGAAAAAAGAAGAAAAGCACCCAGAGATATTTGTGAACT
TTATGGAGCCCTGTTATGGCAGCTGCACGGAGAGACAGCATCATTACTACCTCAGTTACATT
GAGGAATGGGATTTAGTGCTGGCAGCATCTGCGGCTTCAACAGAAGTTAGTATCCTTGCTCG
ACAAAGTGATCAGATTAATTGGGAATCTTGGCTACTGGAGGATTCTAGTCGAGCTGAATTGC
CTGTGACAGACAAGAGTGATGACTCCTTGCCCATGGGAGTTGTCTGACTATACAAACCAA
GTGGAAATCACCATCAGTGATGAAAAGACTCTTCCTCCTGCTCCAGTTCTCATGTTACTTTTC
AACAGATGGTGTGCTTTGTCCATTTTATATGATTAATCAAAATCCTGGGGTTAAGTCTCTCA
TCAAAACACCAGAGCGACTTTTCATTAGAAGGAGAGCGACAGCCCAAGTCACCAGGAAGTACT
CCCCTACCCCAACCTCCTCTCAAGCCCCACAGAACTGGATGCTTCTGCAGCTGCAGCCCC
TGCTCTCTGCCACCTTCATCACCTGCTGCTCCCATTTGCCACTTTTTCTTTGCTTCCTGCTG
GTGGAGCCCCCACTGTGTTCTCCTTTGGTTCTTCATCTTTGAAGTCATCTGCTACGGTCACT
GGGAGCCCCCTTCATATTCAGTGCTCCGACAGCTCCAAAGCAGCCCCAGGCCCTGGCCC
ATCAACCTTCTCTTTTGTTCCTTCTTAAAGCCTCCCTAGCCCCCACCCTGCAGCGTCTC
CTGTGGCTCCATCAGCTGCTTCATTCTCCTTTGGATCATCTGGTTTTAAGCCTACCCTGGAA
AGCACACCAGTGCCAAGTGTGTCTGCTCCAAATATAGCAATGAAGCCCTCCTTCCCACCCTC
AACCTCTGCTGTCAAAGTCAACCTTAGTGAAAAGTTTACTGCTGCAGCTACCTCTACTCCTG
TTAGTAGCTCCCAGAGCGCACCCCCGATGTCGCCATTCTCTTCTGCCTCCAAGCCAGCTGCT
TCTGGACCACTCAGCCACCCACACCTCTCTCAGCACCACTAGTTCCGTGCCATTGAAGTC
CTCAGTCTTGCCCTCACCATCAGGACGATCTGCTCAGGGCAGTTCAAGCCCAGTGCCCTCAA
TGGTACAGAAATCACCCAGGATAACCCCTCCAGCGGCAAAGCCAGGCTCTCCCCAGGCAAAG
TCACTTCAGCCTGCTGTTGCAGAAAAGCAGGGACATCAGTGGAAGATTTCAGATCCTGTAAT
GGCTGGAATTGGGGAGGAGATTGCACACTTTCAGAAGGAGTTGGAAGAGTTAAAAGCCCGAA
CTTCCAAAGCCTGTTTCCAAGTGGGCACTTCTGAGGAGATGAAGATGCTGCGAACAGAAATCA
GATGACTTGCATACCTTTCTTTTGGAGATTAAAGAGACCACAGAGTCGCTTCATGGAGATAT
AAGTAGCCTGAAAACAACCTTTACTTTGAGGGCTTTGCTGGTGTGAGGAAGCCAGAGAACAAA
ATGAAAGAAATCGTGACTCTGGTTATCTGCATTTGCTTTATAAAAGACCACTGGATCCCAAG
AGTGAAGCTCAGCTTCAGGAAATTCGGCGCCTTCATCAGTATGTGAAATTTGCTGTCCAAGA
TGTGAATGATGTTCTAGACTTGGAGTGGGATCAGCATCTGGAACAAAAGAAAAACAAAGGC
ACCTGCTTGTGCCAGAGCGAGAGACACTGTTTAAACACCCTAGCCAACAATCGGGAAATCATC
AACCAACAGAGGAAGAGGCTGAATCACCTGGTGGATAGTCTTCAGCAGCTCCGCCTTTACAA
ACAGACTTCCCTGTGGAGCCTGTCTCGGCTGTTCCCTTCCCAGAGCAGCATTCACAGTTTTG
ACAGTGACCTGGAAAGCCTGTGCAATGCTTTGTTGAAAACCACCATAGAATCTCACACCAAA
TCCTTGCCCCAAAGTACCAGCCAAACTGTCCCCCATGAAACAGGCACAACCTGAGAACTTCTT

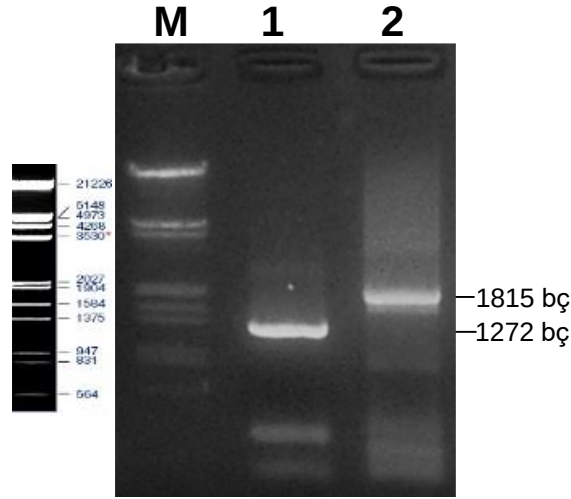
GGCCAAGAGGAAGACCCACCAGTGAGATCCACTGCTCCAGCCAGCCTGTCTCGATCAGCCT
TTCTGTCTCAGAGATATTATGAAGACTTGGATGAAGTCAGCTCAACGTCATCTGTCTCCCAG
TCTCTGGAGAGTGAAGATGCACGGACGTCCTGTAAAGATGACGAGGCAGTGGTTCAGGCCCC
TCGGCACGCCCCCGTGGTTTCGCACTCCTTCCATCCAGCCCAGTCTCTTGCCCCATGCAGCAC
CTTTTGCTAAATCTCACCTGGTTCATGGTTCCTTCACCTGGTGTGATGGGAACCTTCAGTGGCT
ACATCTGCTAGCAAAATTATTCCTCAAGGGGCCGATAGCACAAATGCTTGCCACGAAAACCGT
GAAACATGGTGCACCTAGTCCTTCCCACCCCATCTCAGCCCCGCAGGCAGCTGCCGCAGCAG
CACTCAGGCGGCAGATGGCCAGTCAGGCACCAGCTGTAAACACTTTGACTGAATCAACGTTG
AAGAATGTCCCTCAAGTGGTAAATGTGCAGGAATTGAAGAATAACCCCTGCAACCCCTTCTAC
AGCCATGGGTTCTTCAGTGCCCTACTCCACAGCCAAAACACCTCACCCAGTGTTGACCCCAG
TGGCTGCTAACCAAGCCAAGCAGGGGTCTCTAATAAATTCCTTAAGCCATCTGGGCCTACA
CCAGCATCCGGTCAGTTATCATCTGGTGACAAAGCTTCAGGGACAGCCAAGATAGAAACAGC
TGTGACTTCAACCCCATCTGCTTCTGGGCAGTTCAGCAAGCCTTTCTCATTTTCTCCATCAG
GGACTGGCTTTAATTTTGGGATAATCACACCAACACCGTCTTCTAATTTCACTGCTGCACAA
GGGGCAACACCCCTCCACTAAAGAGTCAAGCCAGCCGGACGCATTCTCATCTGGTGGGGGAAG
CAAACCTTCTTATGAGGCCATTCTGAAAGCTCACCTCCCTCAGGAATCACATCCGCATCAA
ACACCACCCAGGAGAACCTGCCGCATCTAGCAGCAGACCTGTGGCACCTTCTGGAAGTGTCT
CTTTCCACCACCTCTAGTAAGCTGGAAACCCACCGTCCAAGCTGGGAGAGCTTCTGTTTCC
AAGTTCTTTGGCTGGAGAGACTCTGGGAAGTTTTTCAGGACTGCGGGTTGGCCAAGCAGATG
ATTCTACAAAACCAACCAATAAGGCTTCATCCACAAGCCTAACTAGTACCCAGCCAACCAAG
ACGTCAGGCGTGCCCTCAGGGTTTTAATTTTACTGCCCCCCCCGGTGTAGGGAAGCACACGGA
GCCCCCTGTGACATCCTCTGCAACCACCACCTCAGTAGCACCACCAGCAGCCACCAGCACTT
CCTCAACTGCCGTTTTTGGCAGTCTGCCAGTCACCAGTGCAGGATCCTCTGGGGTCATCAGT
TTTGGTGGGACATCTCTAAGTGCTGGCAAGACTAGTTTTTTCATTTGGAAGCCAACAGACCAA
TAGCACAGTGCCCCCATCTGCCCCACCACCAACTACAGCTGCCACTCCCCCTTCCAACATCAT
TCCCCACATTGTCAATTTGGTAGCCTCCTGAGTTCAGCAACTACCCCTCCCTGCCT**ATGTCC**
GCTGGCAGAAGCACAGGAAGAGGGCCACTTCATCAGCTTTGCCTGAGAAGCCAGGTGACAGTGA
GGTCTCAGCATCAGCAGCCTCACTTCTAGAGGAGCAACAGTCAGCCCAGCTTCCCCAGGCTC
CTCCGCAAACCTTCTGACTCTGTTAAAAAAGAACCTGTTCTTGCCCAGCCTGCAGTCAGCAAC
TCTGGCACTGCAGCATCTAGTACTAGTCTTGTAGCACTTTCTGCAGAGGCTACCCCAGCCAC
CACGGGGGTCCCTGATGCCAGGACGGAGGCAGTACCACCTGCTTCCTCCTTTTCTGTGCCTG
GGCAGACTGCTGTACAGCAGCTGCTATCTCAAGTGCAGGCCCTGTGGCCGTGCAAACATCA
AGTACCCCCATAGCCTCCAGCACCACGTCCATTGTTGCTCCCGGCCCATCTGCAGAGGCAGC
AGCATTTGGTACCGTCACTTCTGGCTCATCCGTCTTTGCTCAGCCTCCTGCTGCCAGTTCTA
GCTCAGCTTTCAACCAGCTCACCAACAACACAGCCACTGCCCCCTCTGCCACGCCCGTGTTT
GGGCAAGTGGCAGCCAGCACCAGCAAGTCTGTTTGGGCAGCAGACTGGTAGCACAGCCAG
CACAGCAGCTGCCACACCACAGGTCAGCAGCTCAGGGTTTAGCAGCCCAGCTTTTGGTACCA
CAGCCCCAGGGGTCTTTGGACAGACAACCTTCGGGCAGGCCTCAGTCTTTGGGCAGTCGGCG
AGCAGTGCTGCAAGTGTCTTTTCTTCAGTCAGCCTGGGTTCAGTTCCGTGCCTGCCTTCGG
TCAGCCTGCTTCCTCCACTCCCACATCCACCAGTGGAAGTGTCTTTGGTGCCGCTCAAGTA
CCAGTAGCTCCAGTTCCCTTCTCATTTGGACAGTCTTCTCCCAACACAGGAGGGGGGCTGTTT
GGCCAAAGCAACGCTCCTGCTTTTGGGCAGAGTCTGGCTTTGGACAGGGAGGCTCTGTCTT
TGGTGGTACCTCAGCTGCCACCACAACAGCAGCAACCTCTGGGTTCAGCTTTTGGCAAGCTT
CAGGTTTTGGGTCTAGTAATACTGGTTCTGTGTTTGGTCAAGCAGCCAGTACTGGTGGAATA
GTCTTTGGCCAGCAATCATCCTCTTCCAGTGGTAGCGTGTTTGGGTCTGGAAACACTGGAAG
AGGGGGAGGTTTTCTTCAGTGGCCTTGGAGGAAAACCCAGTCAGGATGCAGCCAACAAAACC
CATTCAGCTCGGCCAGTGGGGGCTTTGGATCCACAGCTACCTCAAATACCTCTAACCTATTT

GGAAACAGTGGGGCCAAGACATTTGGTGGATTTGCCAGCTCGTCGTTTGGAGAGCAGAAACC
 CACTGGCACTTTTCTAGCTCTGGAGGAGGAAGTGTGGCATCCCAAGGCTTTGGGTTTTCTCTC
 CAAACAAAACAGGTGGCTTCGGTGTCTCCAGTGTTTGGCAGCCCTCCTACTTTTGGGGGA
 TCCCCTGGGTTTGGAGGGGTGCCAGCATTTCGGTTCAGCCCCAGCCTTTACAAGCCCTCTGGG
 CTCGACGGGAGGCAAAGTGTTCGGAGAGGGCACTGCAGCTGCCAGCGCAGGAGGATTTCGGGT
 TTGGGAGCAGCAGCAACACCACATCCTTCGGCACGCTCGCGAGTCAGAATGCCCCCACTTTC
 GGATCACTGTCCCAACAGACTTCTGGTTTTTGGGACCCAGAGTAGCGGATTCTCTGGTTTTGG
 ATCAGGCACAGGAGGGTTCAGCTTTGGGTCAAATAACTCGTCTGTCCAGG**GTTTTGGTGGCT**
GGCGAAGCTGA

İnsan NUPL2 cDNA'sı (NCBI: NM 007342.2)

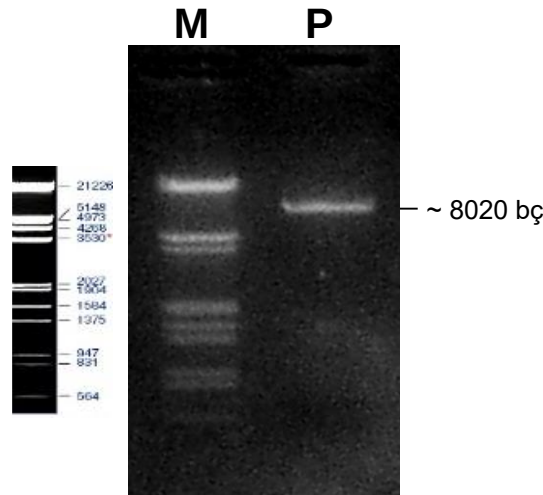
ATGGCCATTTGTCAATTCTTCCTTCAAGGCCGGTGCCGCTTTGGAGATCGGTGCTGGAACGA
 ACATCCCGGTGCTAGGGGTGCAGGAGGAGGACGGCAGCAACCGCAGCAGCAGCCTTCAGGTA
 ATAATAGACGTGGATGGAATACAACCTAGCCAGAGATATTCCAATGTCATCCAGCCATCCAGT
 TTCTCCAAATCCACACCATGGGGGGGCAGCAGAGATCAAGAAAAGCCATATTTCAAGTTCTTT
 TGATTCTGGAGCTTCAACTAACAGGAAGGAAGGCTTTGGATTGTCTGAGAACCCATTTGCTT
 CACTTAGTCCTGATGAGCAGAAAGATGAAAAGAACTTCTGGAAGGAATTGTAAAAGATATG
 GAGGTTTGGGAATCATCAGGGCAGTGGATGTTTTCTGTTTTATTACCAGTGAAAAAGAAACC
 TAATATTTTCAAGTTTTTACAGACATTTTACCAGAGGAATTGAGGCTTGAATACCATAACTTCT
 TAACCAGCAATAACTTACAGAGTTATCTAAATTCTGTCCAACGTTTAATAAATCAATGGAGG
 AACAGGGTAAATGAACTGAAAAGTCTAAATATATCAACTAAAGTAGCTTTGCTCTCTGATGT
 AAAGGATGGAGTAAATCAAGCAGCACCTGCATTTGGATTTGGCAGCAGTCAAGCAGCAACAT
 TTATGTCGCCAGGCTTTCCAGTCAATAACAGCAGCAGTGATAATGCTCAGAACTTTAGTTTT
 AAAACAACTCTGGATTTGCTGCTGCCTCTTCTGGAAGCCCTGCTGGTTTTGGGAGTTCCCC
 AGCATTTGGAGCTGCAGCCTCTACCAGTTCAGGTATCTCTACTTCTGCTCCAGCTTTTGGAT
 TTGGGAAGCCTGAAGTCACATCGGCTGCATCATTTTCATTCAAAGCCCTGCAGCTTCCAGT
 TTTGGATCACCTGGATTTTTCAGGACTTCCAGCTTCCTTGGCAACAGGTCTCTGTCAGAGCTCC
 AGTGGCCCCAGCCTTTGGAGGTGGCAGTTCGTGGCTGGTTTTTGGTAGTCCGGGCTCACATT
 CTCACACTGCTTTTTCTAAGCCATCCAGTGACACTTTTGGAAATAGCAGCATATCCACTTCT
 CTGTCAGCCTCAAGCAGCATCATTGCAACAGATAATGTGTTATTACACCCAGAGATAAACT
 AACAGTAGAAGAACTGGAACAATTTCAATCCAAGAAATTTACTCTGGGAAAAATTCATTAA
 AGCCTCCA**CCTCTGGAACCTTCTAAATGTTTAG**

PZR ile çoğaltılan insan NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'larının agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 14'de verildi. PZR sonucunda NUP214_{ct} için 1815 bp, NUPL2 için ise 1272 bp beklenen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi.

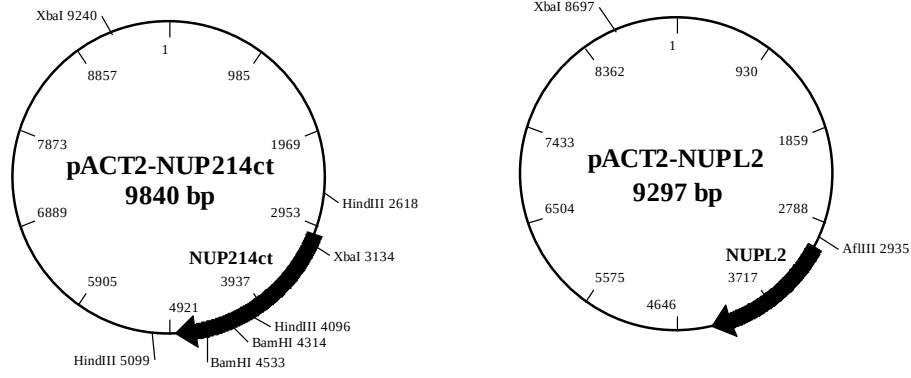


Şekil 14. HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılan NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. Elektroforez işlemi 100 volt sabit gerilim altında 25 dakikada tamamlandı. Deneylerde 0,2 µg/ml konsantrasyonda EtBr içeren %1'lik agaroz jeller kullanıldı. 1. NUP214_{ct} cDNA'sı 2. NUPL2 cDNA'sı. M. *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen Lambda bakteriyofaj DNA'sı (λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*).

Maya ikili hibrit metodu ile yapılan analizlerde elde edilen pACT2 plazmitindeki NUP214 ve NUPL2 cDNA'ları kısmi cDNA'lar olduğu için, yukarıda belirtildiği şekilde çoğaltılan NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'ları, kontrol amaçlı kullanılmak üzere pACT2 maya plazmitine yeniden klonladı. pACT2 plazmiti *BglIII* restriksiyon enzimi ile kesildi ve Klenow enzimi ile küt üçlü hale getirildi (Şekil 15).

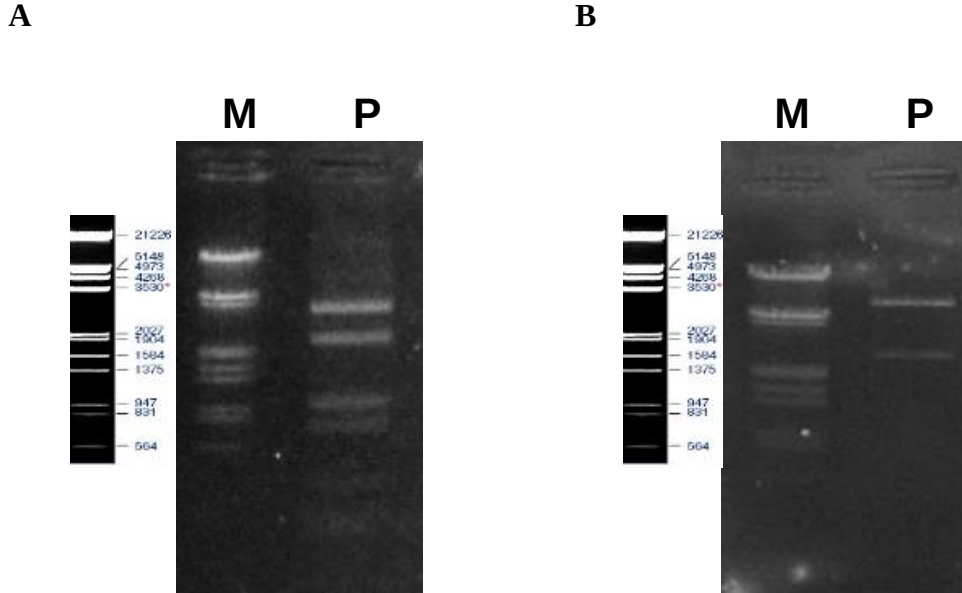


Şekil 15. *BglIII* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pACT2 plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. P. Plazmit DNA'sı. M. λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Elektroforez işlemlerinde Şekil 2'de verilen koşullar uygulandı. Doğrusal pACT2 plazmiti ile NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'ları ligasyona uğratarak Şekil 16'da restriksiyon haritaları verilen pACT2-NUP214_{ct} ve pACT-NUPL2 plazmit vektörleri elde edildi.



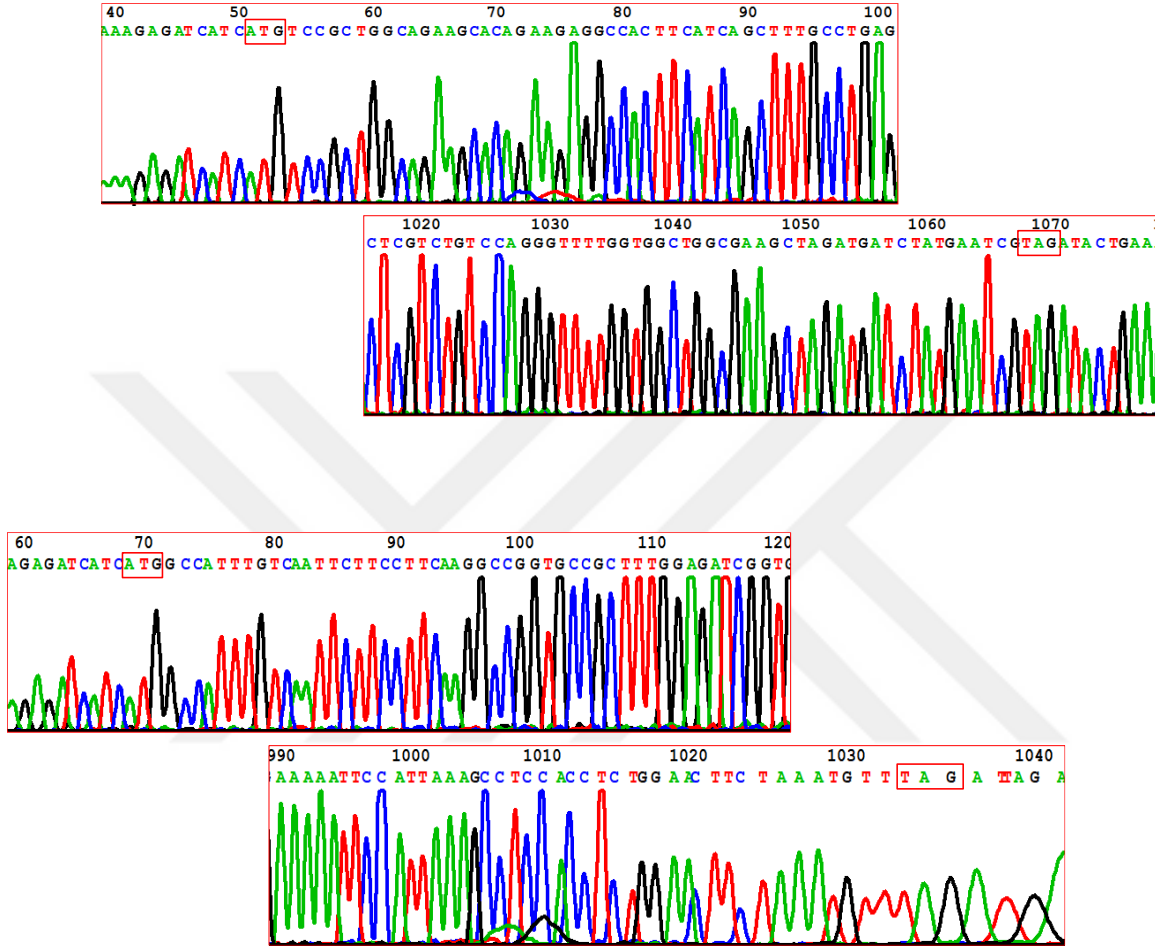
Şekil 16. NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'larının pACT2 plazmitine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. Haritayı oluşturmakta kullanılan *BioEdit* programı belirli bir enzim kesimi için en fazla 5 nokta ile sınırlandığından, bu sayının üzerinde kesim noktasına sahip *DraI* enzimi plazmit haritaları üzerinde görünmemektedir. pACT-NUP214_{ct} üzerinde *DraI* enzini kesim noktaları: 6, 340, 1032, 1051, 5021, 5304, 5323. pACT-NUPL2 üzerinde *DraI* enzini kesim noktaları: 6, 340, 1032, 1051, 3784, 4478, 4761.

pACT-NUP214_{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmit vektörlerinin doğrulukları hem restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek hem de DNA dizi analizi ile gösterildi. Şekil 17'de *XbaI* ve *DraI* enzimleri ile kesilen plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi ile profilleri verildi. Agaroz jel elektroforezi ile pACT2-NUP214_{ct} ve pACT2-NUPL2 plazmit vektörleri için beklenen boyutlarda DNA fragmentlerinin oluştuğu saptandı.



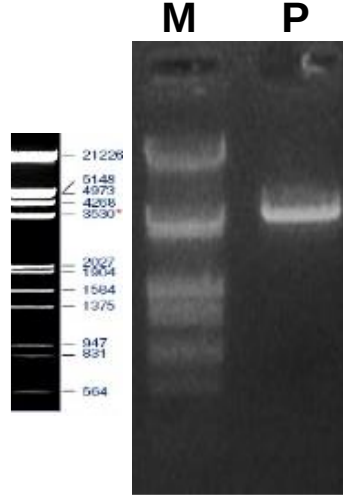
Şekil 17. *DraI* ve *XbaI* restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen pACT-NUP214_{ct} (A) ve pCHA-NUPL2 (B) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. P. Plazmit DNA'sı. M. λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Elektroforez işlemlerinde Şekil 2'de verilen koşullar uygulandı.

pACT2 plazmitine klonlanan genler Tablo 1’de nukleotid dizileri verilen pGAD-sq2-For ve/veya pGAD-sq2-Rev primerleri kullanılarak dizilendi. DNA dizi analizleri ile nukleotid dizilerinin plazmit vektörler için tasarlanan diziler ile bire bir uyumlu olduğu kanıtlandı (Şekil 18).



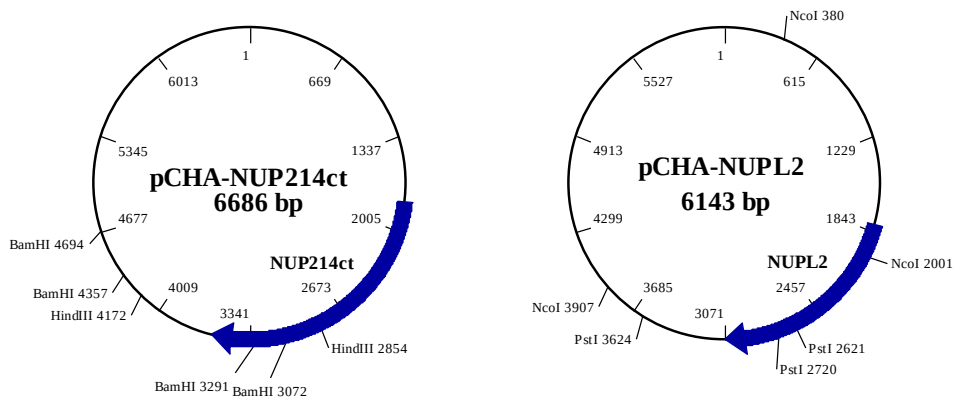
Şekil 18. pACT2 plazmitine klonlanan NUP214_{ct} ve NUPL2 genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

Memeli hücrelerinde yapılan testlerde kullanılmak üzere NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNAlarını HA uzaltılı olarak kodlayacak pCHA (Nagata ve ark., 1998) plazmit vektörüne klonlandı. Bunun için pCHA plazmit DNA’sı *EcoRV* restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 19).



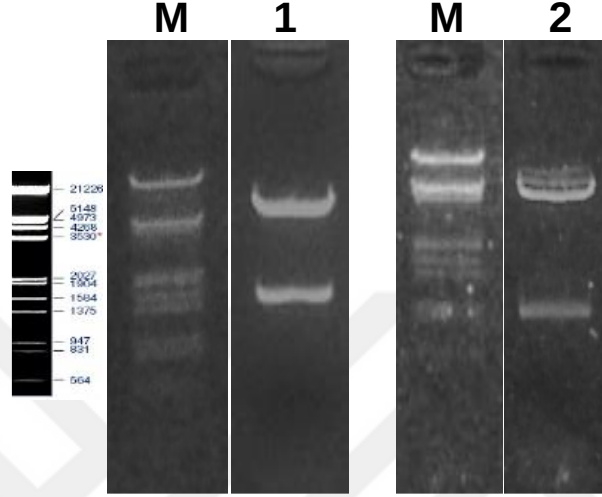
Şekil 19. *EcoRV* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **P.** Plazmit DNA'sı. **M.** λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Elektroforez işlemlerinde Şekil 2'de verilen koşullar uygulandı.

Doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'ları ile ligasyona uğratarak Şekil 20'de restriksiyon haritaları verilen pCHA-NUP214_{ct} ve pCHA-NUPL2 ekspresyon vektörleri elde edildi.



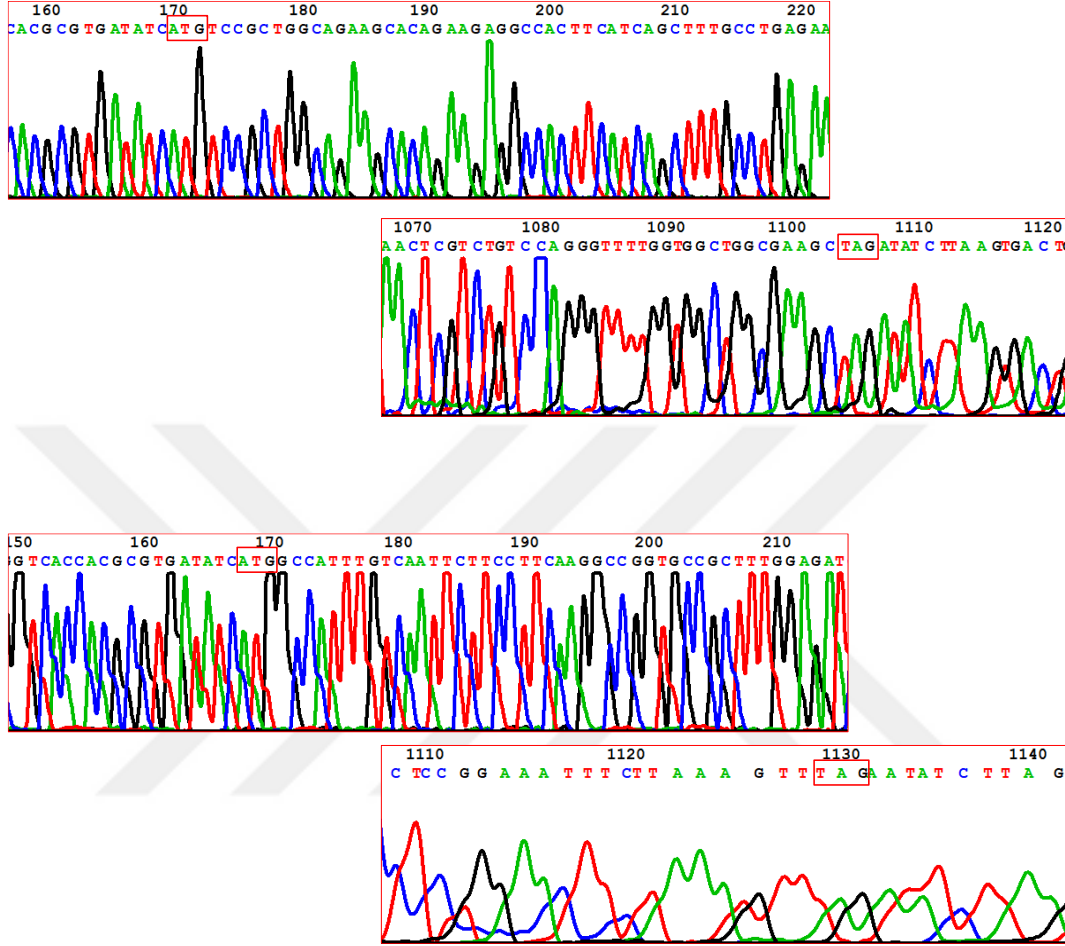
Şekil 20. NUP214_{ct} ve NUPL2 cDNA'larının pCHA plazmitine klonlanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. Plazmit haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

Plazmit vektörlerinin doğrulukları hem restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek hem de DNA dizi analizi ile gösterildi. Şekil 21’de *Hind*III ve *Pst*I enzimleri ile kesilen plazmit vektörlerin agaroz jel elektrofoezi ile profilleri verildi. Agaroz jel elektroforezi ile pCHA-NUP214_{ct} için 5368 bp ve 1319 bp boyutlarda; pCHA-NUPL2 için 5130 bp, 904 bp ve 109 bp beklenen boyutlarda DNA fragmentlerinin oluştuğu saptandı.



Şekil 21. pCHA-NUP214_{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmit vektörlerin restriksiyon enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. 1. *Hind*III enzimi ile kesilen pCHA-NUP214_{ct} plazmit DNA’sı. 2. *Pst*I enzimi ile kesilen pCHA-NUPL2 plazmit DNA’sı. M. λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III. Elektroforez işlemlerinde Şekil 2’de verilen koşullar uygulandı.

pCA sq-For ve/veya pCA sq-1850-Rev primerleri ile yapılan DNA dizi analizleri sonucunda ise, nukleotid dizilerinin plazmit vektörler için tasarlanan diziler ile birebir uyumlu olduğu kanıtlandı (Şekil 22).



Şekil 22. pCHA plazmitine klonlanan NUP214_{ct} ve NUPL2 genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

6.2. İnfluenza Virüsü NS2 Proteinini Kodlayan Plazmit Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Bulgular

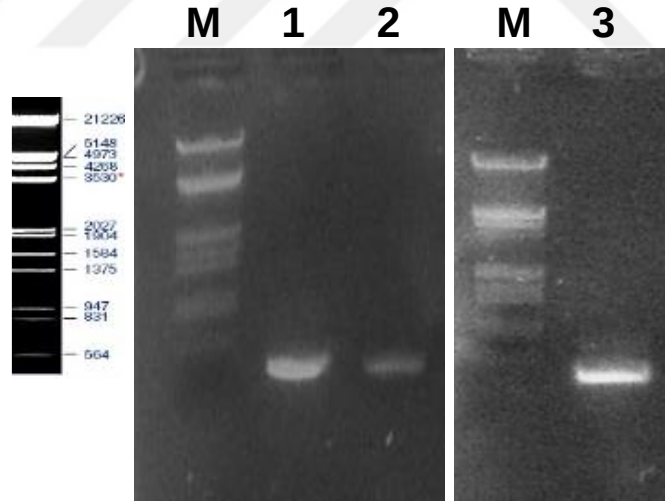
İnfluenza A/WSN/33-H1N1 virüsüne ait NS2 cDNA'sı pCAGGS memeli ekspresyon vektöründe flag (DYKDDDDK) ve GST uzantılı olarak klonlandı. Bunun için pGAGGS (Tsai ve ark., 1995), pCAGGS-GSTnls (Sugiyama ve ark., 2015) ve pCAGGS-p16 (Turan ve Ata, 2011) plazmit vektörlerinden yararlanıldı. NS2 cDNA'sı, daha önce bir proje kapsamında oluşturulan pGBD-NS2 plazmit vektörü (yayımlanmamış veri) üzerinde PZR ile çoğaltıldı. Üç farklı NS2 cDNA'sı hazırlandı. Bunlar; başlangıç ve bitim kodonları taşıyan doğal NS2 cDNA'sı, bitim kodonu taşımayan NS2 cDNA'sı ve 5'-ucunda flag kodlayıcı dizi taşıyan Flag-

NS2 cDNA'sı. Doğal NS2 cDNA'sı için Tablo 1'de nukleotid dizileri verilen NS1-NS2(W)-For / NS2(W)-Rev; bitim kodonu taşımayan NS2 cDNA'sı için NS1-NS2(W)-For / NS2(W)-minus-Rev; Flag-NS2 cDNA'sı için ise NS2(W)-Flag-For / NS2(W)-Rev primer çiftleri kullanıldı. Primerlerin oluşturulmasında influenza A/WSN/33-H1N1NS2 genine ait aşağıda verilen referans diziden yararlanıldı.

Influenza A/WSN/1933 NS2 cDNA'sı (Influenza Research Database / Access No: LC333189)

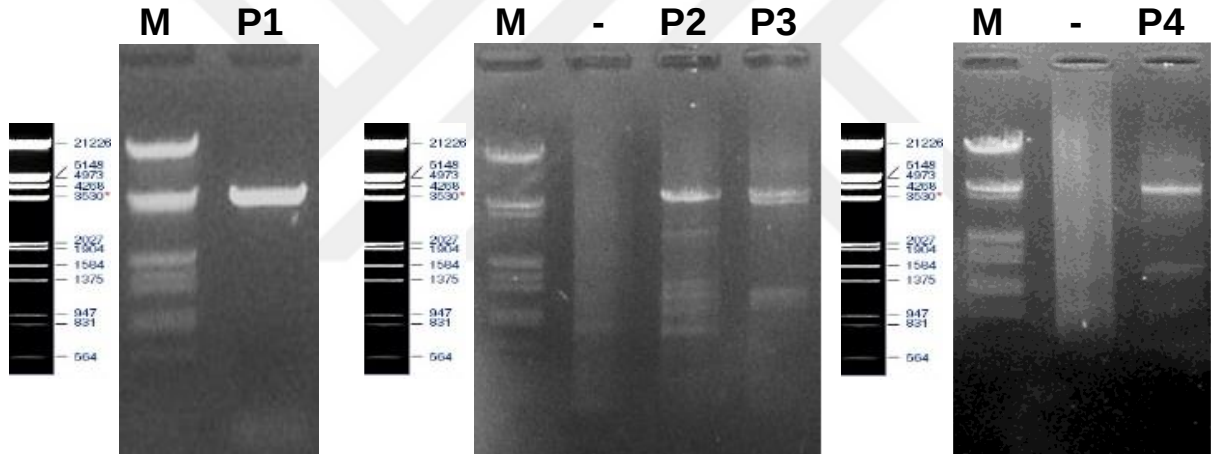
ATGGATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGACATACTGATGAGGATGTCAAAAATGCAGTT
GGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATAATAACACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACA
GAGATTGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAATGGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAAC
GGAAAATGGCGGGAACAATTAGGTCAGAAGTTTGAAGAAATAAGATGGTTGATTGAAGAAGT
GAGACACAGACTGAAGATAACAGAGAATAGTTTTGAGCAAATAACATTTATGCAAGCCTTAC
AACTATTGCTTGAAGTGGAGCAAGAGATAAGAACTTTCTCGTTTCAGCTTATTTAA

PZR sonucu elde edilen cDNA'lar Şekil 23'te görüldüğü gibi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve beklenen boyutlardaki NS2 cDNA'ları saflaştırılarak ekspresyon vektörlerine klonlanmak üzere kullanıldı.



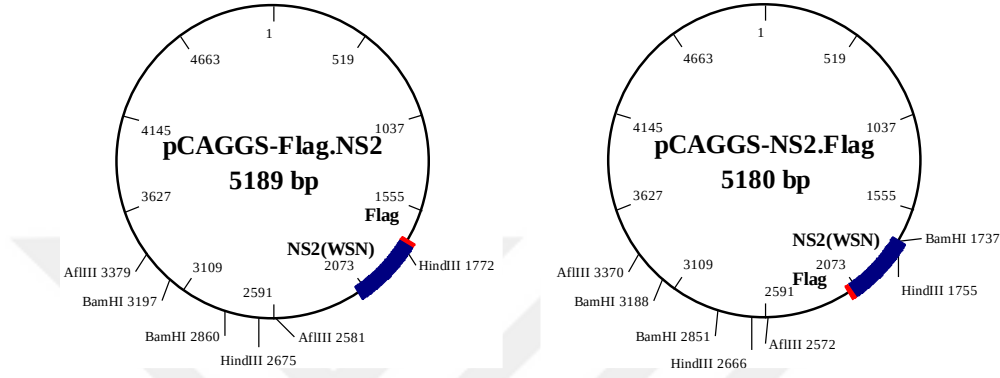
Şekil 23. pGBD-NS2 plazmit vektörü üzerinden PZR ile çoğaltılan başlangıç ve bitim kodonları taşıyan doğal NS2 (1), bitim kodonu taşımayan NS2 (2) ve 5'-ucunda flag uzantısı taşıyan NS2 (3) cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Elektroforez işlemi 100 volt sabit gerilim altında 20 dakikada tamamlandı. Elektroforez işlemlerinde Şekil 14'de verilen koşullar uygulandı.

NS2 cDNA'larının klonlanmasında kullanılan plazmit vektörlerden pCAGGS, *XhoI* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi (Şekil 24/P1). pCAGGS-GST ve pCAGGS-p16 plazmit vektörleri ters PZR ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi. İnfluenza NS2 cDNA'sı pCAGGS-GST plazmit vektöründe GST geni okuma çerçevesinden sonra (pCAGGS-GST-NS2) ve önce (pCAGGS-NS2-GST) olmak üzere iki farklı oryantasyonda klonlandı. Ters PZR ile plazmit DNA'sını GST okuma çerçevesinden önce açmak için GST-For / GST-Vec-Rev primer çifti; GST okuma çerçevesinden sonra bir noktadan açmak için ise pCA-Vec-For / GST(Gly)-Rev primer çiftleri kullanıldı. PZR sonucu elde edilen DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 24/P2 ve P3). pCAGGS-p16 plazmit DNA'sı Flag-For / pCA-Vec-Rev primer çifti kullanılarak, p16 geni dışında kalan, fakat Flag uzantısı taşıyacak şekilde ters PZR ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi (Şekil 24/P4)



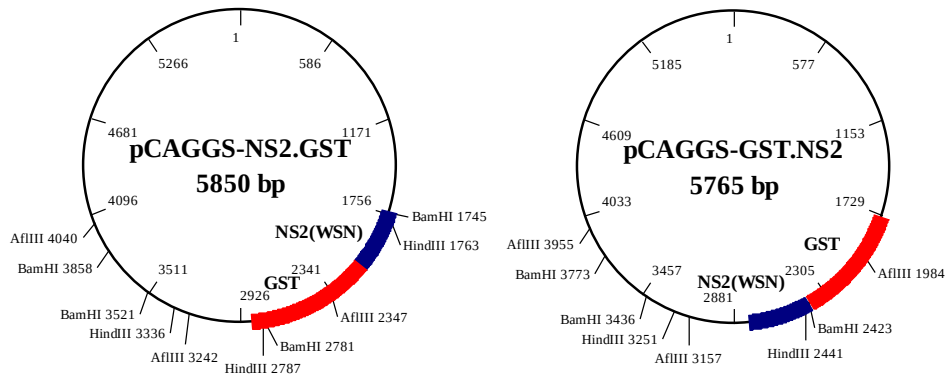
Şekil 24. Flag ya da GST uzantılı NS2 kodlayan vektörlerin oluşturulmasında kullanılmak üzere restriksiyon enzimi ile kesilerek ya da ters PZR ile çoğaltarak doğrusal hale getirilen plazmit DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **P1.** *XhoI* restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCAGGS plazmit DNA'sı. **P2.** Ters PZR ile GST geni okuma çerçevesinden önce açılarak doğrusal hale getirilen pCAGGS-GST plazmit DNA'sı. **P3.** Ters PZR ile GST geni okuma çerçevesinden sonra açılarak doğrusal hale getirilen pCAGGS-GST plazmit DNA'sı. **P4.** Ters PZR ile doğrusal halde elde edilen Flag uzantılı pCAGGS plazmit DNA'sı. **M.** λ DNA/*EcoRI*+*HindIII*. Elektroforez işlemlerinde Şekil 2'de verilen koşullar uygulandı.

XhoI restriksiyon endonukleaz enzimi ile doğrusal hale getirilen pCAGGS plazmit DNA'sı flag uzantılı NS2 cDNA'sı ile ligasyona uğratarak, Şekil 25'te restriksiyon haritası verilen pCAGGS-Flag NS2 plazmit vektör elde edildi. Flag uzantısı taşıyan pCAGGS plazmit DNA'sı bitim kodonu taşımayan NS2 cDNA'sı ile ligasyona uğratarak, pCAGGS-NS2.Flag plazmit vektörü elde edildi (Şekil 25).



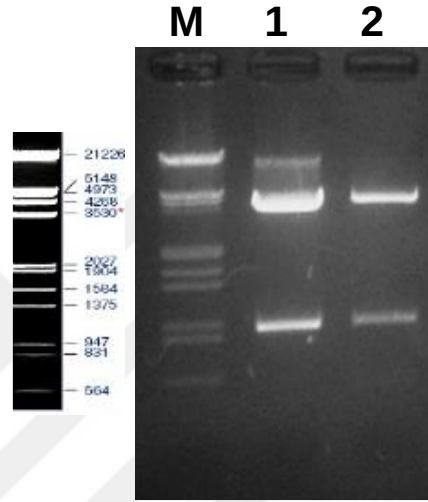
Şekil 25. pCAGGS plazmitinde iki farklı oryantasyonda Flag uzantısı taşıyan NS2 geninin klolanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. Plazmit haritalarının oluşturulmasında BioEdit programından yararlanıldı.

GST okuma çerçevesinden hemen önceki noktadan açılan pCAGGS-GST plazmiti, bitim kodonu taşımayan NS2 cDNA'sı ile GST okuma çerçevesinden sonraki bir noktadan açılan pCAGGS-GST plazmiti ise başlangıç ve bitim kodonları taşıyan NS2 cDNA'sı ile ligasyona uğrattıldı; bunun sonucunda pCAGGS-NS2.GST ve pCAGGS-GST.NS2 plazmit vektörleri elde edildi (Şekil 26).



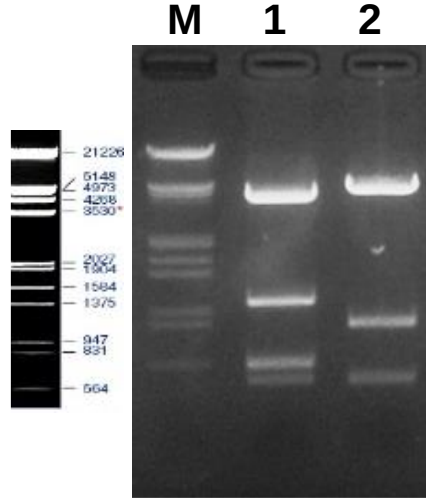
Şekil 26. pCAGGS plazmitinde iki farklı oryantasyonda GST uzantısı taşıyan NS2 geninin klolanması ile elde edilen vektörlerin restriksiyon haritaları. Plazmit haritalarının oluşturulmasında BioEdit programından yararlanıldı.

Flag ya da GST uzantılı NS2 genleri klonlanan plazmit vektörlerinin doğrulukları hem restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek hem de DNA dizi analizi ile gösterildi. Flag uzantılı NS2 geni taşıyan pCAGGS-NS2.Flag ve pCAGGS-Flag.NS2 plazmitleri *Hind*III enzimleri ile kesildi ve oluşan DNA fargmentleri anaroz jel elektroforezi ile analiz edildi (Şekil 27). Elektroforez sonuçları her iki plazmit vektör için beklenen boyutlarda DNA fragmentlerinin oluştuğunu ortaya koydu.



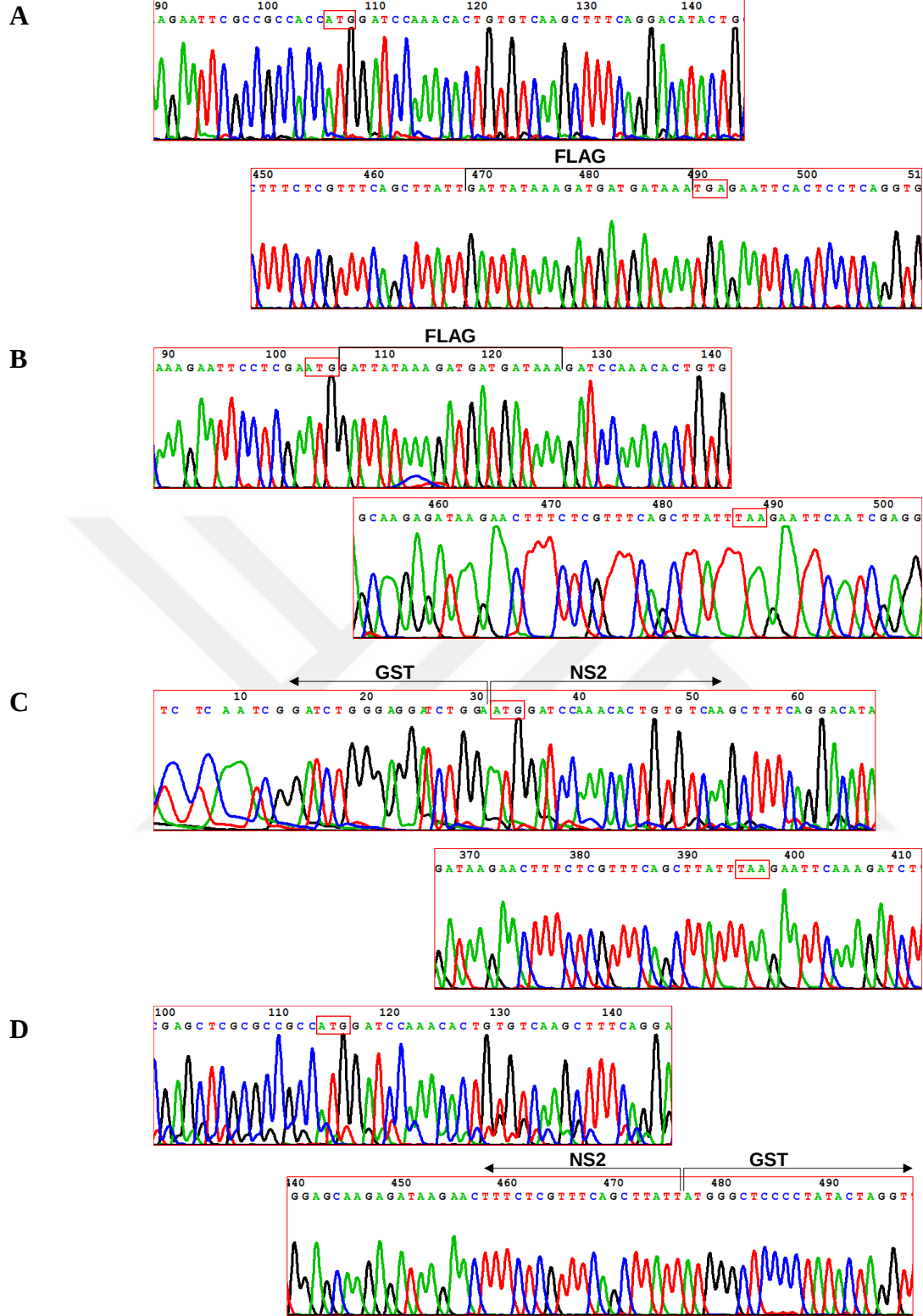
Şekil 27. *Hind*III restriksiyon endonukleaz enzimili ile kesilen pCAGGS-Flag.NS2 (1) ve pCAGGS-NS2.Flag (2) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III. Elektroforez işlemlerinde Şekil 14’de verilen koşullar uygulandı.

GST uzantılı NS2 geni taşıyan pCAGGS-NS2.GST ve pCAGGS-GST.NS2 plazmitleri *Hind*III enzimleri ile kesilerek kontrol edildi. Kesilen DNA örneklerine ait agaroz jel elektroforezi sonuçları Şekil 28’de verildi. Elde edilen kesim sonuçları, Şekil 26’da verilen restriksiyon haritaları ile uyumlu olduğunu gösterdi.



Şekil 28. *Hind*III restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen pCAGGS-NS2.GST (1) ve pCAGGS-GST.NS2 (2) plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **M.** λ DNA/*Eco*RI+*Hind*III. Elektroforez işlemlerinde Şekil 14’de verilen koşullar uygulandı.

Şekil 29’da pCAGGS plazmitinde Flag ya da GST uzantılı olarak klonlanan NS2 genlerine ait DNA dizi analizleri verildi. Bu plazmit vektöre klonlanan NS2 genlerinin dizi analizi Tablo 1’de verilen pCA sq-For, pGEX-5'-For ya da pCA sq-1850-Rev primerler ile gerçekleştirildi. Dizi analiz sonuçları, ekspresyon vektörlerini oluşturmak için tasarlanan gen dizileri ile birebir uyumlu olduğunu gösterdi.



Şekil 29. pCAGGS plazmitinde Flag ya da GST uzantılı olarak klonlanan NS2 genlerine ait DNA dizi analizleri kromatogramları. **A.** pCAGGS-NS2.Flag; **B.** pCAGGS-Flag.NS2; **C.** pCAGGS-GST.NS2; **D.** pCAGGS-NS2.GST. Kromatogramlar genlerinin sadece 5'- ve 3'- bölgelerini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

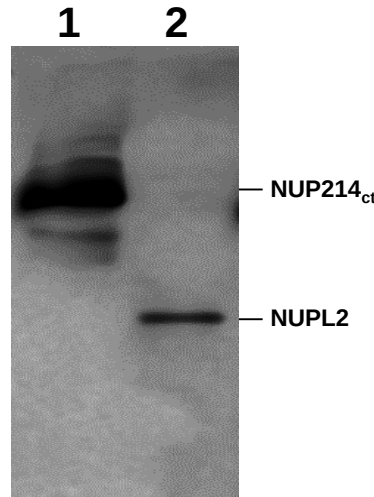
6.3. Konak hücre genleri (*NUP214* ve *NUPL2*) ve İnfluenza Virüsü NS2 geni Taşıyan Plazmit Vektörlerin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ile İlgili Veriler

İnsan *NUP214_{ct}*, *NUPL2* ve influenza A/WSN/33-H1N1 NS2 geni aktarılan plazmit vektörlerin ilgili proteinleri kodlayıp kodlamadıkları western melezleme teknikleri ile bu proteinlerin hücrelerde sentezi ve hücre içi lokalizasyonları ise immünfluoresan teknikler ile analiz edildi.

6.3.1. İnsan *NUP214_{ct}* ve *NUPL2* proteinlerinin western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları

Bu deneylerde HEK293 hücrlerinden yararlanıldı. Metot kısmında verildiği şekilde (bk. 5.23) 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler pCHA-*NUP214_{ct}* ve pCHA-*NUPL2* plazmitleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra hücreler SDS-örnek yükleme tamponunda parçalandı ve hücresel proteinler SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. Poliakrilamid jelde ayrıştırılan proteinler PVDF membranlara aktarıldı ve anti-HA antikorumla ile görünür hale getirildi (Şekil 30).

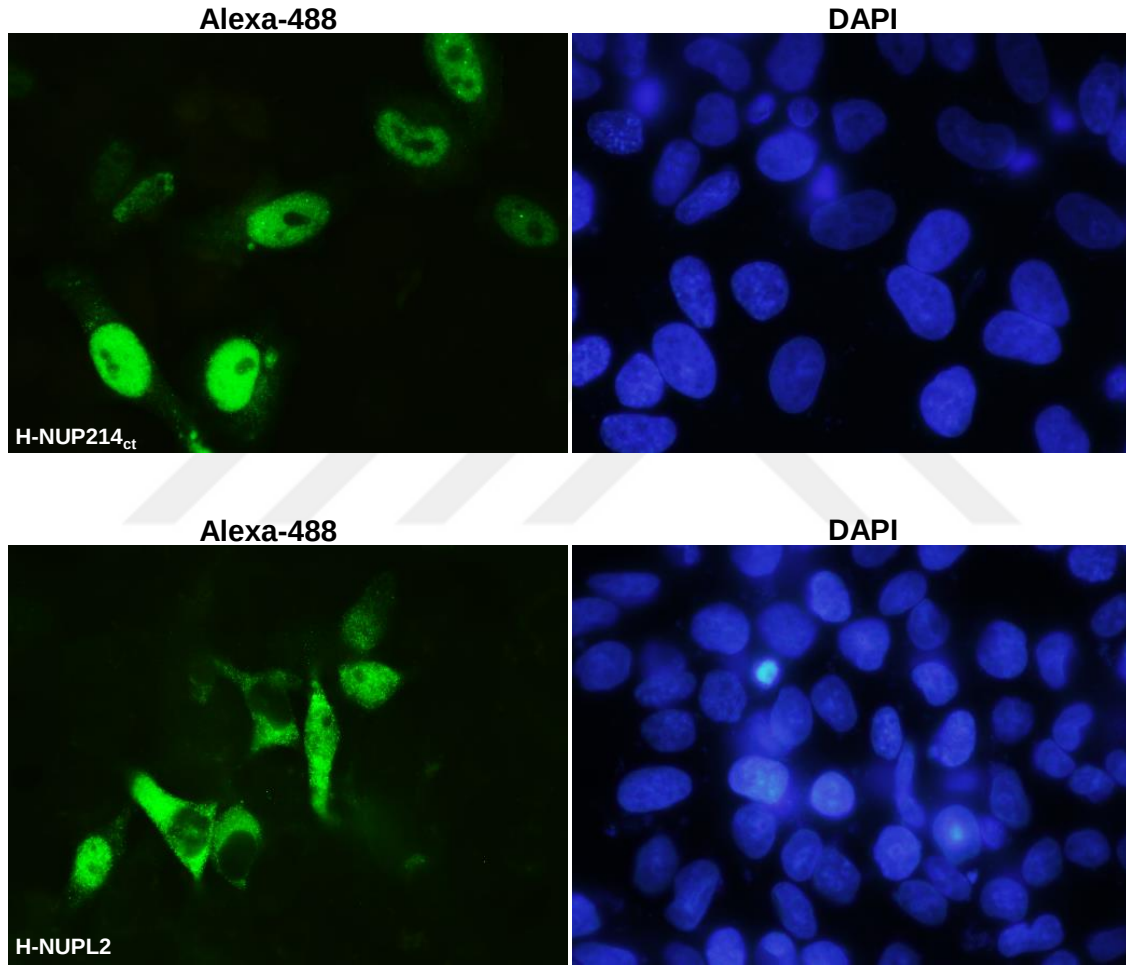
Elde edilen veriler, pCHA-*NUP214_{ct}* ve pCHA-*NUPL2* plazmitlerinin HEK293 hücrlerinde ekspresyon yaptıklarını gösterdi ve jel üzerinde H-*NUP214* için beklenen ortalama 60 kD, H-*NUPL2* için ortalama 45 kD büyüklüklerde protein bantları gözlemlendi.



Şekil 30. pCHA-*NUP214_{ct}* ve pCHA-*NUPL2* plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücrlerinde HA uzantılı *NUP214_{ct}* (1) ve *NUPL2* (2) proteinlerinin SDS-PAGE/western melezleme ile incelenmesi. Elektroforez işlemi 100x100x1 mm boylularında %10'luk poliakrilamid jeller kullanılarak, 80 volt/jel sabit gerilim altında 90 dakikada tamamlandı. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikor, sekonder antikor olarak anti-fare IgG-HRP kullanıldı. Proteinler DNR Bio-Görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

6.3.2. İnsan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerinin İmmünfloresan teknikler ile analizi sonuçları

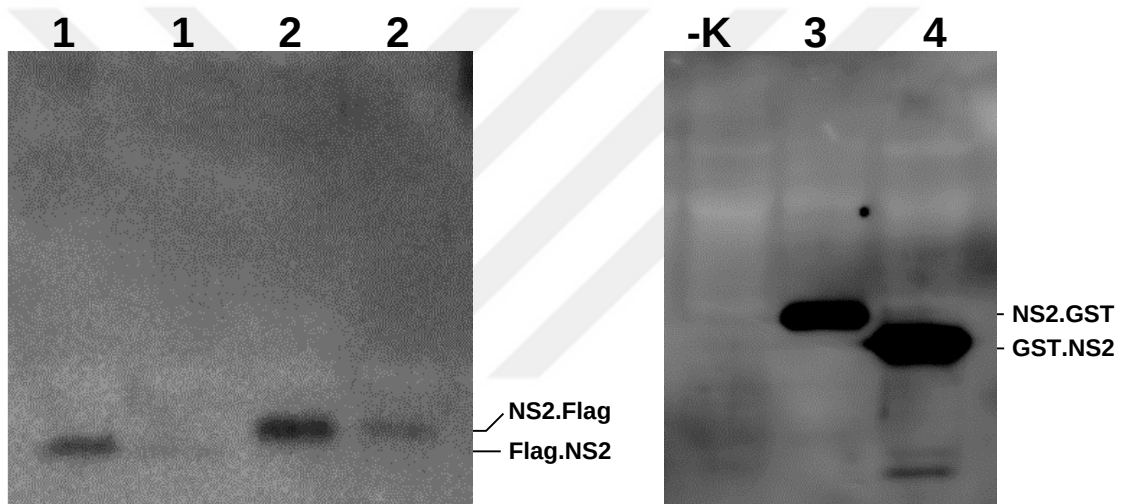
HA uzantılı insan NUP214 N-terminal bölgesi (NUP214_{ct}) ve NUPL2 proteinlerinin HeLa hücrlerinde ekspresyon ve lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile incelendiğinde pCHA-NUP214_{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmitleri ile transfekte edilen hücrlerde proteinlen anti-HA antikorları ile görüntülendi (Şekil 31). Geçici olarak transfete edilen HeLa hücrlerinde HA uzantılı NUP214_{ct}'ün hücre nukleusunda, NUPL2 proteinin ise daha çok hücre sitoplazmasında lokalize olduğu saptandı.



Şekil 31. pCHA-NUP214_{ct} veya pCHA-NUPL2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı H-NUP214_{ct} ve H-NUPL2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare orijinli anti-HA antikor (1/500 seyreltme) ve sekonder antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikor (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

6.3.3. NS2 proteinlerinin western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları

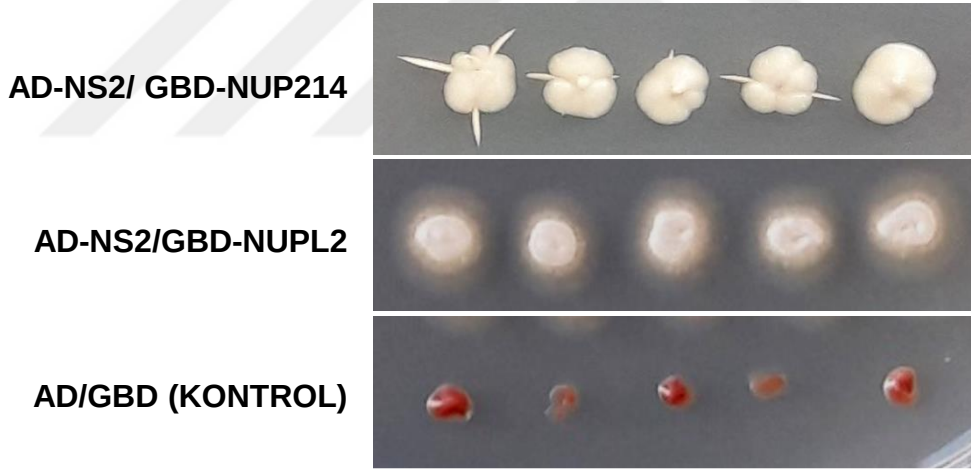
İnsan NUP214 ve NUPL2 proteinlerinde olduğu gibi flag ya da GST uzantılı NS2 proteinlerinin western melezleme analizlerinde HEK293 hücrlerinden yararlanıldı. Hücrler pCAGGS-NS2.Flag, pCAGGS-Flag.NS2, pCAGGS-NS2.GST ya da pGAGGS-GST.NS2 geçici olarak transfecte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra hücreler SDS-örnek yükleme tamponunda parçalandı ve proteinler SDS-PAGE/western melezleme tekniği ile incelendi. Flag ya da ya da GST uzantılı NS2 proteinleri anti-NS2, anti-Flag ve/veya anti-GST antikorları ile görünür hale getirildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 32’de verildi. Gerek flag uzantılı NS2 proteinleri (Flag-NS2 ve NS2-Flag için ~ 15 kD), gerekse GST uzantılı NS2 proteinleri için (NS2-GST ~ 43 kD; GST-NS2 ~ 40 kD) beklene büyüklüklerde protein bantları saptandı.



Şekil 32. Flag ya da GST uzantılı NS2 proteinleri kodlayan plazmitler ile transfecte edilen HEK293 hücrlerinde Flag-NS2 (1), NS2-Flag (2), NS2-GST (3) ve GST-NS2 (4) proteinlerinin SDS-PAGE/western melezleme tekniği ile incelenmesi. Elektroforez işlemi 100x100x1 mm boylularında %12,5’lik poliakrilamid jeller kullanılarak, 80 volt/jel sabit gerilim altında 75 dakikada tamamlandı. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak tavşan poliklonal anti-NS2 ve anti-GST antikorları, sekonder antikor olarak ise anti-tavşan IgG-HRP kullanıldı. Proteinler DNR Bio-Görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

6.4. Maya İkili-Hibrit Metodu ile Elde Edilen Sonuçlar

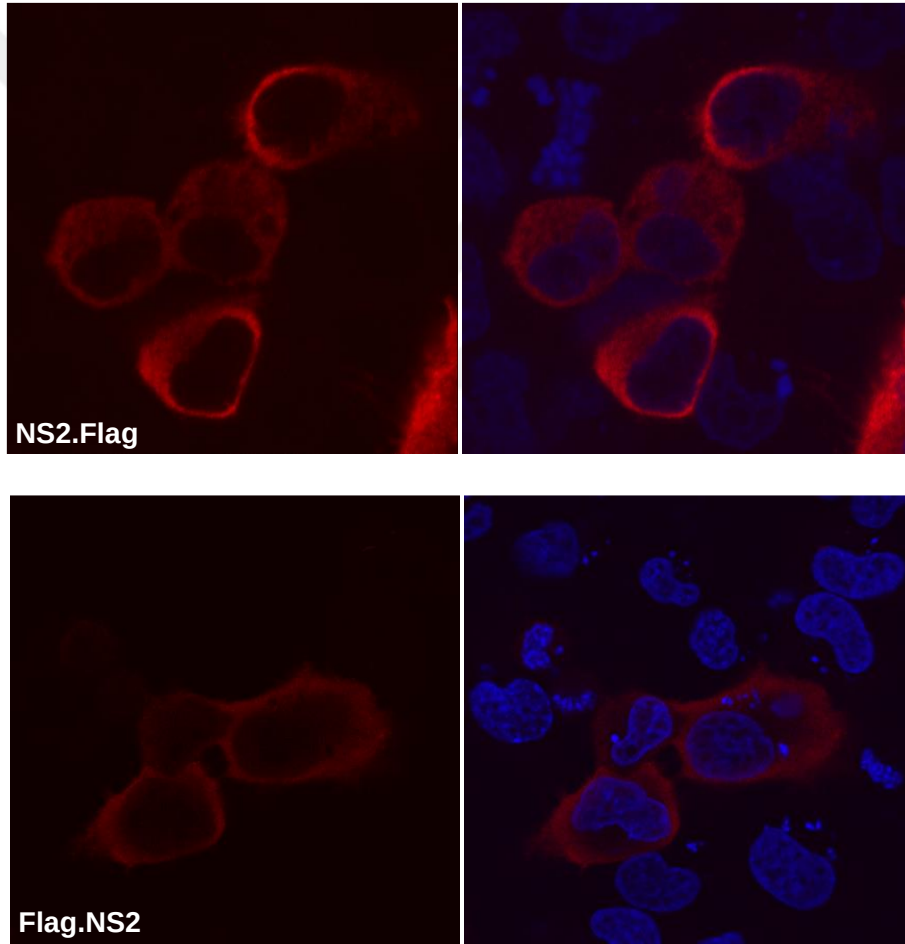
HEK293 cDNA'sı tarafından kodlanan proteinler arasından NS2 proteini ile ilişkili olanların seçildiği maya ikili-hibrit testi deneylerinde, NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerinin belirli bölgelerinin NS2 proteinine bağlandığı görülmüştür. Bu nedenle NUP214 proteinin orijinal interaktör proteine göre daha büyük bir bölümünü kapsayan karboksi terminal bölgesi ve tam boyutta NUPL2 proteininin NS2 proteini ile ilişkisi maya hücrlerinde yeniden test edildi. Bunun için pACT2-NUP214_{ct}/pGBD-NS2 ve pACT2-NUPL2/pGBD-NS2 plazmit çiftleri ile transforme edilen maya hücrlerinin SD(-) seçici besiyerlerinde üreme özellikleri araştırıldı. Şekil 33'den de görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan maya hücrlerinin (pACT2/pGBD-C1 plazmitleri ile transforme edilen hücrler) seçici besityerinde üreyemedikleri, buna karşın NUP214_{ct} ve NUPL2 interaktör proteinleri ile NS2 proteinini birlikte sentez eden hücrlerin üredikleri saptandı. Bu sonuçlar maya hücrlerinde NS2 proteininin hem NUP214 ile hem de NUPL2 ile fiziksel etkileşim gösterdiğini ortaya koydu.



Şekil 33. pACT2-NUP214_{ct}/pGBD-NS2, pACT2-NUPL2/pGBD-NS2 ve pACT2/pGBD-C1(kontrol) plazmit çiftleri ile transforme edilen *S. cerevisiae* PJ69-4A maya ırkının SD(-) seçici besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri.

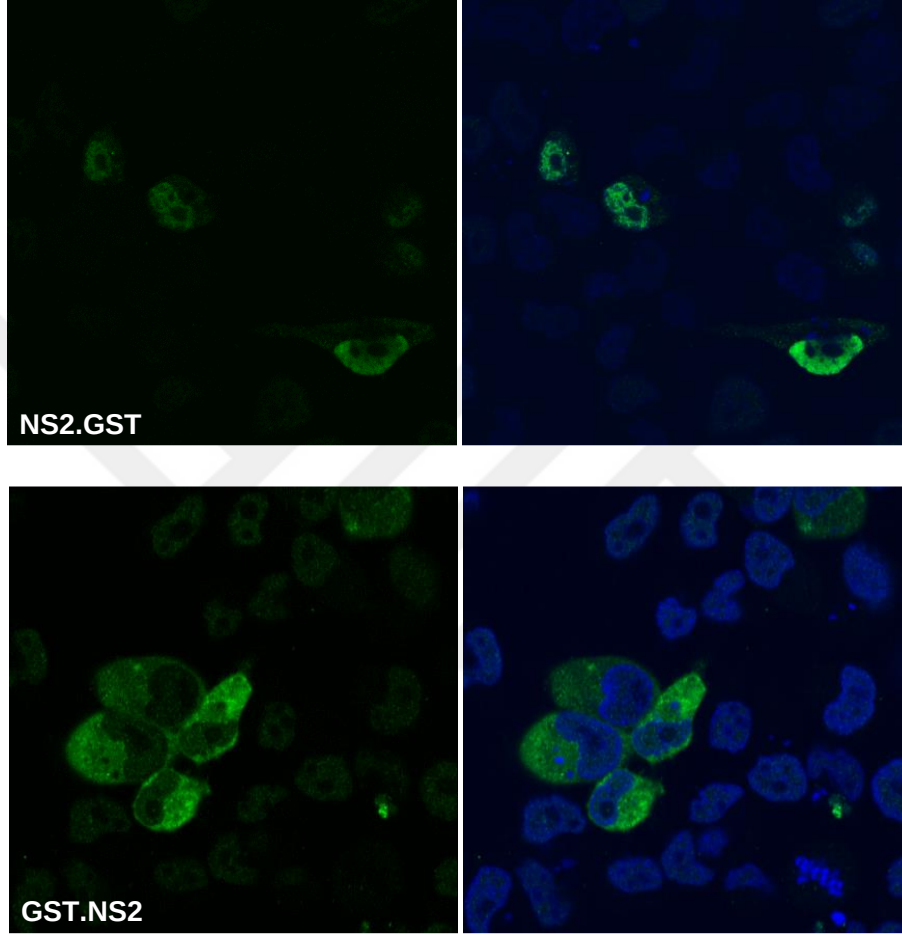
6.5. Hücrelerde Birlikte Sentez Edilen İnsan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri ile NS2 Proteinlerinin Lokalizasyonlarının İmmü Floresan Teknikler ile Analizi Sonuçları

Maya hücrelerinde influenza A virüsü NS2 proteini ile etkileşim gösteren NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerinin, insan orijinli HeLa hücrelerinde birlikte sentez edildiklerinde hücre içi lokalizasyonlarında bir değişme olup olmadığı, birlikte aynı bölgelerde lokalize olup olmadıkları immü floresan teknikler ile araştırıldı. HeLa hücreleri flag ya da GST uzantılı NS2 proteini kodlayan plazmitler tek olarak ya da NUP214_{ct} veya NUPL2 kodlayan plazmitlerle birlikte transfekte edildi. İlgili plazmitler ile geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde NS2-Flag ve Flag-NS2 proteinlerinin tek başlarına sentez edildiklerinde stoplazmik lokalizasyon gösterdiği saptandı (Şekil 34).



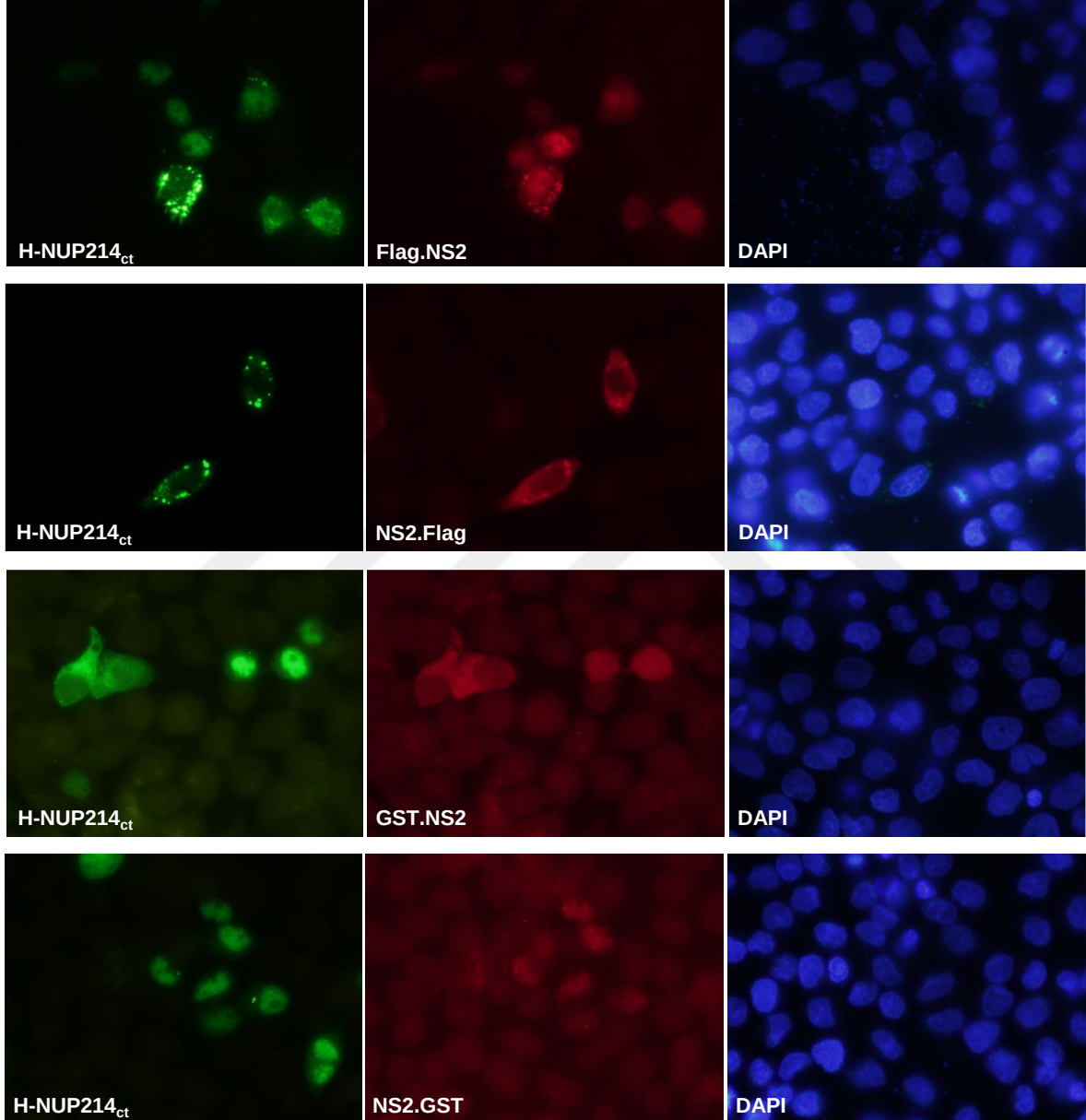
Şekil 34. pCAGGS-NS2.Flag veya pCAGGS-Flag.NS2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan Flag uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immü floresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak tavşan poliklonal anti-NS2 (1/500 seyreltme) ve sekonder antikor olarak ise Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikor (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nükleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler lazer taramalı konfokal mikroskop (Zeiss LSM 700) ile analiz edildi.

Benzer şekilde HeLa hücrlerinde tek başına sentez edildiğinde, GST uzantılı NS2 proteinlerden GST-NS2 proteininin hücre sitoplazmasında lokalize olduğu belirlendi. Buna karşın NS2-GST proteininin ise ağırlıklı olarak hücre nukleuslarında yer aldığı saptandı (Şekil 35). Dolayısıyla füzyon halindeki proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarda füzyonu oluşturan proteinlerin oryantasyonlarının önemli olduğu görüldü.



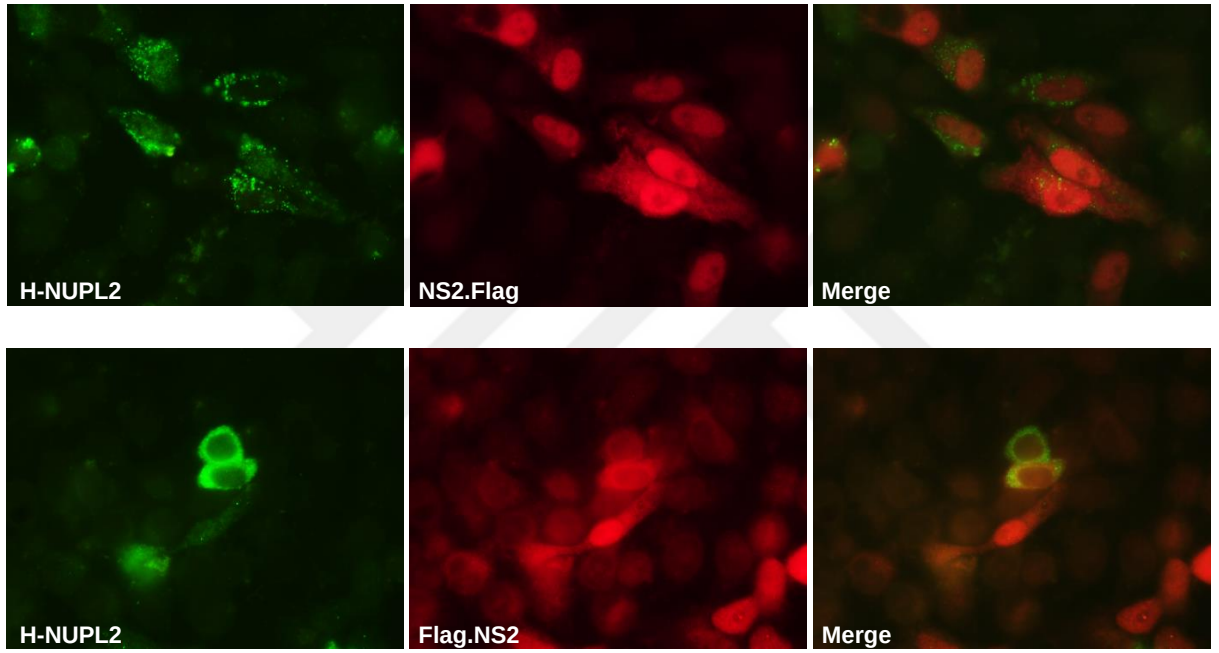
Şekil 35. pCAGGS-NS2.GST veya pCAGGS-GST.NS2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan GST uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak tavşan poliklonal anti-NS2 (1/500 seyreltme) ve sekonder antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-tavşan IgG antikor (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

Flag uzantılı NS2 proteinleri ve H-NUP214_{ct} proteinin HeLa hücrlerinde birlikte sentez edildiğinde her iki proteinin de belirgin şekilde benzer lokalizasyon profili gösterdiği saptandı (Şekil 36). Benzer şekilde GST uzantılı NS2 proteinleri de H-NUP214_{ct} proteinleri ile hücre içerisinde benzer lokalizasyon gösterdi (Şekil 36). Dolayısıyla NS2 ve NUP214_{ct} proteinlerinin memeli hücrlerinde de fiziksel olarak etkileşim halinde olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 36. H-NUP214_{ct} ve NS2 kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrlerinde H-NUP214_{ct} ile flag ya da GST uzantılı NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelemesi. Deneylerde primer antikor olarak fare orijinli anti-HA antikor (1/500 seyreltme) ve tavşan orijinli anti-NS2 antikor (1/500 seyreltme) birlikte kullanıldı. Primer antikorlar Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikor (1/300 seyreltme) ve Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikor (1/300 seyreltme) ile işaretlendi. Hücre nükleusları DAPI ile görüntüldü. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

HeLa hücrlerinde influenza virüsü NS2 proteini ile ilişkisi araştırılan konak proteinlerinden H-NUPL2 sitoplazmik lokalizasyon göstermektedir. Hücrelerde H-NUPL2 proteini ile birlikte sentez edilen NS2.Flag proteinin beklenmedik bir şekilde nukleusta lokalize olduğu görüldü (Şekil 37). Diğer taraftan Flag-NS2 proteinin H-NUPL2 gibi hücre sitoplazmasında yer aldığı saptandı. Bununla birlikte, Flag-NS2 proteinin tek başına sentez edildiği hücrlerde de sitoplazmada lokalize olması nedeniyle (bk. Şekil 34), normal floresan mikroskobu ile yapılan bu analiz sonuçlarından, Flag-NS2 proteininin H-NUPL2 ile ilişkili olduğu sonucuna varmak zordur.

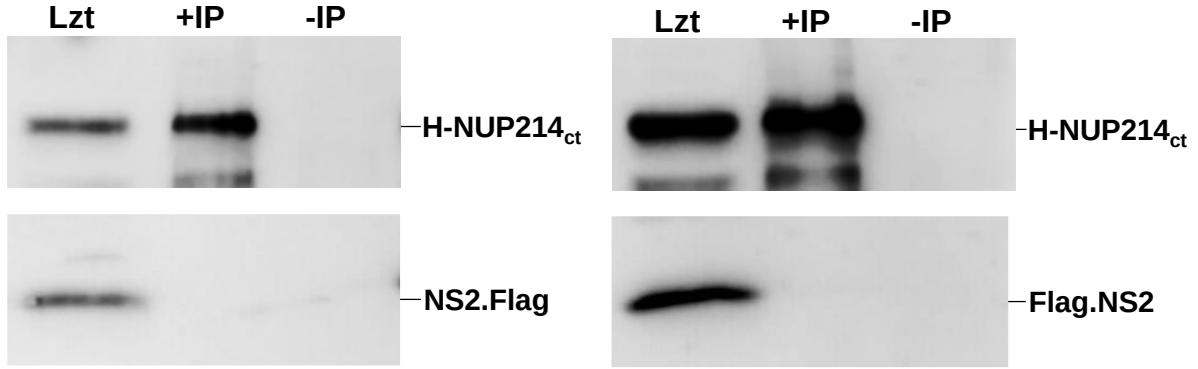


Şekil 37. H-NUPL2 ve Flag uzantılı NS2 kodlayan plazmit vektörler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deney Şekil 36’da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

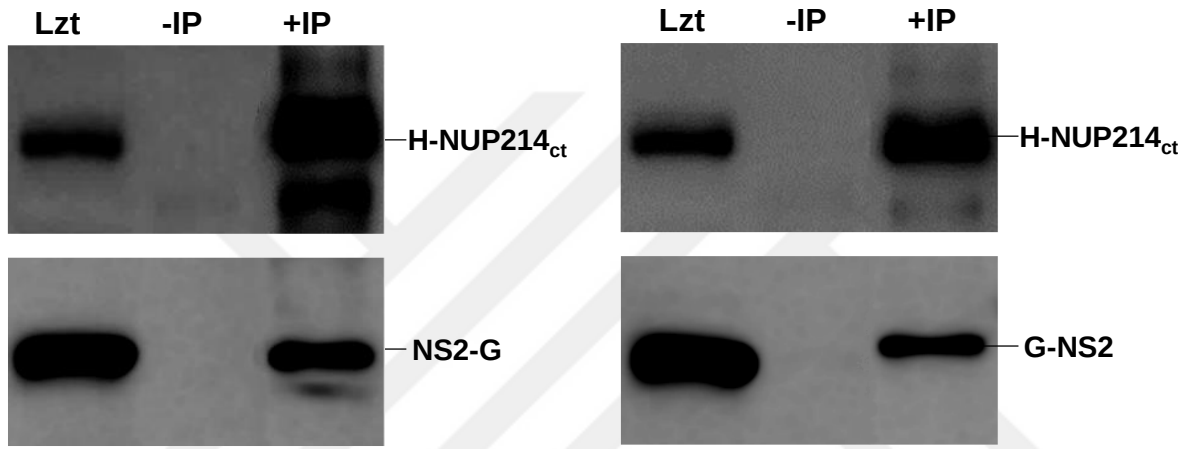
6.6. Hücrelerde Birlikte Sentez Edilen İnsan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri ile NS2 Proteinlerinin Birlikte Çöktürme Teknikleri ile Analizi Sonuçları

HEK-293 hücrelerinde geçici transfeksiyon sonrasında birlikte sentez edilen NUP214_{ct} ve NUPL2 ile İnfluenza A virüsü NS2 proteinleri arasındaki olası fiziksel ilişki birlikte immün çöktürme ve/veya GST ile çöktürme teknikleri ile araştırıldığında ilk aşamada hücrelerde HA uzantılı NUP214_{ct} proteini ile birlikte sentez edilen Flag uzantılı NS2 proteinleri arasındaki olası etkileşim, anti-HA antikorları ile immün çöktürme sonucu çökelen proteinlerin SDS-PAGE / Western melezleme teknikleriyle analiz edilmesiyle değerlendirildi. Şekil 38A’da görüldüğü gibi, HA uzantılı NUP214_{ct} proteininin anti-HA antikorları ile çökeldiği, buna karşın Flag-NS2 ve NS2-Flag proteinlerinin konak proteinleri ile birlikte çökemediği görüldü. Birlikte immün çöktürme deneyi, Flag uzantılı NS2 proteinleri yerine GST uzantılı NS2 (G-NS2 ve NS2-G) proteinleri ile tekrar edildi. Flag uzantılı NS proteinlerinin aksine GST ile farklı oryantasyonda füzyon oluşturan her iki NS2 proteininin de HA uzantılı NUP214_{ct} birlikte çökeldiği saptandı (Şekil 38B). NS2 ve NUP214_{ct} proteinleri arasındaki saptanan bu fiziksel etkileşim glutatyon-sefaroze ile çöktürme deneyleri ile de doğrulandı. GST uzantılı sentez edilen NS2 proteinleri glutatyon-sefaroze ile çöktürüldü ve çökelen proteinler Western melezleme tekniği ile incelendiğinde elde edilen veriler, antikor kullanmadan glutatyon-sefaroze ile çöktürme işleminde de NS2 ve NUP214_{ct} proteinlerinin birlikte çökeldiği görüldü (Şekil 38C).

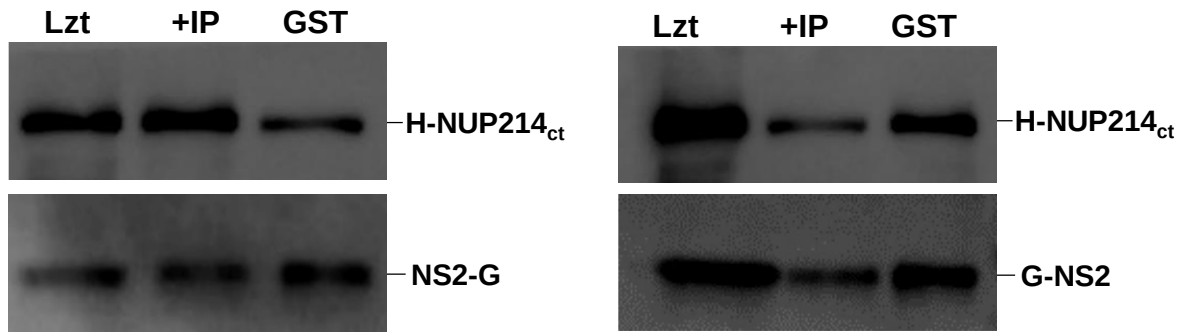
A



B



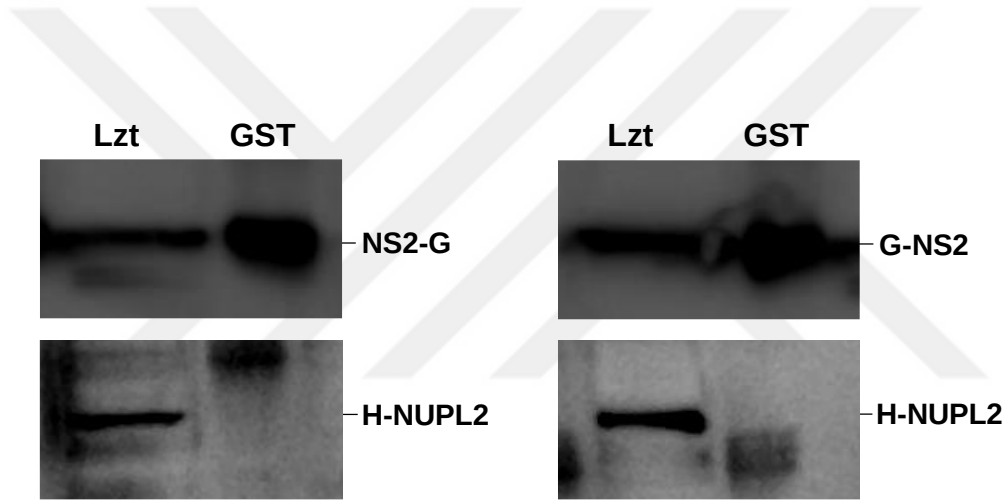
C



Şekil 38. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-NUP214_{ct} proteini ve NS2 proteinlerinin birlikte çöktürme ve sonrasında SDS-PAGE/Western melezleme tekniği analiz edilmesi. **A.** pCHA-NUP214_{ct} ve pCAGGS-NS2.Flag ya da pCAGGS-Flag.NS2 plazmit çiftleri ile transfekte hücrelerde hücre lizatlarından fare monoklonal anti-HA antikorları ile çöktürülen proteinler. **B.** pCHA-NUP214_{ct} ve pCAGGS-NS2.GST ya da pCAGGS-GST.NS2 plazmit çiftleri ile transfekte hücrelerde hücre lizatlarından fare monoklonal anti-HA antikorları ile çöktürülen proteinler. **C.** pCHA-NUP214_{ct} ve pCAGGS-NS2.GST ya da pCAGGS-GST.NS2 plazmit çiftleri ile transfekte hücrelerde hücre lizatlarından glutasyon sefaroza ile ya da monoklonal anti-HA antikorları ile çöktürülen proteinler. **Lzt** Total hücre lizatı. **+IP** spesifik

antikor (anti-HA) kullanılarak yapılan çöktürme. **-IP.** antikor eklemeyen yapılan çöktürme (kontrol). **GST.** Glutasyon sefaroza ile yapılan çöktürme. Elektroforez işlemi 100x100x1 mm boylarında %12,5'lik poliakrilamid jeller kullanılarak, 80 volt/jel sabit gerilim altında 75 dakikada tamamlandı. Western melezleme deneylerinde primer antikor olarak, fare monoklonal anti-HA antikor, tavşan poliklonal anti-NS2 (flag uzantılı NS2 proteinleri için) ve anti-GST antikor (GST uzantılı NS2 proteinleri için); sekonder antikor olarak ise HRP konjuge anti-fare IgG ya da anti-tavşan IgG kullanıldı. Proteinler DNR Bio-Görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

HA uzantılı NUPL2 proteini ile yapılan deneylerde ise NS2 proteinlerinin uygulanan koşullarda NUPL2 ile birlikte çökelmediği görüldü (Şekil 39).

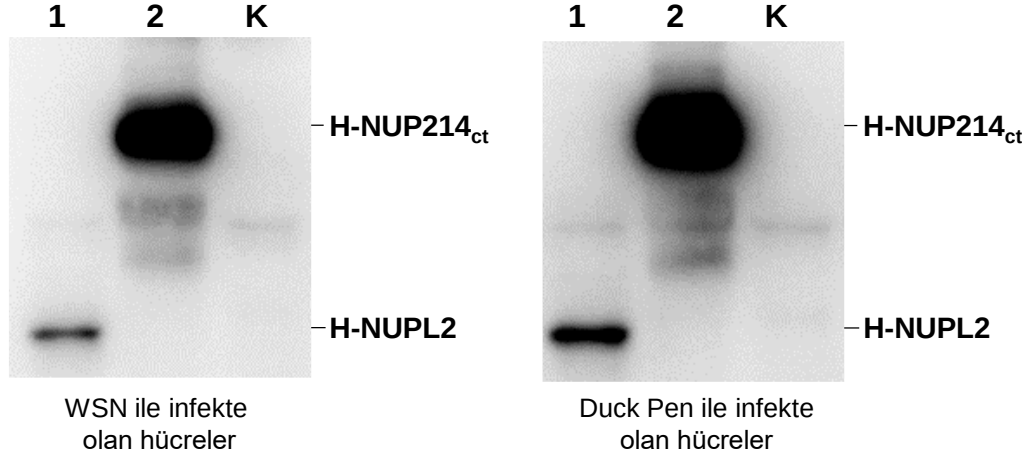


Şekil 39. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-NUPL2 proteini ve GST uzantılı NS2 proteinlerinin glutasyon sefaroza ile birlikte çöktürme ve sonrasında SDS-PAGE/Western melezleme tekniği analiz edilmesi. Elektroforez ve Western melezleme deneyi Şekil 30'da verilen koşullarda gerçekleştirildi.

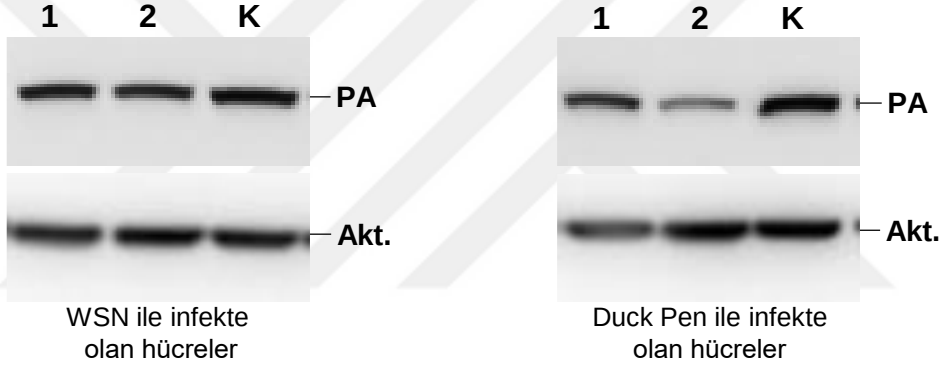
6.7. NUP214_{ct} ve NUPL2 Protein Miktarları Arttırılan Hücrelerde İnfluenza A Virüsü Replikasyonunun Seyri ile İlgili Veriler

Metot kısmında da anlatıldığı şekilde HEK293 hücreleri pCHA-NUP214_{ct}, pCHA-NUPL2 ve pCHA (kontrol) plazmitleri ile transfekte edilen hücrler influenza A/WSN/33-H1N1 ve influenza A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri ile infekte edildi. İnfeksiyondan hemen önce alınan hücre örneklerinde H-NUP214_{ct} ve H-NUPL2 proteinlerinin sentezi SDS-PAGE / western melezleme tekniği ile kontrol edildi ve hücrelerde bu proteinlerin sentez edildiği saptandı (Şekil 40A). İnfeksiyondan 8 saat sonra SDS örnek tamponunda parçalan hücre lizatlarında influenza virüsü PA protein miktarları kontrol plazmit vektör ile transfekte edilen örnek ile karşılaştırdı (Şekil 40B). Elde edilen veriler, hem H-NUP214_{ct} hem de H-NUPL2 düzeyi arttırılan hücrelerde A/WSN/33-H1N1 virüsü PA proteini düzeylerinin kontrole yakın düzeyde olduğunu, dolayısıyla viral replikasyonun fazla etkilenmediğini gösterdi. Buna karşın influenza A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsü replikasyonunun özellikle H-NUP214_{ct} proteinindeki artışa bağlı olarak önemli ölçüde yavaşladığını saptandı.

A



B



Şekil 40. pCHA-NUP214_{ct} ve pCHA-NUPL2 plazmitleri ile transfekte edilen ve transfeksiyondan 48 saat sonra influenza A virüsleri ile enfekte edilen HEK293 hücrlerinde H-NUP214_{ct} (1), H-NUPL2 (2) ve influenza A virüsü PA proteinlerinin western melezleme ile analiz edilmesi. **A.**Transfeksiyondan 44-45 saat sonra hücrlerde sentez edilen NUP214_{ct}, ve H-NUPL2 proteinleri. **B.** Transfeksiyon sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen hücrelerde enfeksiyonun sekizinci saatinde viral PA ve hücresel aktin proteini miktarları. **K** plazmit vektörler ile transfekte olmamış hücre lizatları. Deneylerinde primer antikor olarak, fare monoklonal anti-HA antikor, tavşan poliklonal anti-PA antikor ve fare monoklonal anti-aktin beta antikor; sekonder antikor olarak ise HRP konjuge anti-fare IgG ya da anti-tavşan IgG kullanıldı. Elektroforez ve western melezleme deneyi Şekil 18’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

7. TARTIŞMA

İnfluenza virüsleri replikasyon stratejileri bakımından diğer RNA genomu taşıyan virüslere göre önemli bir farklılık gösterir. RNA genomu taşıyan virüsler, konak hücrelerde kendi genom replikasyonları ve transkripsiyon olaylarını gerçekleştiren RNA bağımlı RNA polimeraz enzimlerini kodlayan genleri taşırlar (Bouvier ve Palese, 2008). Bu nedenle RNA virüslerinin büyük bir çoğunluğu bu iki temel işlevleri bakımından, konak hücre nükleusuna bağımlı olmadıklarından bunları sitoplazmada gerçekleştirirler (Dou ve ark., 2018). Buna karşın, influenza virüsleri kendi replikasyon ve transkripsiyon işlevlerini konak hücrelerin nükleusunda gerçekleştirmek zorundadırlar. Bunun en önemli nedeni, influenza virüsü RNA polimeraz enziminin konak hücre RNA polimeraz II enzimine ihtiyaç duymasındır (Josset ve ark., 2008). İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi, hücre nükleusunda sentez edilmekte olan konak mRNA'larının 7-metil guanozin şapka yapısı taşıyan 5'-ucundan birkaç nükleotitlik kısmını keser ve bu yapıyı kendi mRNA'larının sentezinde primer olarak kullanır. Dolayısıyla, influenza virüsünün 8 parçadan oluşan ve her biri NP proteinleri ile kompleks halinde olan tek iplikli RNA moleküllerinin (vRNA'lerin) enfeksiyonun ilk ilk aşamalarında hücre nükleusuna taşınması gerekmektedir (Josset ve ark., 2008; Shapiro ve ark., 1987). Benzer şekilde, viral enfeksiyonun son evrelerinde, nükleusta oluşmuş olan yeni vRNP'ler de sitoplazmaya taşınırlar (Miyake ve ark., 2019).

Ökaryotik organizma hücrelerinde, kalıtım materyali nükleus zarları ile sitoplazma ve diğer hücre organellerinden izole edilmiş halde bulunur. Bununla birlikte hücrenin farklı bölümlerinde gerçekleşen olaylar birbirleri ile sıkı ilişki içerisinde (Lim ve Fahrenkrog, 2006). Zarlar ile ayrılmış nükleus ile sitoplazma arasındaki kontrollü iletişim ve çok sayıda farklı molekülün hücre içi trafiği nükleus zarı üzerinde yer alan nüklear por kompleksleri ile sağlanır (Kapon ve ark., 2010). Genel bilgiler bölümünde de ayrıntılı olarak verildiği gibi, 30'den fazla sayıda protein molekülü nüklear por kompleksi yapısına katılır (Hoelz ve ark., 2011). Nüklear por kompleksleri sadece hücrenin kendisine ait RNA, protein ya da RNA-protein komplekslerinin giriş çıkışını kontrol etmekle kalmaz, aynı zamanda birçok DNA virüsünün ve RNA genomu taşıyan influenza virüslerinin genomlarının trafiğini de kontrol ederler (Greiner ve ark., 2018; Lachish-Zalait ve ark., 2009).

İnfluenza virüsü vRNA'ların hücre içi trafiğinde, hem hücresel hem de viral proteinlerin işlev gördüğü bilinmektedir. İnfluenza virüsü vRNP'lerinin hücrelerde sitoplazma ve nukleus arasında taşınmasında virüse ait M1, NP ve NS2 proteinleri, konak hücre proteinleri ile ortaklaşa işlev görmektedirler (Bui ve ark., 2000; Tynell ve ark., 2014). Nukleustan sitoplazmaya taşınma olayında viral M1 proteininin vRNA'lar ile vRNP-M1 kompleksleri oluşturarak olayı tetiklediği düşünülmektedir (Akarsu ve ark., 2003). Diğer taraftan, *in vitro* testler ile nuklear eksport sinyali taşıdığı gösterilen NS2 proteininin bu olaya katıldığı, dolayısıyla taşınmada vRNP-M1-NS2 kompleksinin oluştuğu ileri sürülmektedir (Iwatsuki-Horimoto ve ark., 2004). Nuklear por kompleksinde yer alan proteinlerden hNUP98 influenza virüs ile ilişkilendirilmektedir. Bu protein viral replikasyonun düzenlenmesi ve viral ribonukleoproteinlerin taşınması gibi işleve sahiptir (Chen ve ark., 2010; Funasaka ve ark., 2013). Bu tez çalışması kapsamında ise insan hücrelerinde nuklear por kompleksinde yer alan NUP214 ve nukleus-sitoplazma arsında molekül trafiğinde işlev gören NUPL2 proteininin influenza A virüsü NS2 proteini arasındaki olası etkileşim araştırılmıştır. Bu proteinler, NS2 bait proteini kullanılarak maya ikili hibrit metodu ile insan genom kitaplığı tarafından kodlanan proteinlerin taranması sonucunda, maya hücrelerinde NS2 ile etkileşim halinde olduğu saptanan proteinlerdir. Maya hücrelerinde NS2 proteinine bağlanan NUP214 ve NUPL2 proteinlerinin insan orijinli hücrelerde de fiziksel etkileşim gösterip göstermedikleri, birlikte çöktürme teknikleri (birlikte immün çöktürme; GST ile çöktürme) ve hücre içi immün lokalizasyon tekinleri ile analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Ele alınan bir protein bait için maya ikili hibrit metodu ile yapılan tarama çalışmalarında, maya transkripsiyon aktivatörüne (genellikle GAL4 proteini) ait aktivasyon bölgesini kodlayan dizi ile füzyon halinde cDNA kitaplıkları kullanılmaktadır. Transkripsiyon aktivatörü kodlayıcı dizi ile füzyon halindeki cDNA'lar genellikle ilgili genin tüm dizisini kapsamamakta, bu da yanlış pozitif sonuçlara yol açmaktadır. Bu nedenle çalışmanın ilk aşamasında NUPL2 geninin tam dizisi ve toplamda 6270 nukleotitten oluşan cDNA dizisine sahip, nispeten büyük olan NUP214 cDNA'sının 1815 bç'lik, proteinin karboksi-terminal bölgesini kodlayan dizi PZR ile çoğaltılarak (Şekil 14) pACT2 plazmitinde, GAL4 aktivasyon bölgesini kodlayan dizi ile aynı kodon çerçevesi içinde klonlandı ve pACT2-NUP214ct ve pACT2-NUPL2 plazmit vektörleri elde edildi. Bu plazmitler pGBD-NS2 bait plazmiti taşıyan maya hücrelerine yeniden transforme edildi ve elde edilen maya transformantlarının seçici besiyerlerinde üreme profilleri incelendi (Şekil 33). Şekil 33'te verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi, yeniden klonlanan NUP214ct ve NUPL2 genleri üzerinde kodlanan proteinlerin influenza A virüsü NS2 proteini

ile etkileşim gösterdiği ve buna bağlı olarak SD (-) seçici besiyerinde ikili maya transformantlarının çoğalabildiği saptandı. Yapılan bu doğrulama deneyleri sonrasında NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerinin insan orijinli hücrelerde NS2 proteini ile etkileşimleri ve influenza A virüsleri üzerindeki olası etkileri araştırıldı.

Memeli hücrelerinde proteinler arası etkileşimlerin ve protein fonksiyonlarının saptanmasında, rekombinant DNA teknolojilerinin sağladığı olanaklar çok büyük önem taşımaktadır. Üzerinde çalışılan proteinleri kodlayan genlerin siRNA'lar ile susturulması (*Ing. knock down*) (Sun ve ark., 2008), oldukça yeni bir teknik olan CRISPR/Cas9 tekniği (Bayat ve ark., 2018; McDonald ve ark., 2019) ya da klasik teknikler ile ilgili genlerin inaktive edilmesi (*Ing. knock out*), genlerin uygun vektörlere klonlanarak geçici transfeksiyon ile hücrelerde ilgili protein miktarlarının artırılması (*Ing. over-expression*) (Wohlgemuth ve ark., 2018), geçici transfeksiyonlarla hücrelerde birlikte sentez edilen proteinlerin birlikte immün çöktürme teknikleri (Vaughan ve ark., 2001) ya da immünfloresans teknikleri (Scalabrino ve Grimaldi, 1968; Tedcastle ve ark., 2012) ile analizi proteinlerin işlevlerinin araştırılmasında uygulanan başlıca tekniklerdir. Bu tez çalışması kapsamında da bu tekniklerin bir kısmından yararlanıldı. Bunun için PZR ile çoğaltılan insan NUP214_{ct} ve NUPL2 genleri (Şekil 14), hemaglutinin (HA) ve/veya glutatyon-S-transferaz (GST) kodlayan diziler ile kaynaşmış halde tavuk ovalbümin geni promotörü kontrolünde klonlanarak memeli hücrelerinde ekspresyon yapan rekombinant plazmit vektörler (pCHA-NUPL2, pCHA-NUP214, pCAGGS-GST-NUPL2 ve pCAGGS-GST-NUP214) elde edildi (Şekil). Diğer taraftan çalışmanın konusunu oluşturan influenza A virüsü NS2 proteinini kodlayan cDNA'lar (Şekil 24) da hem GST uzantılı hem de flag uzantılı NS2 kodlayacak şekilde ovalbümin geni promotörü kontrolünde klonlandı ve farklı uzantılar taşıyan NS2 kodlayıcı plazmit vektörler (pCAGGS-GST-NS2, pCAGGS-NS2-GST, pCAGGS-flag-NS2 ve pCAGGS-NS2-flag) elde edildi. Memeli hücrelerinde ekspresyon için oluşturulan insan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerini ve influenza A virüsü NS2 proteinini kodlayan plazmit vektörlerin tümünün nukleotid dizisi düzeyindeki kontrolleri DNA dizi analizleri ile gerçekleştirildi (Şekil 18, 22, 29).

Plazmit vektörlere klonlanan genlerin hücre içerisinde anlatım yapma düzeylerini belirleyen faktörlerin başında, geni kontrol eden promotör ve poliadenilasyon sinyali gibi düzenleyici bölgeler gelmekle birlikte, sentez edilen rekombinant protein miktarını belirleyen yegane faktörler değildir. Bu bakımdan plazmit vektörler ile transfekte edilen hücrelerde ilgili protein düzeyinin belirlenmesi gerekmektedir. Çalışma kapsamında oluşturulan insan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerini ve influenza A virüsü NS2 proteinlerini kodlayan plazmit

vektörler ile transfekte edilen HEK293 ve HeLa hücrelerinde ilgili proteinlerin sentez düzeyleri western melezleme tekniği ile bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile belirlendi. pCHA plazmitinde ovalbümin promotörü kontrolünde klonlanan NUP214_{ct} ve NUPL2 genlerinin HEK293 hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, NUP214_{ct} düzeyinin NUPL2 düzeyine göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 30). Her iki genin de aynı plazmitte aynı promotör kontrolünde klonlanmış olmasına karşın, kodladıkları protein düzeylerinin farklı olmasının, transkriptlerin ve/veya protein yarılanma ömürlerinin farklı olmasından ya da diğer hücresel olayları etkilemesinden kaynaklandığı sonucuna varıldı. NS2 geni taşıyan plazmitler ile transfekte HEK293 hücrelerinde GST proteini ile iki farklı oryantasyonda kaynaşmış halde sentez edilen NS2 protein miktarlarının birbirine yakın düzeylerde olduğu ve bu proteinlerin hücrelerde etkin bir şekilde sentez edildiği görüldü (Şekil 32). Benzer şekilde pCAGGS plazmit vektöründe ovalbümin geni promotörü kontrolünde klonlanan flag uzantılı NS2 genlerinin de HEK293 hücrelerinde western melezleme tekniği ile belirlenebilir düzeylerde NS2 proteini (NS2.Flag, Flag.NS2) ekspresse ettiği saptandı.

Proteinlerin işlevlerini saptamakta yararlanılan önemli parametrelerden biri proteinlerin hücre içi lokalizasyonları ve hücre içi trafiğidir. Bazı durumlarda, kaynaşmış halde sentez edilen proteinler taşıdıkları hücre içi lokalizasyon sinyallerinden bağımsız olarak farklı davranışlar sergileyebilmektedir (Yoneda ve ark., 1999). Bir başka durum, aynı anda sentez edilen iki protein arasındaki etkileşim nedeniyle birbirlerinin hücre içi konumunda değişmelere neden olabilirler. Bu bakımdan, plazmit vektörlere klonlanan insan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri ve influenza A virüsü NS2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları, bu proteinleri kodlayan plazmitler ile geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde immünfloresan boyama teknikleri ile analiz edildi. NUP214 proteinin sadece karboksi terminal bölgesi olan ve HA uzantısı taşıyan H-NUP214_{ct} proteinin HeLa hücrelerinde nuklear lokalizasyon gösterdiği belirlendi (Şekil 31). Doğal haliyle 2090 amino asitten oluşan NUP214 proteinleri hücrelerde sitoplazmada, nukleus membranına yakın bölgelerde yoğunlaşmış olarak lokalize olmaktadır (Lin ve ark., 2018; Mendes ve Fahrenkrog, 2019; Napetschnig ve ark., 2009; Pasdeloup ve ark., 2009). H-NUP214_{ct} proteinin nukleus içerisinde lokalize olmasında, proteine bağlı HA uzantısından ziyade, amino-terminalde büyük bir parçanın delesyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. pCHA plazmiti üzerinde HA uzantılı olarak kodlanan insan H-NUPL2 proteinin geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde çoğunlukla nukleusta lokalize olduğu, buna karşın bazı hücrelerde sitoplazmada da lokalize olduğu belirlendi. Hücrelerde

doğal olarak sentez edilen NUPL2 proteininin hücre nuklesunda lokalize olduğu bilinmektedir (Farjot ve ark., 1999). Bazı hücrelerde H-NUPL2 proteinlerinin sitoplazmik lokalizasyon göstermesi, bu proteinin hücrelerde normalden daha yüksek miktarda sentez edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hücrelerde proteinler arası direk etkileşim aynı bölgelerde loalkalizasyonu gerektirir. Çalışmaya konu olan proteinlerden, flag ya da GST uzantılı olarak sentez edilen influenza A virüsü NS2 proteininin hücre içi lokalizasyonları incelendiğinde, NS2-Flag ve Flag-NS2 proteinlerinin hücre sitoplazmasında lokalize olduğu görüldü (Şekil 34). GST uzantılı NS2 proteinlerinden NS2-GST proteinin hücre nukleusunda, GST-NS2 proteinin ise hücre sitoplazmasında lokalize olduğu saptandı (Şekil 35). NS2 proteinin infuenza virüs enfeksiyonunun geç evrelerinde hücre nukleusunda yığılma gösterdiği bilinmektedir (Robb ve ark., 2009). Dolayısıyla NS2-Flag ve Flag-NS2 proteinlerinin hücre sitoplazmasında lokalize, olması 8 amino asitten oluşan flag peptidinin (DYKDDDDK) NS2 proteini lokalizasyonu üzerinde etkili olduğu sonucunu vermektedir. Benzer şekilde GST uzantısı da NS2 proteinin lokalizasyonunda değişikliğe neden olmaktadır. Parazitik bir helmit olan *Schistosoma japonicum*'a ait GST enzimi (Smith ve Johnson, 1988) memeli hücrelerinde ekspresse olduğunda sitoplazmik lokalizasyon göstermektedir (Raza ve ark., 1991). GST-NS2 füzyon proteini HeLa hücrelerinde sitoplazmik lokalizasyon göstermiştir (Şekil 35). Buna karşın oryantasyon farklı olan NS2-GST füzyon proteinleri, daha çok hücre nukleusunda toplanmaktadır (Şekil 35). Bu durum füzyonu oluşturan iki farklı proteinin farklı oryantasyonlarda bulunmasının hem işlevsel açıdan hem de hücre içi lokalizasyon açısından farklılık gösterebileceği sonucunu vermektedir.

Proteinler arasındaki fiziksel etkileşim ve protein işlevlerinin saptanması çalışmalarında immünfloresan teknikler önemli bir yer tutmaktadır (Neumann ve ark., 2011). Hücrelerde iki ya da daha fazla sayıda protein farklı emisyon dalga boyuna sahip florokrom ile konjuge antikorlar ile işaretlendiğinde, birbirine çok yakın ya da birbirine bağlı proteinlerden yayılan ışımının örtüşmesi, floresan mikroskoplar ile belirlenmekte ve proteinler arası etkileşim için önemli bir veri sunmaktadır. Bu çalışma kapsamında da flag ya da GST uzantılı NS2 proteini kodlayan plazmit vektörler, HA uzantılı insan NUP214_{ct} ve NUPL2 kodlayan plazmitler ile birlikte HeLa hücrelerine transfekte edildi ve HeLa hücrelerde NS2 ve NUP proteinlerinin geçici olarak sentez edilmesi sağlandı. Şekil 36'de görüldüğü gibi NUP214_{ct} proteinin ve flag ya da GST uzantılı NS2 proteinlerinin benzer bölgelerde lokalize oldukları saptandı. Plazmit vektör üzerinden kodlanan NS2-Flag proteini tek başına sentez edildiğinde HeLa hücrelerinde

hücrelerin sitoplazmalarında lokalize olurken (Şekil 34), NUP214_{ct} proteinin ile birlikte sentez edildiğinde ağırlıklı olarak nukleuslarda lokalize olduğu ve birlikte lokalizasyon gösterdikleri belirlendi (Şekil 36). Bu sonuç, maya hücrelerinde fiziksel etkileşim halinde olan influenza A virüsü NS2 proteini ile insan NUP214 proteininin (Şekil 33) insan orijinli HeLa hücrelerinde de birbirleri ile ilişki halinde olduğunu ortaya koymaktadır. Amino terminal uça flag dizisi taşıyan Flag-NS2 proteini de HeLa NUP214_{ct} proteini ile birlikte lokalizasyon göstermektedir. HeLa hücrelerinde tek başına sentez edildiğinde ağırlıklı olarak nukleusta lokalize olan NUP214_{ct} proteinin, Flag-NS2 ile birlikte sentez edildiğinde hücre sitoplazmasında birikmesi bu iki protein birbirleri ile ilişkili oldukları tezini güçlendirmektedir. Farklı oryantasyonlarda GST uzantısı taşıyan NS2 proteinleri ve NUP214_{ct} proteini ile yapılan immunfloresan testlerde, flag uzantılı NS2 proteinleri ile yapılan testlere paralel sonuçlar elde edildi. Hücre nukleusunda lokalize olan NS2-GST proteini ile birlikte sentez edilen NUP214_{ct} proteinleri hücre nukleusunda; sitoplazmada lokalize olan GST-NS2 proteini ile birlikte sentez edilen NUP214_{ct} proteinleri hücre sitoplazmasında lokalizasyon gösterdi (Şekil 36).

Tez çalışması kapsamında ele alınan, nuklear por kompleksi ile ilişkili proteinlerden NUPL2'nin maya hücrelerinde influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkili olduğu, tam boyutta NUPL2'nin GAL4 aktivasyon bölgesini füzyon halinde sentez edilmesi ile doğrulandı (Şekil 33). Bununla birlikte, HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen NUPL2 ve flag uzantılı NS2 proteinler ile yapılan immünfloresan testlerden elde edilen veriler maya ikili hibrit testleri ile elde edilen sonuçları destekleyecek nitelikte bulunmadı (Şekil 37).

Hücrelerde sentez edilen ilgili proteinlerin birlikte immün çöktürme, ya da çeşitli afinite kolon kromatografileri ile birlikte fraksiyonlama metotları ile ayrıştırılması ve sonrasında SDS-PAGE/western melezleme ile bu proteinlerin analiz edilmesi, proteinler arası etkileşimlerinin saptanmasında kullanılan önemli biyokimyasal tekniklerdir. Bu tekniklerde proteinler doğal halleriyle analiz edilebileceği gibi rekombinant olarak HA (YPYDVDPDYA), flag (DYKDDDDK), Myc (EQKLISEEDL) ya da His (HHHHHH) gibi peptitler ile füzyon halinde sentez edilebilmektedir (Gloeckner ve ark., 2009; Krachmarova ve ark., 2017). Bu çalışmada da gerek influenza A virüsü NS2 proteini gerekse insan NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinleri, oluşturulan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrlerinde flag, GST ve/veya HA uzantılı olarak sentez edilmiştir. Proteinler arası ilişkinin saptanmasında birlikte immün çöktürme ve buna ek olarak GST ile çöktürme tekniği uygulanmıştır.

Proteinlerin birlikte immün çöktürme testlerinde HEK293 hücrleri NS2 ve NUP214_{ct} ya da NUPL2 proteini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edilmiş; daha sonra bu iki

proteini de sentez eden hücreler parçalanarak lizatlar elde edilmiştir. Hücre lizatlarına, anti-HA antikorarı eklenerek ve antikorların HA uzantılı NUP214_{ct} ya da NUPL2 proteinlerine bağlanması sağlanmış ve protein A sephaoroz ile bu proteinlerin çöktürülerek lizattan ayrışması sağlanmıştır. Daha sonra çökelen proteinler arasında hem NUP proteinleri hem de NS2 proteinlerinin varlığı SDS-PAGE/western melezleme tekniği ile anliz edilmiştir. Yapılan deneylerde NUP214_{ct} proteinin ile GST uzantılı NS2 proteinlerinin birlikte çökeldiği görülmüştür (Şekil 38). Bu sonuç influenza A virüsü ve NS2 proteini arasında fiziksel bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşın iki farklı oryantasyonda flag uzantısı taşıyan NS2 proteinleri ve NUP214_{ct} proteini ile yapılan birlikte immün çöktürme testlerinde beklenen birlikte çökme saptanamamıştır (Şekil 38). Bu sonucun alınmasında flag uzantısının etkili olduğu, NS2 ile NUP214_{ct} proteini arasındaki fiziksel etkileşimi zayıflatabileceği düşünülmektedir. Füzyon halinde sentez edilen proteinlerde, proteinlerin hücre içi lokalizasyon davranışlarının değişmesi ya da proteinlerin aktivitelerini kaybetmeleri sıklıkla rastlanan durumdur (Waugh, 2011). Örneğin *E. coli* hücrelerinde his uzantılı olarak sentez edilen Taq DNA polimeraz enzimi, PZR testlerinde aktivite göstermemiştir (Eken, 2017).

Glutasyon-sepharose boncuklara kolayca bağlanabilen ve ortamdan kolayca ayrılabilen GST enzimi de protein etkileşimlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Brady ve ark., 2011; Brady ve ark., 2004; Ren ve ark., 2003). NUP214_{ct} ve NS2 proteini arasındaki fiziksel etkileşim, GST ile çöktürme testleri ile desteklenmiştir. HA uzantılı NUP214_{ct} ve GST uzantılı NS2 proteinlerinin birlikte sentez edildiği hücrelerden hazırlanan lizatlar GST füzyon proteinleri Glutasyon-Sepharose boncuklara kullanılarak çöktürülmüş ve çökelen proteinler SDS-PAGE/western melezleme ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler HA uzantılı NUP214_{ct} proteininin GST uzantılı NS2 proetinleri ile birlikte çökeldiğini göstermiştir (Şekil 38).

Tez çalışması kapsamında ele alınan hücresel proteinlerden NUPL2 proteini ile influenza A virüsü NS2 proteini arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında GST ile çöktürme testlerinden yararlanılmıştır. SDS-PAGE/western melezleme testleri sonucu elde edilen verilerde, bu iki proteinin birlikte çökemediği saptanmıştır. Bu sonuç NUPL2 proteinin influenza A virüsü NS2 proteini arasında bir ilişki olmadığının bir kanıtı olmamakla birlikte, maya hücrelerinin aksine uygulanan koşullarda bu iki proteinin HEK293 hücrelerinde birbirleri ile etkileşim halinde olmadığını göstermektedir. Mayalar ökaryotik organizmalar olmakla birlikte, memeli hücrelerine göre çok daha basit yapıdadırlar. Diğer taraftan, NUPL2 ve NS2 genleri, maya ikili hibrit metodunda kullanılan plazmit vektörlerde GAL4 proteini kodlayan DNA dizileri ile aynı kodon çerçevesi içinde klonlanmış ve maya hücrelerinde sentez edilen

füzyon proteinleri farklı özellikler göstermektedir. Dolayısıyla NS2 ve NUPL2 proteinleri memeli hücrelerinde farklı davranışlar ortaya koyabilirler.

Bu çalışmanın önemli hedeflerinden biri de, maya ikili hibrit metodu ile belirlenen NS2 ile ilişkili proteinlerin, influenza A virüsü replikasyonun nasıl etkilediği sorusuna yanıt bulmaktır. Bunun için etkin yöntemlerden biri, konak hücrelerde ilgili protein düzeyinin, RNA interferens teknikleri ile düşürülmesidir. Bununla birlikte, tez çalışması kapsamında, sınırlı olanaklar nedeniyle bu teknikler uygulanamamıştır. Diğer taraftan, HEK293 hücreleri NUP214_{ct} ve NUPL2 proteinlerini kodlayan plazmitler ile transfekte ederek, bu proteinlerin hücre içi miktarları artırılmıştır (Şekil 40). Geçici olarak ilgili protein düzeyi artırılan HEK293 hücrelerin insan tipi (A/WSN/H1N1) ya da kuş tipi (A/duck/Pennsylvania-H5N2) influenza virüsleri ile enfekte edilmiş ve bu virüslerin çoğalma hızları viral PA proteininin western melezleme tekniği ile incelenmesi ile belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, NUP214_{ct} proteinindeki artışın özellikle kuş tipi influenza A virüsü replikasyonunda, kontrol hücrelere göre önemli düzeyde inhibisyona neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuç yukarıda verilen ve NUP214 proteininin ile NS2 arasında bir ilişki olduğunu gösteren verileri destekler niteliktedir.

Ökaryotik organizmaları oluşturan hücreler membranlar ile birbirinden ayrılmış, farklı işlevler üstlenen bölümlerden oluşmaktadır. Hücrelerin kalıtım materyalleri de çift katmanlı zar ile sitoplazmadan ayrılmış olan nükleus içinde yer almaktadır. Ökaryotik organizmalarda hücre yaşamı için temel bir işlev gen anlatımının RNA sentezi aşaması (transkripsiyon) hücre nükleusunda, buna karşın RNA'lar üzerinden protein sentezi (translasyon) hücre sitoplazmasında gerçekleşir. Dolayısıyla nükleusta sentez edilen RNA moleküllerinin önemli bir kısmı sitoplazmaya taşınmaktadır. Diğer taraftan hücre sitoplazmasında sentez edilen, fakat nükleusta işlev gören birçok protein ve diğer moleküllerin de nükleusa taşınması gerekmektedir. Bu taşınma olayın gerçekleşmesini ve kontrol altında tutulmasını sağlayan yapılar hücre nükleus zarında yer alan nüklear por kompleksleridir. Nüklear por kompleksleri 30'dan fazla sayıda proteinin oluşturduğu yapılardır (Hoelz ve ark., 2011). Nüklear por kompleksini oluşturan ve nükleoporinler olarak adlandırılan proteinler basit yapılı bir ökaryotik organizma olan maya'dan insan gibi kompleks organizmalara kadar evrimsel olarak iyi korunmuş proteinlerdir. Nükleoporinler sadece hücre içi molekül trafiğini kontrol etmekle kalmaz, birçok virüsün hücre içi replikasyonu ile ilişkili olaylarda da rol alırlar. Bu tez çalışmasında ele alınan ve influenza A NS2 proteini ile hem maya hücrelerinde hem de insan orijinli hücrelerde NUP214 proteini ile etkileşim halinde olduğu gösterilmiştir.

NUP214 proteini akut miyeloid lösemi ile ilişkili çalışmalarda keşfedilmiş ve CAN olarak isimlendirilmiştir (Kraemer ve ark., 1994). Daha sonra bu proteinin NUP214 olarak adlandırılması önerilmiştir. NUP214 protein memeli hücrelerinde nuklear por kompleksinde sitoplazma tarafında lokalize olmakta ve özellikle RNA gibi büyük moleküllerin aktif transportunda işlev görmektedir. Maya ve insan hücrelerinde mRNA'ların taşınmasında rol alan ATPaz aktivitesine sahip DBP5 proteini RNA moleküllerine bağlanma yeteneğine sahiptir ve taşıma olayında NUP214 ile koordine bir şekilde çalıştığı bilinmektedir. Sitoplazmik NUP214'ün DBP5 proteini RNA bağlanma ve ATPaz aktivitelerini düşürdüğü ve bu olayın nuklear çıkışın son aşamasında RNA'nın serbest kalmasına yol açtığı ileri sürülmektedir (von Moeller ve ark., 2009). İnfluenza A virüsü vRNP'lerin nukleustan sitoplazmaya taşınmasında vRNP'ler ile kompleks oluşturduğu belirtilen NS2 proteininin de, NUP214 proteine bağlanarak benzer bir işlev görme olasılığı vardır. Hücrelerde fazla miktarda sentez edilen NUP214_{ct} proteinin viral replikasyonu negatif yönde etkilemesi bu olasılığı desteklemektedir.

Yapılan çalışmalar NUP214 proteini enfekte hücrelerde HIV-1 virüsü bileşenlerinin hücre içi trafiğinde de işlev gördüğünü göstermiştir. Yapısında RNA molekülü de bulunan HIV-1 Rev kompleksinin insan CRM1 proteini ile nukleo-sitoplazmik çıkışında, nuklear por kompleksi periferinde bulunan NUP98 ve NUP214 proteinin de olay direkt olarak katıldıkları rapor edilmektedir (Zolotukhin ve Felber, 1999). Dolayısıyla, NUP214 proteinin farklı virüslere ait viral bileşenlerin hücre içi trafiğinde yaygın olarak işlev gören hücresel bir faktör olabilir.

Özetle, bu tez çalışması kapsamında, maya ikili hibrit metodu ile metodu ile influenza A virüsü NS2 proteini ile ilişkilendirilen NUPL2 ve NUP214 proteinlerinin, insan orijinli ökaryotik hücrelerde influenza A virüsü ile ilişkisi ele alınmıştır. Yapılan biyokimyasal analizler sonucunda NUP214 proteinlerinin insan hücrelerinde de NS2 ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Elde edilen bu sonuç, influenza A virüsü vRNP'lerinin nukleo-sitoplazmik transportunda, konak hücre proteinlerinden NUP214 proteinin de katıldığı bir mekanizma ile gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, moleküler düzeyde bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği sorusu yanıtlanmayı beklemektedir. Virüs ile enfekte hücrelerde viral bileşenlerin hücre içi trafiği ile ilgili aydınlatılan her hücresel faktör ve her bir mekanizma, virüsler ile mücadelede kazanılmış olan önemli bir başarı olarak görülmektedir.

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.
- Akarsu H, Burmeister WP, Petosa C, Petit I, Muller CW, Ruigrok RW, Baudin F: Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *EMBO J* 2003;22:4646-4655.
- Alexander DJ: An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 2007;25:5637-5644.
- Alonso-Caplen FV, Krug RM: Regulation of the extent of splicing of influenza virus NS1 mRNA: role of the rates of splicing and of the nucleocytoplasmic transport of NS1 mRNA. *Mol Cell Biol* 1991;11:1092-1098.
- Alonso-Caplen FV, Nemeroff ME, Qiu Y, Krug RM: Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. *Genes Dev* 1992;6:255-267.
- Antonin W: Nuclear envelope: membrane bending for pore formation? *Curr Biol* 2009;19:R410-412.
- Apostolov K, Flewett TH: Further observations on the structure of influenza viruses A and C. *J Gen Virol* 1969;4:365-370.
- Asha K, Kumar B: Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J Clin Med* 2019;8.
- Bancroft CT, Parslow TG: Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *J Virol* 2002;76:7133-7139.
- Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW: Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* 1994;13:3158-3165.
- Bayat H, Naderi F, Khan AH, Memarnejadian A, Rahimpour A: The Impact of CRISPR-Cas System on Antiviral Therapy. *Adv Pharm Bull* 2018;8:591-597.
- Bouvier NM, Palese P: The biology of influenza viruses. *Vaccine* 2008;26 Suppl 4:D49-53.
- Brady AE, Chen Y, Limbird LE, Wang Q: Study of GPCR-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. *Methods in molecular biology* 2011;746:347-355.

- Brady AE, Wang Q, Limbird LE: Study of G-protein-coupled receptor-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. *Methods in molecular biology* 2004;259:371-378.
- 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.
- Chase GP, Rameix-Welti MA, Zvirbliene A, Zvirblis G, Gotz V, Wolff T, Naffakh N, Schwemmle M: Influenza virus ribonucleoprotein complexes gain preferential access to cellular export machinery through chromatin targeting. *PLoS Pathog* 2011;7:e1002187.
- Chen J, Huang S, Chen Z: Human cellular protein nucleoporin hNup98 interacts with influenza A virus NS2/nuclear export protein and overexpression of its GLFG repeat domain can inhibit virus propagation. *J Gen Virol* 2010;91:2474-2484.
- Couch RB: Orthomyxoviruses; in th, Baron S (eds): *Medical Microbiology*. Galveston (TX), 1996.
- Couch RB, Kasel JA: Immunity to influenza in man. *Annu Rev Microbiol* 1983;37:529-549.
- de Vries RD, Herfst S, Richard M: Avian Influenza A Virus Pandemic Preparedness and Vaccine Development. *Vaccines (Basel)* 2018;6.
- 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.
- Beken, B : A Simplified method for the extraction of recombinant Taq DNA polymerase from *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science* 2018;445-448.
- Fahrenkrog B: The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84:279-286.
- Falsey AR, Cunningham CK, Barker WH, Kouides RW, Yuen JB, Menegus M, Weiner LB, Bonville CA, Betts RF: Respiratory syncytial virus and influenza A infections in the hospitalized elderly. *J Infect Dis* 1995;172:389-394.
- Farjot G, Sergeant A, Mikaelian I: A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J Biol Chem* 1999;274:17309-17317.
- Fernandez-Martinez J, Kim SJ, Shi Y, Upla P, Pellarin R, Gagnon M, Chemmama IE, Wang J, Nudelman I, Zhang W, Williams R, Rice WJ, Stokes DL, Zenklusen D, Chait BT, Sali A, Rout MP: Structure and Function of the Nuclear Pore Complex Cytoplasmic mRNA Export Platform. *Cell* 2016;167:1215-1228 e1225.

- 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.
- Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD: Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005;79:2814-2822.
- Fujii Y, Goto H, Watanabe T, Yoshida T, Kawaoka Y: Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003a;100:2002-2007.
- Fujii Y, Watanabe T, Horimoto T, Kawaoka Y: [The enigma of influenza virus genome packaging revealed]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2003b;48:1357-1363.
- Funasaka T, Balan V, Raz A, Wong RW: Nucleoporin Nup98 mediates galectin-3 nuclear-cytoplasmic trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;434:155-161.
- 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.
- Goto H, Muramoto Y, Noda T, Kawaoka Y: The genome-packaging signal of the influenza A virus genome comprises a genome incorporation signal and a genome-bundling signal. *J Virol* 2013;87:11316-11322.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977;36:59-74.
- Green MR, Sambrook J: Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with Sodium Dodecyl Sulfate: Maxipreps. *Cold Spring Harb Protoc* 2018;2018:pdb prot093351.
- Greiner T, Moroni A, Van Etten JL, Thiel G: Genes for Membrane Transport Proteins: Not So Rare in Viruses. *Viruses* 2018;10.
- Halder UC, Bagchi P, Chattopadhyay S, Dutta D, Chawla-Sarkar M: Cell death regulation during influenza A virus infection by matrix (M1) protein: a model of viral control over the cellular survival pathway. *Cell Death Dis* 2011;2:e197.
- Hay AJ, McCauley JW: The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)- A future perspective. *Influenza Other Respir Viruses* 2018.
- Hinshaw VS, Air GM, Schild GC, Newman RW: Characterization of a novel haemagglutinin subtype (H13) of influenza A viruses from gulls. *Bull World Health Organ* 1983;61:677-679.
- Hoelz A, Debler EW, Blobel G: The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 2011;80:613-643.
- Hutchinson EC: Influenza Virus. *Trends Microbiol* 2018;26:809-810.

- Ierardi LA, Moss SB, Bellve AR: Synaptonemal complexes are integral components of the isolated mouse spermatocyte nuclear matrix. *J Cell Biol* 1983;96:1717-1726.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 1990;96:23-28.
- Iwatsuki-Horimoto K, Horimoto T, Fujii Y, Kawaoka Y: Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol* 2004;78:10149-10155.
- Jakeman KJ, Smith H, Sweet C: Mechanism of immunity to influenza: maternal and passive neonatal protection following immunization of adult ferrets with a live vaccinia-influenza virus haemagglutinin recombinant but not with recombinants containing other influenza virus proteins. *J Gen Virol* 1989;70 (Pt 6):1523-1531.
- Jamali T, Jamali Y, Mehrbod M, Mofrad MR: Nuclear pore complex: biochemistry and biophysics of nucleocytoplasmic transport in health and disease. *Int Rev Cell Mol Biol* 2011;287:233-286.
- James SG, Holmstrom C, Kjelleberg S: Purification and characterization of a novel antibacterial protein from the marine bacterium D2. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:2783-2788.
- Johnson NP, Mueller J: Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med* 2002;76:105-115.
- 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.
- Josset L, Frobert E, Rosa-Calatrava M: Influenza A replication and host nuclear compartments: many changes and many questions. *J Clin Virol* 2008;43:381-390.
- Kalarikkal SM, Jaishankar GB: Influenza Vaccine; in: *StatPearls*. Treasure Island (FL), 2018.
- Kang Y, Bogerd HP, Cullen BR: Analysis of cellular factors that mediate nuclear export of RNAs bearing the Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element. *J Virol* 2000;74:5863-5871.
- Kapon R, Naim B, Zbaida D, Nevo R, Tsabari O, Reich Z: Permeating the nuclear pore complex. *Nucleus* 2010;1:475-480.
- Kawaoka Y, Neumann G: Influenza viruses: an introduction. *Methods Mol Biol* 2012;865:1-9.
- 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.

- Kraemer D, Wozniak RW, Blobel G, Radu A: The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1519-1523.
- Krug MS, Berger SL: Ribonuclease H activities associated with viral reverse transcriptases are endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3539-3543.
- Lachish-Zalait A, Lau CK, Fichtman B, Zimmerman E, Harel A, Gaylord MR, Forbes DJ, Elbaum M: Transportin mediates nuclear entry of DNA in vertebrate systems. *Traffic* 2009;10:1414-1428.
- 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.
- Leahy MB, Dessens JT, Weber F, Kochs G, Nuttall PA: The fourth genus in the Orthomyxoviridae: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. *Virus Res* 1997;50:215-224.
- Leser GP, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. *Virology* 2005;342:215-227.
- Li Y, Junod SL, Ruba A, Kelich JM, Yang W: Nuclear export of mRNA molecules studied by SPEED microscopy. *Methods* 2019;153:46-62.
- Lim RY, Fahrenkrog B: The nuclear pore complex up close. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:342-347.
- Lin DH, Correia AR, Cai SW, Huber FM, Jette CA, Hoelz A: Structural and functional analysis of mRNA export regulation by the nuclear pore complex. *Nat Commun* 2018;9:2319.
- Lo CY, Tang YS, Shaw PC: Structure and Function of Influenza Virus Ribonucleoprotein. *Subcell Biochem* 2018;88:95-128.
- Lommer BS, Luo M: Structural plasticity in influenza virus protein NS2 (NEP). *J Biol Chem* 2002;277:7108-7117.
- Long JS, Mistry B, Haslam SM, Barclay WS: Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol* 2019;17:67-81.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Martin K, Helenius A: Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* 1991;65:232-244.

- Mascagni P, Vicenzi E, Kajaste-Rudnitski A, Pellicciotta G, Monti A, Cervi C, Vitalucci R, Toffoletto F: Assessment of efficacy and safety of pandemic A/H1N1/2009 influenza vaccine in a group of health care workers. *Med Lav* 2012;103:220-229.
- Maul GG, Deaven L: Quantitative determination of nuclear pore complexes in cycling cells with differing DNA content. *J Cell Biol* 1977;73:748-760.
- McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL: Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. *Front Microbiol* 2019;10:39.
- McDonald ND, Regmi A, Morreale DP, Borowski JD, Fidelma Boyd E: CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics* 2019;20:105.
- Mendes A, Fahrenkrog B: NUP214 in Leukemia: It's More than Transport. *Cells* 2019;8.
- Miyake Y, Keusch JJ, Decamps L, Ho-Xuan H, Iketani S, Gut H, Kutay U, Helenius A, Yamauchi Y: Influenza virus uses transportin 1 for vRNP debundling during cell entry. *Nat Microbiol* 2019.
- 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.
- Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS: The 2009 H1N1 pandemic influenza virus: what next? *MBio* 2010;1.
- Moroianu J: Nuclear import and export pathways. *J Cell Biochem* 1999;Suppl 32-33:76-83.
- Nagata K, Saito S, Okuwaki M, Kawase H, Furuya A, Kusano A, Hanai N, Okuda A, Kikuchi A: Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. *Exp Cell Res* 1998;240:274-281.
- Nakajima K: [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. *Nihon Rinsho* 2003;61:1897-1903.
- Napetschnig J, Kassube SA, Debler EW, Wong RW, Blobel G, Hoelz A: Structural and functional analysis of the interaction between the nucleoporin Nup214 and the DEAD-box helicase Ddx19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:3089-3094.
- Neumann K, Farias G, Slachevsky A, Perez P, Maccioni RB: Human platelets tau: a potential peripheral marker for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2011;25:103-109.
- Obado SO, Field MC, Rout MP: Comparative interactomics provides evidence for functional specialization of the nuclear pore complex. *Nucleus* 2017;8:340-352.

- Pasdeloup D, Blondel D, Isidro AL, Rixon FJ: Herpesvirus capsid association with the nuclear pore complex and viral DNA release involve the nucleoporin CAN/Nup214 and the capsid protein pUL25. *J Virol* 2009;83:6610-6623.
- Pienta KJ, Coffey DS: A structural analysis of the role of the nuclear matrix and DNA loops in the organization of the nucleus and chromosome. *J Cell Sci Suppl* 1984;1:123-135.
- Pirinçal A: İnfluenza Virüsü NS1 Proteini ile İlişkili Hücresel Faktörlerin Maya İkili-Hibrid Metodu ile Saptanması; in. İstanbul, Türkiye, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- 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.
- Porter FW, Brown B, Palmenberg AC: Nucleoporin phosphorylation triggered by the encephalomyocarditis virus leader protein is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J Virol* 2010;84:12538-12548.
- Rafikova ER, Melikov K, Ramos C, Dye L, Chernomordik LV: Transmembrane protein-free membranes fuse into xenopus nuclear envelope and promote assembly of functional pores. *J Biol Chem* 2009;284:29847-29859.
- Rapor-WHO: Reconsideration of influenza A virus nomenclature: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 1979;57:227-233.
- Rapor-WHO: A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 1980;58:585-591.
- Raza H, Awasthi YC, Zaim MT, Eckert RL, Mukhtar H: Glutathione S-transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression. *J Invest Dermatol* 1991;96:463-467.
- Ren L, Chang E, Makky K, Haas AL, Kaboord B, Walid Qoronfleh M: Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. *Analytical biochemistry* 2003;322:164-169.
- Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E: NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* 2009;90:1398-1407.
- Saito S, Cigdem S, Okuwaki M, Nagata K: Leukemia-Associated Nup214 Fusion Proteins Disturb the XPO1-Mediated Nuclear-Cytoplasmic Transport Pathway and Thereby the NF-kappaB Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* 2016;36:1820-1835.

- Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM: Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:1853-1858.
- Scalabrino R, Grimaldi MG: [Study on selective immunofluorescence of anti-nuclear and perinuclear factors in rheumatoid arthritis. Case contributions]. *G Mal Infett Parassit* 1968;20:134-135.
- Shapiro GI, Gurney T, Jr., Krug RM: Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J Virol* 1987;61:764-773.
- Shimizu T, Takizawa N, Watanabe K, Nagata K, Kobayashi N: Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. *FEBS Lett* 2011;585:41-46.
- Shortridge KF: The 1918 'Spanish' flu: pearls from swine? *Nat Med* 1999;5:384-385.
- Shulga N, Mosammaparast N, Wozniak R, Goldfarb DS: Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability. *J Cell Biol* 2000;149:1027-1038.
- Smith BJ, Colman PM, Von Itzstein M, Danylec B, Varghese JN: Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase. *Protein Sci* 2001;10:689-696.
- Smith DB, Johnson KS: Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 1988;67:31-40.
- Straus WL: The United States vaccine supply: challenges in preparing for an avian influenza pandemic. *Yale J Biol Med* 2005;78:255-264.
- Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K: pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA. *Elife* 2015;4.
- Sun Y, Liu M, Tian L, Guo Y, Jin D: [The experimental investigation of laryngeal cancer growth in vivo by recombinant lentivirus of small interference RNA (siRNA) targeting MMP-9]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2008;22:1129-1131.
- Takeda A, Yaseen NR: Nucleoporins and nucleocytoplasmic transport in hematologic malignancies. *Semin Cancer Biol* 2014;27:3-10.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG: Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* 2005;437:889-893.
- Tedcastle AB, Fenwick F, Ingram RE, King BJ, Robinson MJ, Toms GL: The characterization of monoclonal antibodies to human metapneumovirus and the detection of multiple forms of the virus nucleoprotein and phosphoprotein. *J Med Virol* 2012;84:1061-1070.

- Temiz G, Kasifoglu N, Kiris A, Ozturk S, Sahin G, Yalcin AU, Us T: Immune response after a single vaccination against 2009 influenza A H1N1 in hemodialysis patients. *Ren Fail* 2010;32:716-720.
- Tsai HJ, Wang SH, Inoue K, Takagi S, Kimura M, Wakamatsu Y, Ozato K: Initiation of the transgenic lacZ gene expression in medaka (*Oryzias latipes*) embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1995;4:1-9.
- Turan K, Ata P: Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. *Genet Mol Res* 2011;10:2009-2023.
- Tynell J, Melen K, Julkunen I: Mutations within the conserved NS1 nuclear export signal lead to inhibition of influenza A virus replication. *Virol J* 2014;11:128.
- Uhnöo I, Linde A, Pauksens K, Lindberg A, Eriksson M, Norrby R, Swedish Consensus G: Treatment and prevention of influenza: Swedish recommendations. *Scand J Infect Dis* 2003;35:3-11.
- Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, Morris GE, Whitfield WGF, Hutchison CJ: Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci* 2001;114:2577-2590.
- 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.
- von Moeller H, Basquin C, Conti E: The mRNA export protein DBP5 binds RNA and the cytoplasmic nucleoporin NUP214 in a mutually exclusive manner. *Nat Struct Mol Biol* 2009;16:247-254.
- Wang Y, Xiao H, Wu N, Shi H, Xu H, Zhou L, Xi XG, Wang T, Wang X: Characterization of the antiviral activity for influenza viruses M1 zinc finger peptides. *Curr Microbiol* 2011;62:126-132.
- Waugh DS: An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif* 2011;80:283-293.
- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y: Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 1992;56:152-179.
- Wohlgemuth N, Lane AP, Pekosz A: Influenza A Virus M2 Protein Apical Targeting Is Required for Efficient Virus Replication. *J Virol* 2018;92.
- Xu D, Farmer A, Chook YM: Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2010;20:782-790.

- Yan D, Weisshaar M, Lamb K, Chung HK, Lin MZ, Plemper RK: Replication-Competent Influenza Virus and Respiratory Syncytial Virus Luciferase Reporter Strains Engineered for Co-Infections Identify Antiviral Compounds in Combination Screens. *Biochemistry* 2015;54:5589-5604.
- Yi S, Chen Y, Wen L, Yang L, Cui G: Downregulation of nucleoporin 88 and 214 induced by oridonin may protect OCIM2 acute erythroleukemia cells from apoptosis through regulation of nucleocytoplasmic transport of NF-kappaB. *Int J Mol Med* 2012;30:877-883.
- Yoneda Y, Hieda M, Nagoshi E, Miyamoto Y: Nucleocytoplasmic protein transport and recycling of Ran. *Cell Struct Funct* 1999;24:425-433.
- Zheng W, Tao YJ: Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Lett* 2013;587:1206-1214.
- Zolotukhin AS, Felber BK: Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* 1999;73:120-127.
- Zykov MP: [Modern protection from influenza]. *Feldsher Akush* 1982;47:6-10.

8. EKLER

Katıldığı Kongreler

Şenbaş B., Pirincal A., Turan K, “Investigation of The Relationship Between İnfluenza A Virus Nuclear Export Protein and Cellular Nuclear Pore Complex Related Proteins”, IVEK 3rd International Convention of Pharmaceuticals and Pharmacies, S-016, p.121, 26-29 Nisan, İstanbul, Turkey, 2017.



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Burçak	Soyadı	Şenbaş
Doğum Yeri	İstanbul / Bakırköy	Doğum Tarihi	09.12.1990
Uyruğu	T.C.	Tel	507 361 24 81
E-mail	burcaksenbas@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Biyokimya (ECZ)	2019
Lisans	İstanbul Üniversitesi-Fen Fakültesi-Biyoloji	2013
Lisans	İstanbul Üniversitesi-Fen Fakültesi-Moleküler Biyoloji ve Genetik (Yandal Programı)	2014
Lise	Gazi Anadolu Lisesi	2009

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Stajyer	Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi (Biyokimya-Mikrobiyoloji Laboratuvarı)	2011-2011 (sömestr stajı)
Stajyer	Deneyisel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	2012-2012 (yaz stajı)
ArGe Uzman Yardımcısı	ACTV Biyoteknoloji	2017-2017 (6Ay)

Yabancı Dilleri	OkuduğunuAnlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi

YabancıDilSınavNotu								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
63								

	Sayısal	EşitAğırlık	Sözel
ALES Puanı	68,554	69,008	65,289

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanmabecerisi
MC Office Programları	Çok İyi

*Çokiyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.