



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tıbbi Mikrobiyoloji

[Doktora Tezi]

**GBP2 VE GBP5 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN
COVID-19 PROGNOZUNA ETKİSİ**

Abdullah Yücel BABA
ORCID: 0000-0003-4856-8773

Danışman
Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU
ORCID: 0000-0002-0991-2132

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü
(BAP) tarafından 221418007 numaralı proje ile desteklenmiştir.
Konya -2024



TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesi ve hazırlanmasının her aşamasında desteğini gördüğüm ve her türlü yardımını esirgemeyen her daim örnek alacağım değerli hocam Prof. Dr. Bahadır Feyzioğlu'na;

Doktora boyunca desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım başta Prof. Dr. Mehmet Özdemir olmak üzere Prof. Dr. Metin Doğan, Doç. Dr. Fatma Esenkaya Taşbent ve Dr. Öğr. Üyesi Selin Uğraklı 'ya,

Bu süreç boyunca bir arada olduğumuz, çalışmalarım da emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından değerli çalışanlarına;

Ayrıca üzerimde emeği olan değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Zeki Şengil'e,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan rahmetli babama ve kıymetli anneme;

Her zaman yanımda olan, manevi desteklerini ve sevgilerini hep hissettiğim sevgili eşime, kıymetli oğlum ve kızıma,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Abdullah Yücel BABA

Mart 2024

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TEZ ONAY SAYFASI.....	vi
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	vii
BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koronavirüslerin Tarihçesi.....	3
2.2. Virolojik Özellikleri	5
2.2.1. Sınıflandırma	5
2.2.2. SARS-CoV-2'nin morfolojisi	6
2.3. COVID-19 Patogenezi	11
2.3.1. Konak hücreye giriş	11
2.3.2 Viral yaşam döngüsü	12
2.4. Konak İmmün Yanıt.....	13
2.4.1. Doğal immün yanıt.....	13
2.4.2. Adaptif immün yanıt	14
2.5. COVID-19 Klinik Bulguları.....	15
2.6. COVID-19'un Prognozu	17
2.7. COVID-19 laboratuvar tanı yöntemleri	18
2.7.1. Moleküler Yöntemler	19
2.7.2. Serolojik yöntemler	23
2.8.1. GBP yapısı ve hücrel lokalizasyon	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1. GEREÇ	31
3.1.1. Hasta seçimi	31
3.1.2. Araç ve gereçler	31
3.2. YÖNTEM.....	32
3.2.1. RNA İzolasyonu	32
3.2.2. cDNA eldesi	32
3.3.3 Gen ekspresyonunun belirlenmesi	33
3.3.4 Verilerin analizi.....	35

4.BULGULAR	37
4.1. GBP2 Bulguları	37
4.2. GBP5 Bulguları	38
5.TARTIŞMA	41
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
6.1. Sonuç	45
6.2. Öneriler.....	45
7. KAYNAKLAR	47
8. EKLER	53
8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı	53



TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **ABDULLAH YÜCEL BABA**'nın "**GBP2 ve GBP5 Gen Ekspresyon Düzeylerinin COVID-19 Prognozuna Etkisi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA / 29.03.2024

Tez Danışmanı Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Jüri Üyesi Prof. Dr. Mahmut BAYKAN
Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi

Jüri Üyesi Prof. Dr. Muhammed Güzel KURTOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

Jüri Üyesi Doç Dr. İbrahim ERAYMAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03/04/2024 tarih ve 07/09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

GBP2 ve GBP5 Gen Ekspresyon Düzeylerinin COVID-19 Prognozuna Etkisi başlıklı tez çalışmamın toplam sayfalık kısmına ilişkin, 04.03.2024 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı **%8** olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

04.03.2024

Öğrenci Abdullah Yücel BABA

Danışman Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

Tarih:04.03.2024

Abdullah Yücel BABA

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C:	Santigrat derece
ACE2:	Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2
Ag-RDTs:	Hızlı antijen tanı testleri
APN:	Aminopeptidaz-N
ARDS:	Akut solunum sıkıntısı sendromu
ASYE:	Alt solunum yolu enfeksiyonu
CatB/L:	Endozomal katepsin B/L
CLIA:	Kemilüminesans immünolojik analizler
CoV:	Koronavirüs
COVID-19:	Yeni koronavirüs hastalığı-19
CRISPR:	Clustered regularly interspaced palindromic repeats
CSFV:	Klasik domuz ateşi virüsü
CTD:	C-terminal hidrofobik alan
DENV:	Dang virüsü
DPP-4:	Dipeptidil Peptidaz 4
DSÖ:	Dünya sağlık örgütü
EBLV-1:	Enzootik bovine löykoz virus
EIA:	Enzim immünolojik testi
EMCV:	Ensefalomiyokardit virüsü
ERGIC:	Endoplazmik retikulumdaki bir ara bölmesine
Env:	Zarf glikoprotein
ER:	Endoplazmik retikulum
FiO ₂ :	Alınan havanın oksijen yüzdesi
FMDV:	Şap hastalığı virüsü
GBP:	Guanilat bağlayıcı protein
GED:	C-Terminal Gtpaz Efektör Alanı

HCOV:	İnsan koronavirüs
HCV:	Hepatit C virüsü
HEV:	Hepatit E virüsü
HIV:	İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü
HSV-1:	Herpes simpleks virüsü
IAV:	İnfluenza A virüsü
ICTV:	Uluslararası virüs taksonomi çalışma gurubu
IFN:	İnterferon
IFN- β :	İnterferon beta
IFNAR:	İnterferon Reseptörü
IgA:	İmmünoglobulin A
IgG:	İmmünoglobulin G
IgM:	İmmünoglobulin M
IL:	İnterlökin
ISG:	İnterferonla uyarılan gen
PRR:	Kalıp tanıma reseptörleri
kDa:	Kilodalton
KSHV:	Kaposi sarkomu ile ilişkili Herpes virüsü
MERS-CoV:	Orta Doğu solunum sendromu koronavirüsü
mL:	Mililitre
MNV:	Murine norovirus
NAAT:	Nükleik asit amplifikasyon testi
NF-kB:	Nükleer faktör kB
NGS:	Yeni nesil gen dizilimi
NSP:	Yapısal olmayan proteinler
NTD:	N-terminal alanına
ORF:	Open reading frames E

PaO ₂ :	Arteryel Oksijen Basıncı
pDCs:	Plazmasitoid dendritik hücreler
PHB:	Prohibitin
PRRSV:	Domuz üreme ve solunum sendromu virüsü
qRT-PCR:	Kantitatif revers-transkriptaz PCR
RABV:	Rabies Virus
RBD:	Reseptör bağlanma alanını
RBM:	Reseptör bağlanma motifine
RGIC:	Endoplazmik retikulum-golgi ara bölme
RLR:	RIG-I benzeri reseptörler
RNP:	Ribonükleoprotein
rpm:	Dönme hızı
RSV:	Respiratuar sinsityal virüs
RT-LAMP:	Ters transkripsiyon döngü-aracılı izotermal amplifikasyon
RT-RPA:	Rekombinaz polimeraz amplifikasyonu
RTC:	Replikasyon transkripsiyon kompleksi
SARS:	Şiddetli akut solunum sendromu
SARS-CoV-2:	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs-2
sn:	Saniye
SpO ₂ :	Kan oksijen satürasyonu
TGF-b:	Dönüştürücü büyüme faktörü-b'nin ()
TLR7:	Toll Benzeri Reseptör 7
TMPRSS2/4:	Trans membran proteaz serin 2/4
TNF:	Tümör nekroz faktörü
USS:	Ultra saf su
VSV:	Vesiküler stomatitis virus
µL:	Mikrolitre

TABLULAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Beta Koronavirüslerin neden olduğu pandemiler, etkenleri ve kaynakları	6
Tablo 2.2. Yapısal olmayan proteinler (nsp) işlevleri	10
Tablo 2.3. SARS-CoV-2 tespiti veya COVID-19'un tanımlanması için kullanılan Laboratuvar tanı yöntemleri(Safiabadi Tali vd., 2021)	19
Tablo 2.4. Virüs enfeksiyonlarında GBP'lerin rolü(Chhabra & Kalia, 2023).....	27
Tablo 3.1. OneScript Plus cDNA sentez kit bileşenleri	33
Tablo 3.2. GBP2 ve GBP5 proteinlerinin gen ekspresyon düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri	33
Tablo 3.3. GBP2 ve GBP5 geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizileri.....	33
Tablo 3.4. GBP2 ve GBP5 genlerine ait primerlerin özellikleri	34
Tablo 3.5. GBP2 ekspresyon düzeyinin ölçüldüğü qRT-PCR koşulları	34
Tablo 3.6. GBP5 ifade düzeyinin ölçüldüğü qRT-PCR ayarları.....	34
Tablo 4.1. Referans gen GAPDH'ye göre GBP2 geninin ekspresyonundaki kat değişimi.....	37
Tablo 4.2. Referans gen GAPDH'ye göre GBP5 geninin ekspresyonundaki kat değişimi.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. İnsan koronavirüslerinin (HCoV'ler) filogenetik ağacı(Singh & Yi, 2021).....	5
Şekil 2.2. SARS-CoV-2 genomu (Singh & Yi, 2021)	7
Şekil 2.3. SARS-CoV-2 genomik organizasyonu. (Redondo et al., 2021)	9
Şekil 2.4. SARS-CoV-2'nin S protein aracılığıyla konak hücreye bağlanması ve füzyon(Lamers & Haagmans, 2022)	11
Şekil 2.5. SARS-CoV-2 virüsü ve yaşam döngüsü(V'kovski vd., 2021)	13
Şekil 2.6. SARS-CoV-2 Bulaşma Yolları(Harrison vd., 2020)	16
Şekil 2.7. COVID-19'un moleküler ve serolojik tespit yöntemlerinin özeti(Dhamad & Abdal Rhida, 2020).	18
Şekil 2.8. RT-PCR analizi(Safiabadi Tali vd., 2021)	20
Şekil 2.9. Viral RNA tespiti için CRISPR-Cas teknolojisinin çalışma prensibi (Safiabadi Tali vd., 2021).....	21
Şekil 2.10. SARS-CoV-2'nin tanımlanması için dizileme teknikleri. (A) Sanger dizilimi. (B) Sentez yoluyla yeni nesil sıralama (NGS). (C) Nanopor dizilimi(Safiabadi Tali vd., 2021)...	22
Şekil 2.11. GBP Yapısı ve Hücresel Lokalizasyon.....	25
Şekil 2.12. GBP'lerin GTPaz aktivitesine bağlı antiviral rolleri	29
Şekil 4.1. GBP2 ekspresyon düzeyinin farklı prognoz gruplarındaki dağılımı	38
Şekil 4.2. GBP5 ekspresyon düzeyinin farklı prognoz gruplarındaki dağılımı	39

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı
Tıbbi Mikrobiyoloji
[Doktora Tezi]

GBP2 VE GBP5 GEN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN COVID-19 PROGNOZUNA ETKİSİ

Abdullah Yücel BABA

Konya-2024

Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan ve günümüze kadar geçen sürede tüm dünyayı etkileyen COVID-19, halk sağlığına karşı oluşturduğu tehdide ek olarak küresel ölçekte sosyoekonomik pek çok soruna yol açtı. Hızla yayılan salgın milyonlarca kişinin ölümüne neden oldu. Bu anlamda salgının epidemiyolojisinin, enfeksiyonun patojenezinin ve viral etkenin özelliklerinin araştırılması ve etkin mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi, ilk günden bu yana tüm dünyanın en önemli gündemini oluşturmaktadır. COVID-19 patojenezi konakçı hücreye giriş, replikasyon, invazyon, doğal-edinsel bağışık yanıt ve buna bağlı gelişen enflamasyon süreciyle şekillenmektedir. Bağışık yanıt ve enflamasyon tablosu patojenez sürecindeki en önemli unsurlardır. Bu bağlamda bu tez kapsamında, viral enfeksiyonların patojenezinde moleküler düzeyde biyokimyasal sinyalizasyonda etkin rol oynadığı bilinen guanilat bağlayıcı proteinlerin (GBP) COVID-19 patojenezindeki muhtemel rolünün araştırılması hedeflenmiştir.

Bu hedef çerçevesinde COVID-19 klinik sınıfı hafif-orta-şiddetli-kritik olan hastalarda GBP2 ve GBP5 proteinlerinin gen ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Çalışmamıza 18-80 yaş aralığında 150 COVID-19 tanısı alan hasta ile benzer yaş aralığında ve benzer ko-morbid hastalıklara sahip 50 kontrol grubu hasta dahil edilmiştir. COVID-19 tanısı alan ve farklı klinik seyir gösteren hasta gruplarının kendi aralarında ve kontrol grubu ile GBP2 ve GBP5 ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle araştırılarak kıyaslanmıştır.

Elde edilen verilere göre COVID-19 tanılı farklı prognoz sergileyen hastalarda hastalığın şiddetine bağlı olarak GBP2 geninin ekspresyon düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. Bu bağlamda GBP2'nin ekspresyon düzeylerinin patogeneze rol oynadığı tahmin edilmektedir. Diğer taraftan GBP5 ekspresyon düzeyinde, kritik hasta grubundaki ılımlı artış dışında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, GBP2'nin COVID-19'un seyrinde belirleyici bir rol aldığını düşündürmektedir. Bu durumun COVID-19'un teşhisi ve tedavisinde GBP2 odaklı yeni yöntemlerin ve farklı klinik yaklaşımların geliştirilmesine yardımcı olabileceğini öngörmekteyiz. İlgili proteinlerin COVID-19'un patogeneze rolünü tam olarak anlamak ve terapötik müdahale hedefleri olarak potansiyellerini keşfetmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Covid-19, Gen ekspresyonu, Guanilat bağlayıcı proteinler (GBP), Prognoz.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Microbiology
Medical Microbiology
[Doctoral Thesis]

THE EFFECT OF GBP2 AND GBP5 GENE EXPRESSION LEVELS ON COVID-19 PROGNOSIS

Abdullah Yücel BABA

Konya-2024

COVID-19, originating in Wuhan, China in December 2019, has led to several worldwide socioeconomic issues in addition to its public health hazard. The disease spread quickly and resulted in the deaths of millions of people. Since the beginning, the global focus has been on studying the epidemiology, pathophysiology, features of the virus, and developing effective strategies to control the pandemic. The pathophysiology of COVID-19 is influenced by its entrance into the host cell, replication, invasion, the innate immune response, and subsequent inflammation. Immune response and inflammation are crucial components in the pathogenesis process. This thesis intends to explore the potential involvement of guanylate-binding proteins (GBP) in the pathogenesis of COVID-19, given their established significance in biochemical signalling at the molecular level in viral infections.

The gene expression levels of GBP2 and GBP5 proteins were analysed in patients across different clinical classifications of COVID-19 severity. The trial comprised 200 COVID-19 patients aged 18 to 80 and 50 control group patients with comparable age range and comorbidities. Levels of GBP2 and GBP5 expression in patient groups with varying clinical courses of COVID-19 were compared to one other and to a control group using the qRT-PCR technique. The results show a substantial drop in GBP2 gene COVID-19 levels in COVID-19 patients with varying prognoses, based on illness severity. GBP2 expression levels are expected to influence the pathogenesis process in this setting. However, there was no significant variation in GBP5 expression level between the groups, except for a little rise in the severely sick patient group.

Our study data indicates that GBP2 is involved in the progression of COVID-19. This is expected to help therapeutic strategies, such as creating new GBP2-focused techniques for diagnosing and treating COVID-19. Additional study is required to comprehensively grasp the function of certain proteins in COVID-19 development and investigate their potential as targets for therapeutic intervention.

Keywords: Covid-19, Gene expression, Guanylate binding proteins (GBP), Prognosis,



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Aralık 2019 da Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan kentinde insanları etkileyen yeni bir solunum yolu hastalığı salgını rapor edildi. Hastalık, salgının başlangıcından itibaren her yaş grubundaki insanı etkiledi. Hızla yayılan hastalık Şubat 2020'de SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. Daha sonra hastalık DSÖ tarafından bu etken COVID-19 olarak tanımlandı. Hastalık dünya çapında hızla yayıldı ve milyonlarca insanın ölümüne yol açtı(Ravi vd., 2022).

COVID-19'in patogenezi, virüsün konak hücreye girişi ve viral replikasyon, hücresel istila, doğal immün yanıt, inflamasyon ve edinsel immün yanıt olmak üzere bir dizi karmaşık süreci içermektedir. COVID-19 patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte ortaya çıkan patolojik cevaplar değerlendirildiğinde sistemin rolü her geçen gün daha iyi anlaşılmaktadır(Lamers & Haagmans, 2022).

İmmun sistemin virüslere karşı birincil ve güçlü basamağını doğal bağışıklık oluşturmaktadır. SARS-CoV-2 gibi zoonotik virüslerin bulaşma sonrası başarılı bir replikasyon süreci geçirebilmesi için konağa hızlı bir şekilde uyum sağlaması ve konağın doğuştan gelen bağışıklık savunmalarından kaçabilmesi gerekir(Merad vd., 2022). Genelde insan hücrelerinin bir virüs tarafından enfekte olmasını takiben, etki edecekleri hücreye bağlanmada aynı reseptörü kullanan tip-1 ve tip-2 interferon sentezi gerçekleşir. Bu interferonlar özgül reseptörlerine bağlandıkları hücrede antiviral bir ortam meydana getirir(Lee vd., 2022). SARS-CoV-2 ve diğer viral patojenler konakçı hücrelerde doğal bağışıklık elemanı olan IFN ile uyarılan genleri (ISG'ler) yukarı-regüle eder ve IFN'lerin üretimini tetikler. Bu genlerin ürünleri çok sayıda bağışıklık işlevi görür ve viral replikasyon döngüsünün her adımını hedefleyebilir. ISG'ler arasında yer alan guanilat bağlayıcı proteinler (GBP), ISG'ler ve guanozin trifosfatazların (GTPazlar) bir alt ailesidir. İnsan genomu, bu protein ailesinin yedi üyesini (GBP1–7) kodlar. GBP'ler interferon tip 1 ve 2 tarafından ve SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında düzenlenir. Dolayısıyla GBP proteinleri, replikasyon sırasında enfeksiyöz virüs üretimini sınırlamak için hareket edebilen antiviral doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin önemli unsurlarıdır(D. Mesner vd., 2023).

Covid-19 hastalığının seyri, bireysel farklılıklar ve değişken bağışık yanıtlar dikkate alındığında; GBP'lerin bu hastalığa yakalanan bireylerdeki hastalığın patogenezi ve prognozu üzerinde kritik belirleyici faktör olma potansiyeli yüksek olduğu ifade edilmektedir(Ulinici vd., 2021). Yapılan çalışmalarda viral enfeksiyonların GBP'lerin ekspresyonunu artırıcı etki

gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda GBP'lerin, inflamatuvar aktivasyonu düzenleyici rolü olduğu ortaya konmuştur(Kutsch & Coers, 2021). Mevcut çalışmalardan elde edilen bulgular, GBP'lerin artan ekspresyonunun, GTP hidrolizine yol açtığını göstermektedir; dolayısıyla virüs replikasyonu inhibe edilmiş olur. Bu durumun çeşitli virüslerin replikasyonunu engellediğini görülmektedir. Ayrıca bu inhibitör etki, viral nükleik asit sentezinin ve viral protein translasyonunun baskılanmasına bağlanabilir. Araştırmaların sonuçları, GBP'lerin viral enfeksiyonlara karşı konakçı savunma mekanizmasındaki potansiyelini vurgulamaktadır (Zhao vd., 2023). Literatürde GBP'ler ile ilgili farklı klinik çalışmalar mevcut olmasına rağmen GBP'lerin COVID-19 prognozu üzerine etkisi ile ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, COVID-19 klinik olarak hafif-orta-şiddetli-kritik prognoz sergileyen hastalarda, Interferonla indüklenebilen kısıtlama faktörleri olan GBP2 ve 5'in gen ekspresyon düzeylerine bakılacaktır. Çalışmamıza 18-80 yaş aralığında 150 COVID-19 tanısı alan hasta ile benzer yaş aralığında ve benzer ko-morbid hastalıklara sahip 50 kontrol grubu COVID-19 olmayan hasta dahil edilecektir. COVID-19 tanılı hastaların klinik semptom ve bulguları oluşturulan standart kriterler baz alınarak hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak sınıflandırılacak ve bu sınıflar arasında GBP2 ve GBP5 ekspresyon düzeyleri tanımlanarak birbirleri ve kontrol grubu ile kıyaslanacaktır. Hasta ve kontrol grubundan alınan numuneler Real-time PCR yöntemi ile çalışılarak elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak ortaya konulacaktır.

Bu bağlam da çalışmamız ile GBP2 ve 5'in gen ekspresyon düzeylerindeki değişimin COVID-19'un seyrindeki potansiyel etkilerinin ortaya konmasının, hastalığın teşhisi ve terapötik stratejileri için yeni yöntemlerin geliştirilmesi gibi klinik yaklaşımlara yardımcı olabileceğini düşünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Koronavirüslerin Tarihçesi

Adını elektron mikroskobu altında bakıldığında yüzeylelerinden çıkan taç benzeri sivri uçlardan alan koronavirüs, keşfedildiği dönemde hayvanları enfekte eden bir virüs olarak biliniyordu(Ezzikouri vd., 2020). Koronavirüs ilk kez 1937'de, tavuklarda solunum yolu enfeksiyonuna neden olan bir patojen olarak Beaudette ve Hudson tarafından tanımlandı(Fabricant, 1998). O tarihlerde henüz keşfedilmemiş pek çok koronavirüsün genelde hayvanlarda enfeksiyona neden olduğu, yalnızca birkaç türün insanlara da bulaşabildiği belirlenmişti. İnsanlarda koronavirüs enfeksiyona neden olarak tanımlanan ilk vaka 1965 yılında Tyrrell ve Bynoe tarafından tespit edildi. Tespit edilen bu ilk insan koronavirüsü (HCoV), B814 olarak tanımlandı(Smith vd., 2009). Bunun ardından, 1966'da Hamre ve Procknow tarafından "HCoV-229E" ve 1967 yılında ise McIntosh ve ark. tarafından "HCoV-OC43" adını verdikleri yeni bir HCoV'lar tanımlandı. (Berry vd., 2015). Bununla birlikte, Büyük halk sağlığı problemleri oluşturacak olan SARS-CoV'nin ortaya çıkmasına kadar görülen HCoV vakaları, kısıtlı araştırma koşullardan dolayı, daha çok HCoV-229E ve HCoV-OC43 ile sınırlı kaldı(McIntosh, 2005).

Halk sağlığını tehdit eder boyutta olan ilk insan koronavirüsü olan SARS-CoV, 2002 yılında Çin'in Guangdong eyaletinde ortaya çıktı(Ksiazek vd., 2003). Haziran 2003 itibarıyla dünya çapında toplam 8.422 SARS-CoV vakası ve buna bağlı 916 ölüm rapor edildi. Buna karşın 2003 yılı sonuna kadar kontrol tedbirleri sayesinde virüsün insanlar arasındaki yayılımı kontrol altına alındı. SARS-CoV salgınıyla birlikte, daha önce hafif üst solunum yolu enfeksiyonlarına (ÜSYE) neden olduğu bilinen koronavirüsler önemli bir küresel halk sağlığı sorunu haline geldi(Surjit vd., 2005).

SARS-CoV epidemisinden 10 yıl sonra, 2012'de, Suudi Arabistan'da Orta Doğu solunum sendromu MERS-CoV adlı oldukça patojenik başka bir CoV ortaya çıktı(de Groot vd., 2013). Ateş, öksürük ve boğaz ağrısı gibi hafif semptomlarla başlayan vakaların %20 sinden fazlası akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), çoklu organ yetmezliği ve ölüme kadar ilerlemekteydi.(Cui vd., 2019). 2012 ile 2021 yılları arasında 27 farklı ülkeden en az 886 ölüm ve 2.574 laboratuvarca doğrulanmış MERS-CoV enfeksiyonu vakası bildirildi(WHO, 2021a). Mevcut veriler, hastalıktan etkilenen bölgelerin yaygınlığı, görülen vaka sayılarındaki yükseklik ve meydana gelen ölümlerden dolayı, MERS-CoV'un küresel salgın potansiyeli taşıdığını göstermektedir(Al-Osail & Al-Wazzah, 2017).

MERS-CoV'un etkileri devam ederken, Aralık 2019 da Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan kentinde insanları etkileyen yeni bir solunum yolu hastalığı salgını rapor edildi. Bu hastalığın klinik olarak insanlarda ateş, öksürük ve solunum sıkıntısı gibi SARS ve MERS ile benzer semptomlar gösterdiği rapor edildi. Hastalığın neden olduğu Kritik vakalar arasında mekanik ventilasyona ihtiyaç duyan akut pnömonili kişilerin yaygın olması dikkat çekiciydi(Shahrajabian vd., 2021).

Salgının duyurulmasından birkaç gün sonra, bilim insanları moleküler analiz yoluyla geçici olarak hastalığa neden olan etkenin yeni bir betakoronavirüs olduğunu tespit etti(Yao vd., 2020). Dünya sağlık örgütü (DSÖ) tarafından 2019-nCoV olarak adlandırılan bu hastalık, Uluslararası virüs taksonomi çalışma gurubu (ICTV) tarafından, SARS-CoV ve MERS-CoV ile gösterdiği genom yapısının benzerlik göstermesinden dolayı, Şubat 2020'de SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. Aynı tarihte bu etken DSÖ tarafından COVID-19 olarak tanımlandı(WHO, 2021b).

COVID-19, salgının başlangıcından itibaren her yaş grubundaki insanı etkiledi. Hastalık solunum yoluyla veya enfekte damlacıklarla temas yoluyla yayılıyordu. Bazı kişilerde semptom görülme de hastalığı geçiren bireylerin çoğunda hafif ila orta derecede semptomlar görülmekteydi. Altta yatan hastalığı olan 60 yaş üstü bireylerde ölüm riski oluştu. COVID-19 salgını Dünya çapında hızla yayıldı ve zamanla ölüm oranları arttı. DSÖ, salgını Ocak 2020'nin sonuna gelindiğinde uluslararası önemli halk sağlığı acil durumu, Şubat 2020 de ise Pandemi olarak ilan etti(Glatte & Finkelman, 2021).

Tanımlanmasından günümüze kadar geçen süreçte hızla yayılmaya devam eden COVID-19 salgınında Ağustos 2021'de 216 ülkede 198 milyondan fazla vaka ve 4,2 milyon ölüm bildirildi. DSÖ verilerine göre, Ocak 2024 sonu itibariyle 242 ülkede yaklaşık 774 milyon vaka ve 7 milyon ölüm kaydedildi(WHO, 2021c).

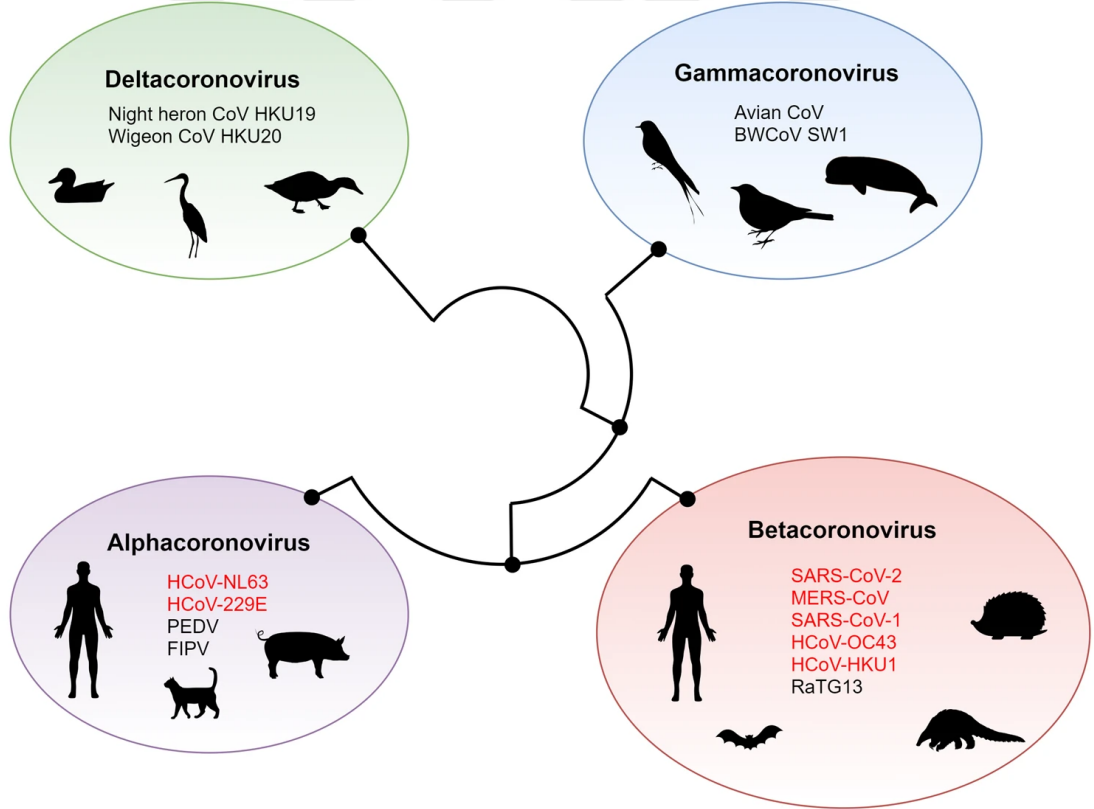
Bu dramatik veriler, insan koronavirüslerinin değişim süreci ve küresel etkisi hakkında fikir vermekte ve bu virüslerin kökenlerini, bulaş dinamiklerini ve epidemik-pandemik hale gelme potansiyellerini anlamının önemini vurgulamaktadır. Tüm dünyada devam eden araştırmalarla bu virüslerin karmaşıklığını daha iyi anlamak için çaba gösterilirken, gelecekte ortaya çıkabilecek ve önemli halk sağlığı tehditleri oluşturabilecek muhtemel salgınlara karşı uyanık ve hazırlıklı olmak kritik önem taşımaktadır(W. Khan, Ahmad, vd., 2023).

2.2. Virolojik Özellikleri

2.2.1. Sınıflandırma

Koronavirüsler (CoV'ler), Nidovirales takımı içinde Coronaviridae ailesinin bir parçası olan Orthocoronavirinae alt ailesine aittir. Bu alt aile, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'ne (ICTV) göre Alfa, Beta, Delta ve Gama koronavirüsler olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır(Ezzikouri vd., 2020).

Alfakoronavirüs ve betakoronavirüs cinsleri yalnızca memelileri enfekte ederken gamakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler genellikle kuşları enfekte eder. Ek olarak gama ve deltakoronavirüsler memelileri de enfekte edebilir(Cui vd., 2019). Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler içerisinde yer alan altı CoV'un ise insanlarda hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Bu virüslerden HCoV 229E ve NL63 türleri Alphacoronavirus cinsine; HCoV OC43, HKU1, SARS-CoV ve MERS-CoV türleri Betacoronavirus cinsine aittir(V'kovski vd., 2021). (Şekil 2.1) (Singh & Yi, 2021)



Şekil 2.1. İnsan koronavirüslerinin (HCoV'ler) filogenetik ağacı(Singh & Yi, 2021)

Mevcut araştırma verilerine göre, tüm insan koronavirüslerinin hayvan kaynaklı olduğu bilinmektedir. Bunlardan yarasaya kaynaklı olan insan koronavirüs türleri SARS-CoV, HCoV-229E, HCoV-NL63, MERS-CoV ve HCoV-OC43 iken, kemirgen kaynaklı olanların ise muhtemelen HKU1 ve HCoV-OC43 olduğu kabul edilmektedir(Huang vd., 2013).

İnsanlarda hastalıklara neden olan koronavirüsler arasında dört insan koronavirüsü (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 ve HKU1) endemik hastalıklarla ilişkilendirilirken SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV pandemilere neden olma potansiyeline sahiptir. Bunlara ek olarak, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HKU1 virüs türleri bağışıklık sistemi güçlü bireylerde hafif üst solunum yolu hastalıklarına neden olurken, bebeklerde, küçük çocuklarda ve yaşlı bireylerde ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Buna karşılık SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV oldukça patojenik bir etki göstererek insanlarda şiddetli solunum sendromuna neden olur(Forni vd., 2017). (Tablo 2.1) (Feyzioğlu B, Baba AY., 2021)

Tablo 2.1. Beta Koronavirüslerin neden olduğu pandemiler, etkenleri ve kaynakları

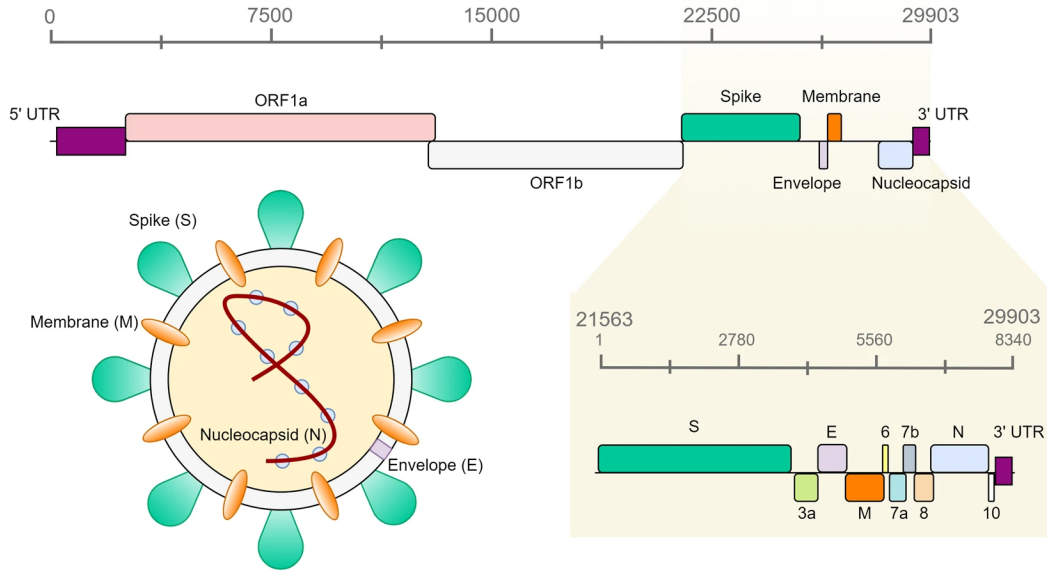
Pandemi	Yıl	Etken	Virüsün kaynağı
SARS	2002–2003	SARS-CoV	Palmye Misk Kedisi
MERS	2012–2021	MERS-CoV	Deve
COVID-19	2019–2023	SARS-CoV-2	Yarasaya, Pangolin*

*Muhtemel rezervuar, ikincil kaynak ya da kaynaklar henüz bilinmiyor

2.2.2. SARS-CoV-2'nin morfolojisi

SARS-CoV-2, çapı 80 ila 220 nm arasında değişen, zarflı, pozitif polariteli, tek sarmallı RNA'ya sahip virüslerdir. Dolayısıyla SARS-CoV-2 de diğer koronavirüsler gibi yaklaşık 30 kb'lik bir genomu sahiptir (Şekil 2.2).

SARS-CoV-2 genomu, Spike proteini (S), Zarf proteini (E), Membran proteini (M) ve Nükleokapsid proteini(N) olmak üzere dört yapısal protein kodlamaktadır. Ayrıca SARS-CoV-2 genomunda 16'sı yapısal olmayan ve 9'u aksesuar protein dahil olmak üzere 29 proteini kodlar(Bai vd., 2022).



Şekil 2.2. SARS-CoV-2 genomu (Singh & Yi, 2021)

Yapısal proteinler

SARS-CoV-2'nin yapısal proteinleri S (spike), M (membrane), E (envelope) ve N (nucleocapsid) proteinlerinden oluşur.

S (spike) Proteini, virüsün konak hücre füzyonuna aracılık etmede ve spesifik reseptörleri tanıyıp bunlara bağlanmada çok önemli bir rol oynar. Bu süreçler, virüsün bir enfeksiyon başlatması için gereklidir. S1 ve S2 alt alanlarından oluşan S proteini bir ektodomain bölgesine sahiptir. S1, konak hücre reseptörlerine bağlanırken S2 alt birimi, virüsün konak hücre ile membran füzyonunu kolaylaştırır (Walls vd., 2020). Bununla birlikte, S proteini enfekte edilecek konak hücreleri ve belirli organları seçmenin yanı sıra antikor aracılı bağışıklığı tetiklemede kritik bir role sahiptir. Bu nedenle S proteini, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı tedavi ve bağışıklık oluşturmak için gerekli olan viral biyogenez aşamaları, antiviral tedavilerin ve aşıların geliştirilmesinde ana hedef noktasıdır(L. Wang & Xiang, 2020).

M (membrane) proteini, yapısal olarak bir merkez hidrofilik alan, bir N-terminal hidrofobik alan ve bir C-terminal hidrofobik alan (CTD) ile karakterizedir. Bu yapılar, M proteininin zarf içinde farklı fonksiyonları yerine getirmesine olanak tanır(Cao vd., 2022). M proteini nükleokapsid dahil olmak üzere diğer yapısal proteinlerle birleşerek virüs zarfının karakteristik şeklini oluşturur(Collins vd., 2021). M proteini çoğalmada görev alır. Ayrıca bazı araştırmalarda interferon betanın (IFN- β) aktivasyonunu tetiklediği ve enfekte hücrede apoptoz sürecini başlattığı da gösterilmiştir(Collins vd., 2021; Neuman vd., 2011).Ek olarak başka bir araştırma ise M proteininin virüsün hücrelere girmesine yardımcı olduğunu ve antikor

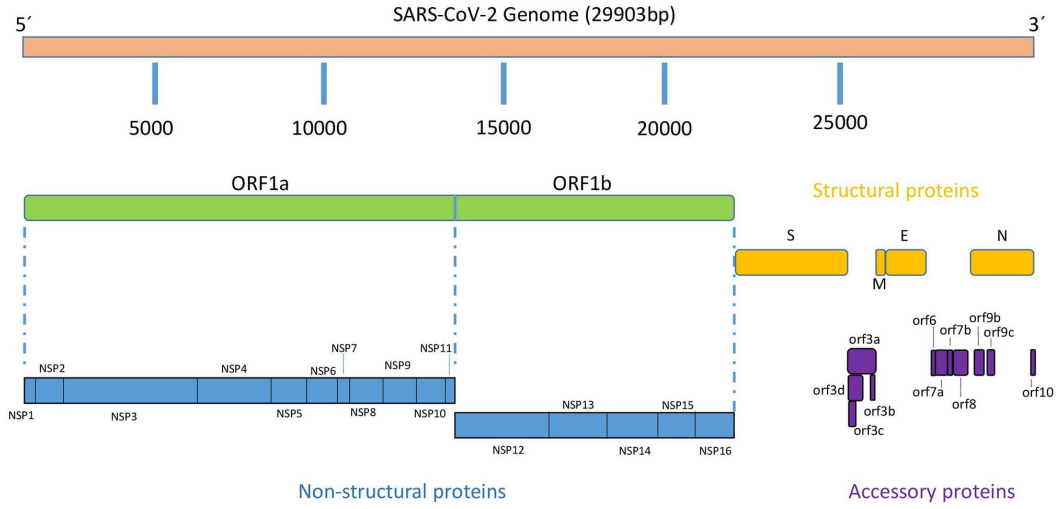
oluşumunu önlediğini ortaya koymuştur. Bu nedenle M proteini viral patogenezdaki önemi nedeniyle olası bir terapötik hedef olarak önerilmiştir(Mohsen vd., 2020).

E (envolve) proteini, virüsün dış kapsidini oluşturan 8,4 kDa büyüklüğünde küçük bir polipeptittir(Chai vd., 2021). E proteini SARS CoV-2 patogenezinde, virüslerin tomurcuklanması, toplanması, olgunlaşması süreçlerinde görev alır. Bununla birlikte, viroporin adı verilen bir iyon kanalı oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu özelliğin virüsün bağışıklık sistemiyle etkileşimini modüle etmeye yardımcı olduğu tahmin edilmektedir. (Xia vd., 2021). Sonuç olarak, E proteini, SARS CoV-2 patogenezinin anlaşılmasında kritik bir rol oynar ve aynı zamanda potansiyel bir terapötik hedef olarak kabul edilebilir(Zhou vd., 2023).

N (nucleocapsid) proteini, viral RNA genomu ile sarmal oluşturup bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksi oluşturur. Bu etkileşim, viral genomun stabilitesi ve replikasyonu için çok önemlidir. (Wu vd., 2023). RNA bağlayıcı bir element olarak N proteini, özellikle viral RNA replikasyonu ve transkripsiyonuna katılımı nedeniyle potansiyel bir ilaç hedefi olarak kabul edilir. Ayrıca N proteini, aktin filamentlerinin yeniden düzenlenmesinde ve apoptoz gibi konakçı-patojen etkileşimlerinde rol oynar (Cong vd., 2020). Bununla birlikte N proteini, bazı koronavirüslerde oldukça immünojeniktir ve enfeksiyon sırasında koruyucu bir bağışık yanıt ortaya çıkarma kapasitesine sahiptir. Araştırmalar N proteininin, virüse karşı hücrel bağışıklığı ve tip 1 interferon salınımını inhibe eden fonksiyonunu baskılayıcı bir özelliğe sahip olduğunu göstermiştir(Wu vd., 2023). Sonuç olarak, N proteininin birçok fonksiyonunun kapsamlı bir şekilde anlaşılması, bu proteini spesifik olarak hedeflemek ve etkili terapötik yaklaşımlar geliştirmek açısından önemlidir(Dutta vd., 2020).

Aksesuar proteinler

SARS-CoV-2 genomu, enfekte olmuş bir konakçı hücre içinde viral çoğalımı kolaylaştırmak için kritik olan bir grup aksesuar proteini kodlar. Bunlar viral genomda yapısal proteinlerin kodladığı sekanslar arasına yerleşmiş olan ORF3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8, 9b,9c ve 10'dur(Redondo vd., 2021). (Şekil 2.3)



Şekil 2.3. SARS-CoV-2 genomik organizasyonu. (Redondo et al., 2021)

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında, farklı patojenik mekanizmaları tetikleyen önemli virülans faktörleri olarak aksesuar proteinler öne çıkar. Bu proteinler, patojeniteyi artırarak ve bağışıklık tepkilerini engelleyerek enfeksiyon sürecini etkilerler, ancak viral replikasyonda doğrudan bir rol oynamazlar (Fang vd., 2021). Araştırmalar, bazı aksesuar proteinlerin özellikle konakçı bağışıklık tepkilerinden kaçmada belirli roller üstlendiğini göstermiştir. Bu proteinlerle ilgili görevlerin çoğu, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF8 veya ORF9b tarafından tip I IFN eylemine karşı koyma veya sitokin salgılanmasının inhibisyonu ile ilgilidir (Zandi vd., 2022). Bunlar ayrıca, otofaji ve apoptoz (ORF3a), mitokondriyal fonksiyonun modifikasyonu (ORF3d) ve inflamatuvar yanıt (ORF9b) gibi önemli hücresel mekanizmalarda da rol oynar (Hurtado-Tamayo vd., 2023).

Yapısal olmayan proteinler (nsp)

SARS-CoV-2'nin genomunda yer alan Yapısal Olmayan Proteinler (NSP) temelde viral RNA'nın replikasyon ve transkripsiyon süreçlerinde görev almaktadırlar. Bununla birlikte, aksesuar proteinlere benzer şekilde, konakçının doğal bağışıklık sisteminden kaçma, konakçı hücre mekanizmasını ele geçirme ve viral replikasyon için uygun bir ortam sağlama gibi patojenez süreçlerinde de rol alır. NSP'lerin ile ilgili bilgi tablo 2.2'de yer almaktadır (M. T. Khan vd., 2021).

Tablo 2.2. Yapısal olmayan proteinler (nsp) işlevleri

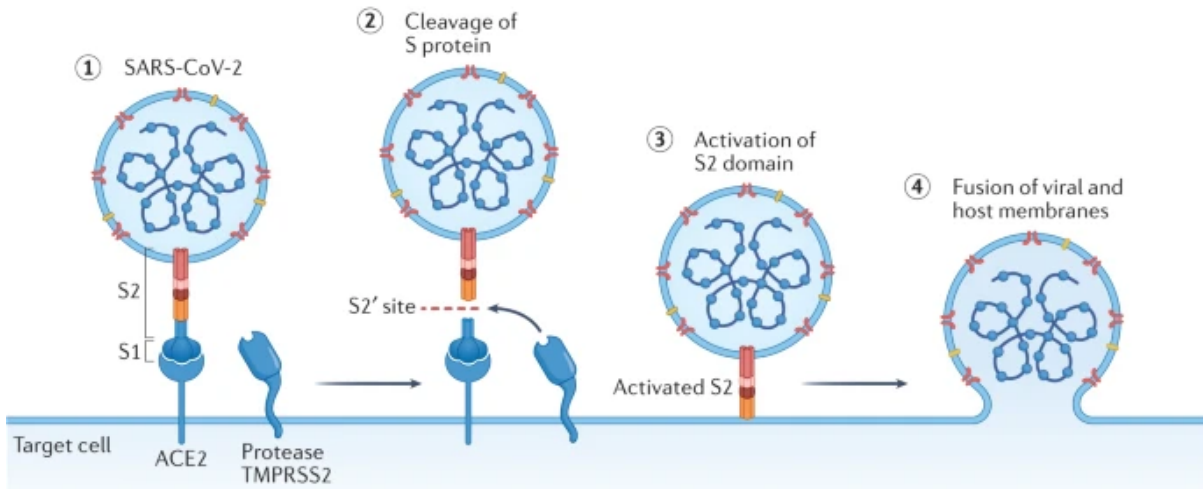
Protein	İşlevi
NSP1	Konakçı translasyon inhibitörü olarak görev yapan ve aynı zamanda konak mRNA'larını bozan öncül proteindir.
NSP2	Prohibitinlere (PHB1 ve PHB2) bağlanır.
NSP3	NSP1, NSP2 ve NSP3'ün pp1a ve 1ab'ın N-terminal bölgesinden salınmasından sorumludur.
NSP4	Viral replikasyon-transkripsiyon kompleksi ve ER Membranlarının değiştirilmesine yardımcı olur.
NSP5	Olgun ve orta düzey yapısal olmayan proteinler elde etmek için birden fazla farklı bölgeden ayrılır.
NSP6	ER'den otofagozom üretir ve çift membranlı kesecikleri oluşturur.
NSP7	NSP8'in RNA polimeraz aktivitesini desteklemek için NSP8 ve NSP12 ile kompleks oluşturur.
NSP8	NSP12 ile heterodimerik bir kompleks oluşturur.
NSP9	Helikaza bağlanabilir.
NSP10	NSP16'nın 2'-O-metiltransferaz aktivitesinin aktive edilmesinde, 3'-5' ekzoribonükleolitik aktivite için gerekli olan NSP14/NSP10 kompleksinin oluşturulmasında rol oynar.
NSP11	İşlevi tam olarak karakterize edilmemiş olsa da mevcut bulgular viral replikasyonda ve konakçı hücre süreçlerinin modülasyonunda rol oynayabileceğini göstermektedir.
NSP12	Viral RNA sentezini katalize etmekten sorumlu RNA'ya bağımlı RNA polimerazdır (RdRp). Viral RNA moleküllerini sentezlemek için kofaktör görevi gören NSP7 ve NSP8 ile bir kompleks oluşturur.
NSP13	Helikaz aktivitesine sahiptir. Hem replikasyon hem de transkripsiyon süreçlerinde rol oynar.
NSP14	RNA düzeltme fonksiyonuyla RNA sentezine yardımcı olan 3'-5' eksonükleaz aktivitesi göstermektedir.
NSP15	Endoribonükleaz aktivitesi ile virüsün replikasyon sürecinde RNA'nın bütünlüğünü korur ve viral RNA'nın parçalanmasını önler.
NSP16	Viral RNA'nın 2'-O-metilasyonunda kritik bir rol oynar, bu da viral RNA'nın stabilitesini artırır. Ayrıca konak bağışıklık tepkisinden kaçınmaya yardımcı olur.

2.3. COVID-19 Patogenezi

2.3.1. Konak hücreye giriş

SARS-CoV-2'nin patogenezi, virüsün konak hücreye girişi ve viral replikasyon, hücresel istila, doğal immün yanıt, inflamasyon ve edinsel immün yanıt olmak üzere bir dizi karmaşık süreci içerir(Jin vd., 2020). SARS-CoV-2'nin belirli hücreleri enfekte etme yeteneğini belirleyen ana faktör S proteinidir. S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşan S proteini, S1 alt birimi aracılığıyla konakçı hücre yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörüne bağlanır(Fehr & Perlman, 2015).

Hedef hücrede S1 alt bölgesinden ACE2'ye bağlandıktan sonra S proteini, S2 bölgesinden tip II transmembran serin proteaz (TMPRSS-2) enzimi tarafından kesilir ve S1 ile S2 iki bölgesi ayrılır. Bu bölünme, viral ve konakçı lipid çift katmanlarını kaynaştırmak için S2 alt birim trimerlerini aktive eder ve ardından virion membran füzyonunu takiben viral genom konakçı hücre sitoplazmasına girer(Lamers & Haagmans, 2022) (Şekil 2.4).



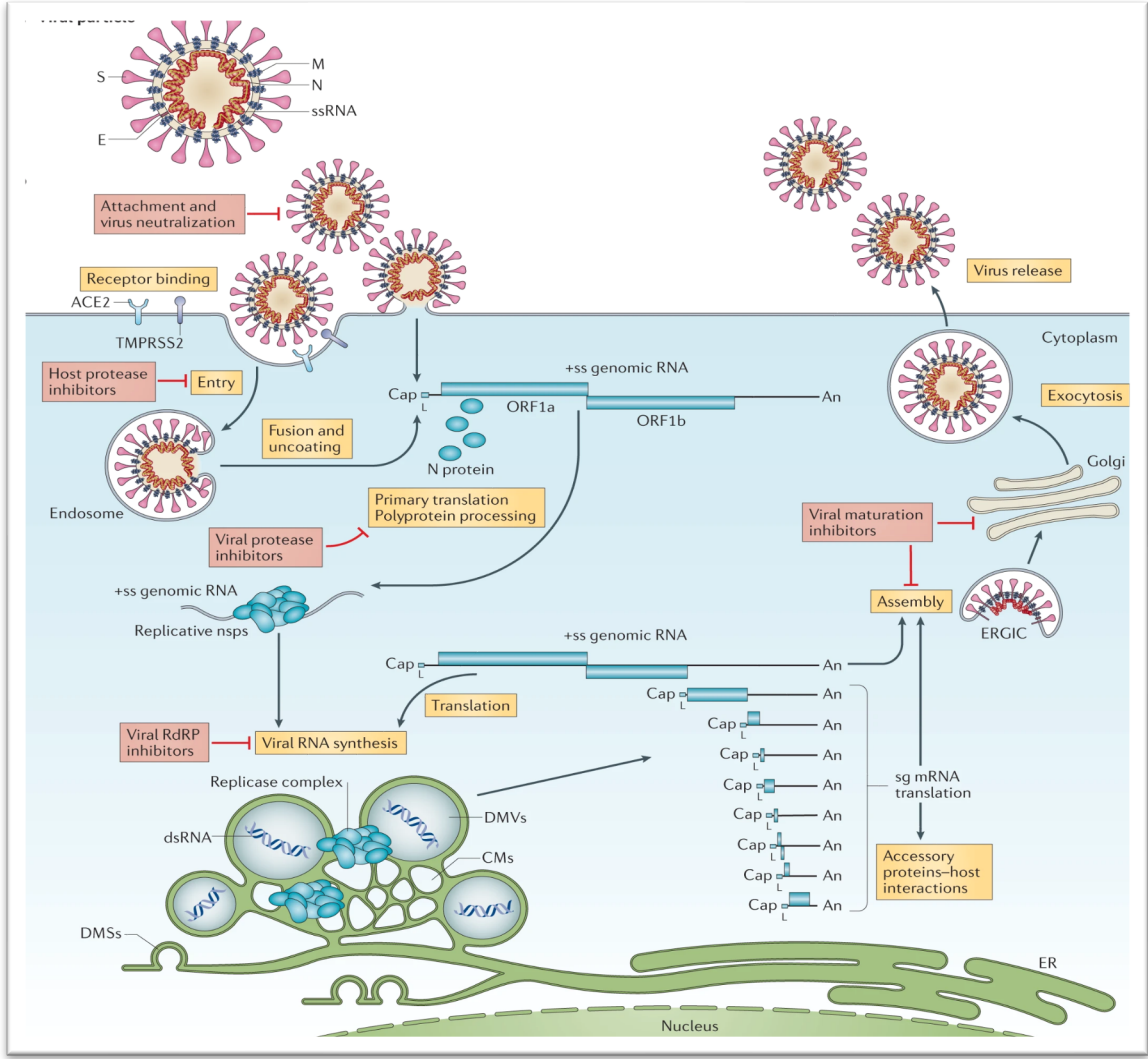
Şekil 2.4. SARS-CoV-2'nin S protein aracılığıyla konak hücreye bağlanması ve füzyon(Lamers & Haagmans, 2022)

SARS-CoV-2'nin insan hücrelerine girmek için kullandığı özel reseptör, çoğunlukla tip 2 alveoler epitel hücrelerde bulunan ACE2'dir. SARS-CoV-2 ayrıca, sialik asit, dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) ve aminopeptidaz-N (APN) dahil olmak üzere birçok reseptörle etkileşime girerek konakçı hücreye bağlanma yeteneğine sahiptir. Bu durum koronavirüslerin zoonotik bulaş potansiyelini artırmaktadır. Bazı araştırmalarda, diğer koronavirüs türleriyle karşılaştırıldığında SARS-CoV-2'nin S proteinindeki reseptör bağlanma alanının (RBD) ilgili

reseptörlere daha büyük bir afinite gösterdiği rapor edilmiştir(Walls vd., 2020; L. Wang & Xiang, 2020).

2.3.2 Viral yaşam döngüsü

SARS-CoV-2 enfeksiyonu virionların hücrel reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Bu, nükleokapsitin sitoplazmaya birikmesiyle sonuçlanan bir dizi olayı başlatır ve burada viral RNA translasyonu için uygun hale gelir(V'kovski vd., 2021)(Şekil 5). Virüs RNA'sı pozitif polariteli olduğu için sitoplazma da direkt olarak replikaz poliproteinine çevrilir. Sentezlenen replikazda yer alan viral RNA daha sonra genomik ve subgenomik mRNA'ların replikasyonunda şablon olarak kullanır (Ezzikouri vd., 2020). Viral RNA aracılığı ile yapısal olmayan (NSP) proteinleri kodlayan replikasyon transkripsiyon kompleksi (RTC) replikasyon proteinleri 1a ve 1ab'yı sentezler. Bu proteinler daha sonra yapısal olmayan proteinleri sentezler. Aksesuar ve yapısal proteinleri kodlayan bir dizi alt genomik RNA ise RTC tarafından sürekli olarak çoğaltılır. Membrana bağlı yapısal proteinler, M, S ve E endoplazmik retikulumda (ER) çevrilir. Bu yapısal proteinler daha sonra endoplazmik retikulumdaki bir ara bölmesine (ERGIC) taşınır ve burada N proteini ile birleşirler ve buradan golgiye iletilirler. Nükleokapsidler, yeni nesil genomların N proteini tarafından kapsüllenmesinden oluşur ve bunlar, membrana bağlı bileşenlerle birleşerek ERGIC'e tomurcuklanarak viryonlar oluşturur. Son olarak, yeni oluşan viryonlar, enfekte olmuş hücrelerden, kesecikler veya Golgi keseleri içindeki plazma zarına taşınma yoluyla ekzositoza uğratılır(Artika vd., 2020; Fehr & Perlman, 2015).



Şekil 2.5. SARS-CoV-2 virüsü ve yaşam döngüsü(V'kovski vd., 2021)

Bazı koronavirüsler tarafından enfeksiyon sırasında, viryonlarda birleştirilmemiş S proteininin bir kısmı plazma zarına ulaşır. Hücre yüzeyinde S proteini, enfekte olmuş bir hücrenin komşu, enfekte olmamış hücrelerle füzyonuna neden olarak büyük ve çok çekirdekli sınırsız oluşumuna yol açabilir. Bu, enfeksiyonun yayılmasını sağlar ve böylece bağışıklık gözetiminden bir miktar kaçış sağlayabilir(Kadam vd., 2021).

2.4. Konak İmmün Yanıt

2.4.1. Doğal immün yanıt

SARS-CoV-2 enfeksiyonuna karşı immün yanıt, bağışıklık sisteminin birden fazla bileşenini içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte en önemli bileşenler kalıp tanıma reseptörleridir (PRR). PRR'lerden başka SARS-CoV-2 tespiti için iki farklı yol izlenmektedir(Ezzikouri vd., 2020). İlk olarak, plazmasitoid dendritik hücrelerde (pDCs) toll

benzeri reseptör 7 (TLR7) aracılığıyla, diğer hücre tiplerinde ise çift sarmallı RNA (dsRNA) ve tek sarmallı RNA'yı (ssRNA) tanıyabilen TLR3 ve TLR8 aracılığıyla endozoma alınan viral genomik RNA tespit edilir. Diğer bir yol ise enfekte olmuş hücrelerin belirlenmesini içerir. Bu süreçte viral replikasyon sırasında oluşan RIG-I ve MDA5 gibi RNA ara maddeleri, sitosolik RNA sensörleri veya RIG-I benzeri reseptörler (RLR'ler) tarafından tanınabilir. Sonrasında TLR'ler ve RLR'ler devreye girer ve tip I ve tip III interferonların (IFN'ler) IRF3/IRF7'ye bağımlı transkripsiyonu gerçekleşir. Daha sonra TLR'lerin ve RLR'ler nükleer faktör kB'ye (NF-kB) bağımlı pro-inflamatuar sitokinler ve kemokinleri aktive eder(Merad vd., 2022).

İlımlı seyreden COVID-19 hastalarında IFN-III (IFN-11 ve IFN-13) ve ISG'ler, şiddetli seyreden vakalarda ise IFN-12 ve tip I IFN'lerin ekspresyonunun görece daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. IFN sentez yollarında mutasyon bulunan veya otoantikorlara sahip hastalarda, yaşamı tehdit eden COVID-19 hastalığına yakalanma riski fazladır. Hastalığın geç evresinde uzun süreli IFN sekresyonu, diğer sitokinlerin ekspresyonunu artırarak enflamasyonun daha da şiddetlenmesine neden olmaktadır. Ayrıca, COVID-19'da hem kan dolaşımında hem de akciğerlerde pDC'ler ve cDC'lerin miktarında önemli düzeyde azalma tespit edilebilmektedir(Vabret vd., 2020).

PRR sinyali ile indüklenen doğal bağışıklık cevapları, viral temizliğe aracılık etmek için efektör hücreleri aktive eder. Örneğin, NK hücreleri viral olarak enfekte olmuş hücrelerin tespit edilmesine ve ortadan kaldırılmasına katkıda bulunur. Buna karşın, şiddetli COVID-19 hastalarının NK hücrelerinde, dönüştürücü büyüme faktörü-b'nin (TGF-b) etkisiyle, normal serum değerlerinde düşme ve işlev bozuklukları ortaya çıkabilmektedir. Ayrıca bu hastalarda alveolar makrofajların sayısı ciddi şekilde azalmıştır (Ravi vd., 2022). IFN-I ve IFN-III aracılı antiviral savunma bozulurken, proinflamatuar sitokinler ve kemokinler önemli ölçüde yükselir. Ayrıca, Dahası, kan dolaşımlarında belirgin bir yardımcı T hücresi azalması vardır. Dolayısıyla efektör T hücrelerinin aktivasyonu da ağır vakalarda muhtemelen kesintiye uğramaktadır (Ezzikouri vd., 2020).

2.4.2. Adaptif immün yanıt

Antikor virüsün yapısındaki S proteininin ACE2 reseptörüne bağlanmasını önleyerek SARS-CoV-2'yi nötralize eder. Antikorlar ayrıca kompleman ve Fc reseptörlerine bağlanarak efektör T hücrelerinin fonksiyonunu da desteklerler. Nötralize edici antikorların çoğunun S proteininin reseptör bağlanma alanındaki (RBD) farklı epitoplara, özellikle de reseptör bağlanma motifine (RBM) afinite gösterdiği bilinmektedir. Buna ek olarak, nötralize edici

antikorların küçük bir kısmı N-terminal alanına (NTD) bağlanır. Ayrıca, RBM'ye özgü bazı antikorlar ACE2'yi taklit edebilir ve füzyon proteinini doğrudan devre dışı bırakabilir. Bu özellik ilk olarak SARS-CoV'da keşfedilmiştir. RBD ve NTD dışındaki nötralize edici epitoplar genellikle daha az görülmektedir (Merad vd., 2022).

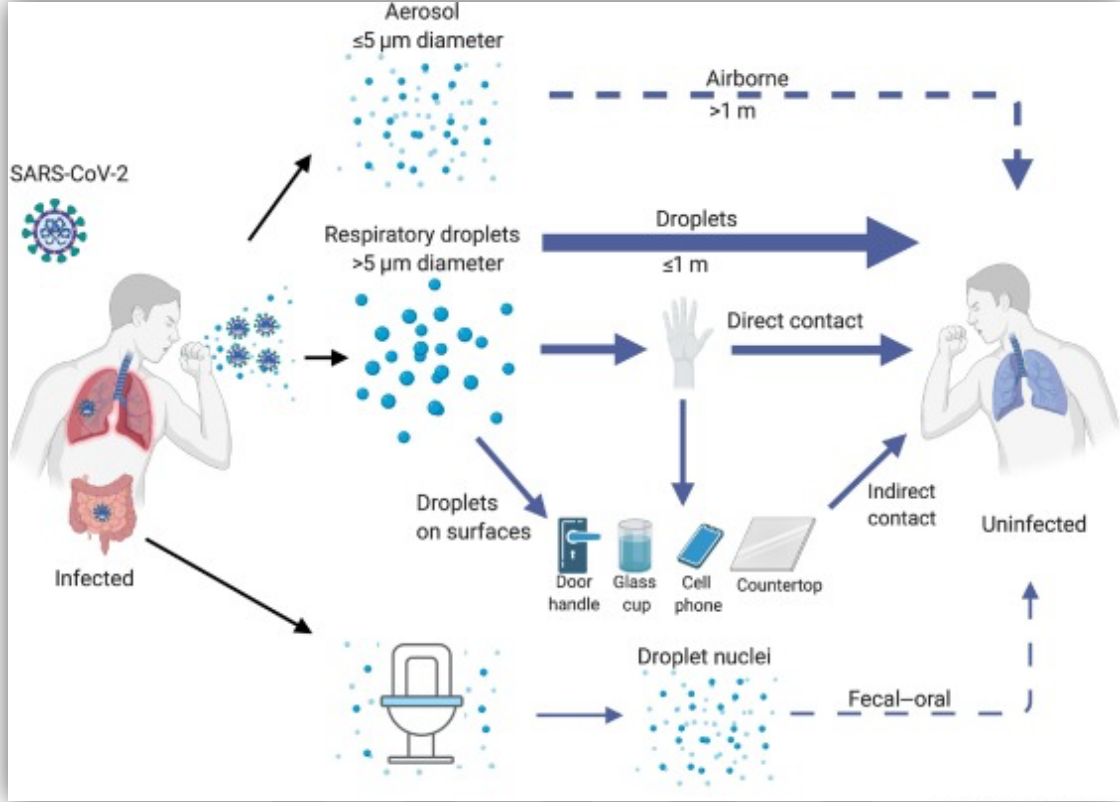
Antikor yanıtın seviyesi, antijenin miktarına ve yanıtın gerçekleştiği germinal merkezdeki reaksiyonunun süresine bağlıdır. Buna bağlı olarak enfekte, preimmün ve aşılınmış bireylerde antikor yanıtın seviyesi genelde yüksektir. Buna karşın bağışıklığı baskılanmış ve/veya böbrek yetmezliği olan hastalarda antikor yanıtı genellikle zayıftır. Bu zayıf yanıt enfeksiyonun kronikleşmesine ve yeni varyantların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Ravi vd., 2022).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu tarafından tetiklenen CD4+ ve CD8+ T hücreleri, yapısal ve yapısal olmayan proteinler dâhil olmak üzere çeşitli antijenleri hedef alır. (Vabret vd., 2020).

Daha önce geçirilmiş SARS-CoV-2 enfeksiyonu aracılığı ile oluşturulan antikorlar ve hafıza T hücreleri, tekrar eden enfeksiyon veya aşılama ile yeniden aktive edilebilir. Ayrıca, abortif enfeksiyonlarda CD4+ T hücrelerinin SARS-CoV-2'ye karşı çapraz koruma sağlayabileceği öne sürülmüştür. Buna ek olarak, mevsimsel koronavirüslere karşı oluşmuş antikorların, SARS-CoV-2 ile gelişmiş enfeksiyonun prognozunu etkilemesi de mümkündür. Dolayısıyla çapraz reaktif antikorların hastalık üzerindeki potansiyel etkisini göz önünde bulundurmak önemlidir (Meskini vd., 2021; Vabret vd., 2020).

2.5. COVID-19 Klinik Bulguları

COVID-19, enfekte kişilerin ürettiği solunum damlacıkları ve aerosoller yoluyla bulaşmaktadır. Bununla birlikte, asemptomatik veya semptom öncesi enfekte bireyler de virüsü bulaştırabilir. Yapılan araştırmalar, virüsün solunum yolununun dışında fekal-oral yollardan ve yüzeyler yoluyla da bulaşabileceğini ortaya koymaktadır (Rando vd., 2021). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. SARS-CoV-2 Bulaşma Yolları(Harrison vd., 2020)

SARS-CoV-2 genel olarak soğuk algınlığı semptomlarına ve bazen gastrointestinal tutulumalara neden olur. Zatürre, ARDS, böbrek yetmezliği ve ölüme ilerleyebilen ciddi 'grip' benzeri tablolar yaygın olarak görülmektedir (Chan vd., 2020; D. Wang vd., 2020). Virüsün inkübasyon süresi ortalama 5 gündür. Enfeksiyon genelde asemptomatiktir; semptom gösteren hastaların çoğu hasta hafif veya orta şiddette ASYE belirtileri arasında sayılabilecek öksürük, ateş, baş ağrısı, miyalji ve/veya ishal ile hastaneye başvurmaktadır(Han & Yang, 2020). Epidemiyolojik bir araştırmada, COVID-19 enfeksiyonunun en yaygın semptomlarının ateş (%83), öksürük (%82) ve nefes darlığı (%31) olduğu raporlanmıştır (Chen vd., 2020).

Hastalık genellikle semptomların ortaya çıkmasından yaklaşık bir hafta sonra şiddetlenir. Enfeksiyon ilerledikçe hastada ileri düzeyde hipokseminin bir sonucu olarak dispne meydana gelir. Bununla birlikte bu durum bazı kişilerde ARDS gelişmesine ve dolayısıyla şiddetli solunum yetmezliğine yol açar(Rando vd., 2021). Bu tür tablolar, interlökin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 ve TNF gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin aşırı ekspresyonuna bağlı sistemik hiperinflamasyon ile seyretmektedir (He vd., 2006; L. Li vd., 2020). SARS-CoV-2, akciğer dokusu üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra, bazı bireylerde pulmoner fibrozis ve akciğer

fonksiyonunda azalma gibi sekeller bırakabilmektedir.(L. Li vd., 2020). İleri yaş, obezite ve erkek cinsiyeti şiddetli COVID-19 gelişimi için en önemli risk faktörleridir. Virüsün solunum sistemi üzerindeki etkisini anlamak, solunum sıkıntısını hafifletmeye ve COVID-19 hastalarına yönelik uzun vadeli sonuçları iyileştirmeye yönelik müdahaleler geliştirmek için çok önemlidir (Lamers & Haagmans, 2022). Hastalarda tat almada bozukluk ve anosmi sıklıkla bildirilmekte olup genellikle diğer semptomlardan önce başladığı görülmüştür(Safiabadi Tali vd., 2021).

2.6. COVID-19'un Prognozu

COVID-19 hastalığın şiddetine göre sınıflandırılabilir. Ancak her kategori için spesifik kriterler klinik kılavuzlara ve çalışmalara göre farklılık gösterebilmektedir. Bununla birlikte hastanın durumu zaman içinde değişebilir (Maier vd., 2021).

Hastalarda tat almada bozukluk ve anosmi de bildirilmiş olup genellikle diğer semptomlardan önce başladığı görülmüştür. Ciddi olgularda ise dispne, solunum sıkıntısı, takipne ve hipoksi gelişmekte olup ateş değişkenlik göstermektedir(Safiabadi Tali vd., 2021).

Hastalığın prognozu aşağıdaki gibi özetlenebilir (Tingbo, 2020):

Asemptomatik veya presemptomatik enfeksiyon: Nükleik asit amplifikasyon testi (NAAT) veya antijen testi gibi virolojik bir test sonucu SARS-CoV-2 pozitif olduğu tespit edilen ancak COVID-19'a özgü herhangi bir semptom göstermeyen vakaları ifade eder.

Hafif hastalık: COVID-19 ile ilgili hafif semptomlar gösteren vakaları ifade eder. Bunlar ateş, öksürük, boğaz ağrısı, halsizlik, baş ağrısı, kas ağrısı, bulantı, kusma, ishal, tat ve koku kaybını içeren bir dizi semptomdur. Bununla birlikte, klinik değerlendirme veya görüntüleme sırasında nefes darlığı, nefes almada zorluk veya göğüs görüntülemesinde herhangi bir anormallik olmadan orta derecede hastalık belirtileri ortaya çıkabilmektedir.

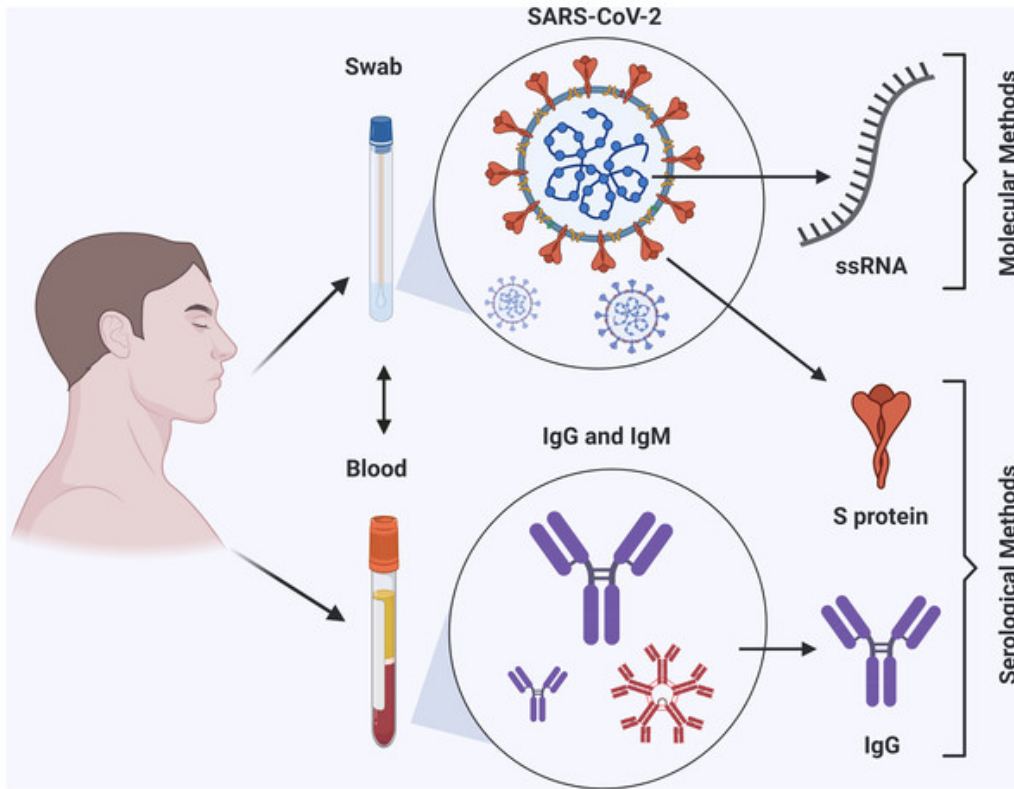
Orta dereceli hastalık: Klinik değerlendirme veya görüntüleme sırasında alt solunum yolu hastalığı belirtileri gösteren ve deniz seviyesinde oda havasında nabız oksimetresi (SpO₂) ile ölçülen oksijen saturasyonu \geq %94 olan kişiler.

Şiddetli hastalık: Oksijen saturasyonu SpO₂ < %94, arteriyel kısmi oksijen basıncının solunan oksijen fraksiyonuna oranı (PaO₂ / FiO₂) <300 mm Hg, solunum hızı >30 nefes/ dk veya akciğer infiltrasyonu >%50 olan vakalardır.

Kritik hastalık: Solunum yetmezliği, septik şok ve/veya çoklu organ fonksiyon bozukluğu olan vakaları kapsar. Hastalarda mekanik ventilasyon gerektirecek kadar ciddi solunum yetmezliği, yoğun bakımda takip edilmesi gereken organ yetmezlikleri, şok tablosu bulunabilir.

2.7. COVID-19 laboratuvar tanı yöntemleri

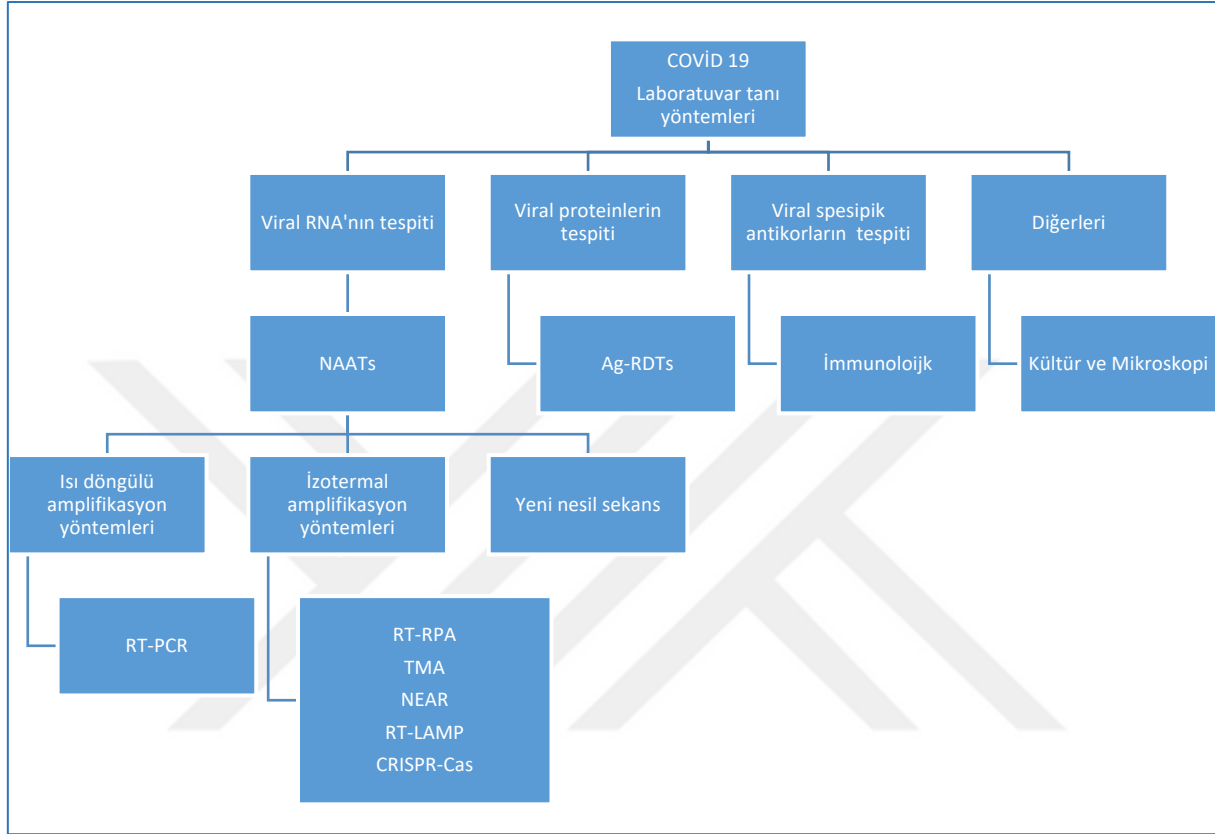
COVID-19 laboratuvar tanı yöntemleri arasında moleküler ve serolojik testler yer almaktadır (Tablo 2.3). qRT-PCR gibi moleküler testler, numunedeki virüsün genetik materyalini tespit eder. Serolojik testler ise S proteini gibi antijenleri ve virüse yanıt olarak üretilen antikorları tespit ederek geçirilmiş enfeksiyonun tespitini sağlar. Teşhis yöntemlerinden, COVID-19 vakalarının tanımlanması, izlenmesi, kontrol altına alınması ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde faydalanılır (Dhamad & Abdal Rhida, 2020; Shen vd., 2020)(Şekil 2.7).



Şekil 2.7. COVID-19'un moleküler ve serolojik tespit yöntemlerinin özeti(Dhamad & Abdal Rhida, 2020).

Antijen testleri, numunede bulunan virüsteki spesifik proteinleri tespit ederek sonuç sağlar. Moleküler testlerin duyarlılığı daha azdır, buna karşın acil sonuçların gerekli olduğu

serviler veya tarama istasyonları gibi yerlerde daha avantajlıdır. Ek olarak, COVID-19 testinin erişilebilirliğini ve verimliliğini artırmak için tükürük bazlı testler gibi yeni, pratik teşhis yöntemleri araştırılmaktadır. Erken tespit uygun tıbbi müdahaleye olanak tanır, böylelikle virüsün yayılmasını ve mortaliteyi azaltır (Rong vd., 2022).



Tablo 2.3. SARS-CoV-2 tespiti veya COVID-19'un tanımlanması için kullanılan Laboratuvar tanı yöntemleri(Safiabadi Tali vd., 2021)

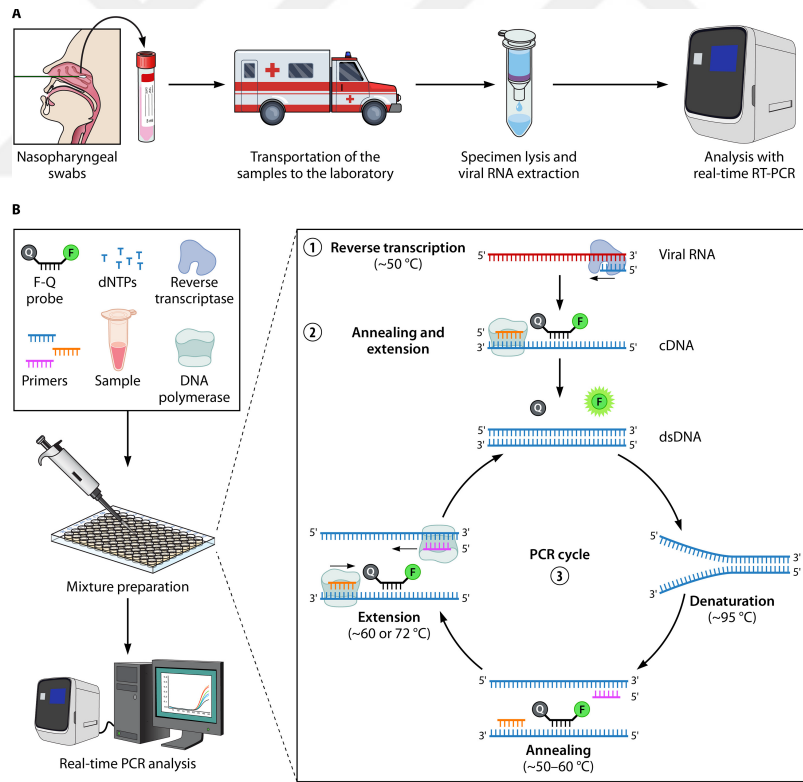
2.7.1. Moleküler Yöntemler

PCR tabanlı test yöntemleri

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) testleri, hedeflenen spesifik gen bölgesini amplifiye etmeye yönelik geliştirilen kantitatif ölçüm sağlayan yöntemlerdir. COVID-19'un bir RNA virüsünden kaynaklandığı göz önüne alındığında, tespiti için kantitatif revers-transkriptaz PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılmaktadır. qRT-PCR gerçekleştirmek için iki yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden ilki, cDNA sentezini ve PCR amplifikasyonunu tek bir reaksiyonda birleştiren ve deneysel hataları en aza indiren tek adımlı testtir. Ancak bu yaklaşım, RNA dizisinin hızlı bozulması nedeniyle aynı numunenin tekrarlanan testleri için uygun değildir. Diğer yöntem ise ters transkripsiyonun PCR amplifikasyonundan ayrı olarak gerçekleştirildiği iki aşamalı testtir ve bu yöntem tek aşamalı teste göre daha duyarlıdır (Ulinici vd., 2021). Buna karşın iki aşamalı

test DNA kontaminasyonu riski taşır ve daha uzun bir işlem süresi gerektirir. Günümüzde yüksek özgüllüğü ve hassasiyeti nedeniyle koronavirüs tespiti için tek aşamalı test kullanılmakta ve hala popülerliğini korumaktadır(Rong vd., 2022).

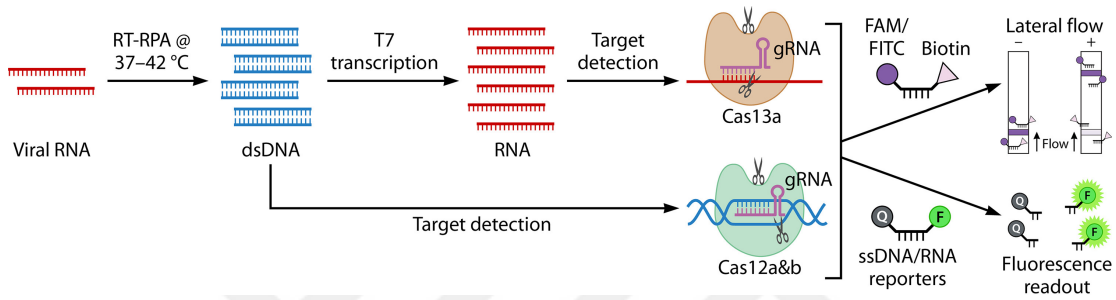
qRT-PCR, COVID-19'un teşhisi için oldukça hassas ve spesifik bir yöntemdir. Uygulama, nazofaringeal sürüntü örneğinin alınması ile başlar. Numuneden RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilir ve cDNA aşamasına geçilir. cDNA aşamasından Ters transkripsiyonla RNA dan tamamlayıcı DNA ya dönüştürülür. Bu cDNA, virüs genomunu hedef alan spesifik primerler kullanılarak PCR amplifikasyonuna tabi tutulur. Floresan boyalar veya probalar kullanılarak amplifikasyon sürecinin gerçek zamanlı izlenmesi, numunedeki viral yükün ölçülmesine olanak tanır (Şekil 2.8). Viral RNA miktarı, döngü eşiği (CT) değerleri ile ters orantılıdır. Dolayısıyla sonuçlar düşük CT değerlerinin daha yüksek viral yükü gösterdiği mantığına dayanmaktadır (Safa vd., 2010; Ulinici vd., 2021).



Şekil 2.8. RT-PCR analizi(Safiabadi Tali vd., 2021) .

CRISPR tabanlı testler

CRISPR tabanlı testler, COVID-19 tanısı için qRT-PCR'a göre daha hızlı, basit ve uygun fiyatlı bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Bu testler metodolojik olarak nükleik asit ekstraksiyonu, hedef amplifikasyonu, CRISPR tabanlı sinyal üretimi ve tespitini içerir. Yüksek hassasiyet ve özgüllük sunarak alternatif yöntemler arasında ön plana çıkmaktadır (Safiabadi Tali vd., 2021)(ŞEKİL 2.9). Yöntemin dezavantajı 10 nM'nin altındaki konsantrasyonlarda virüsleri tespit edememesidir (Butiuc-Keul vd., 2022).

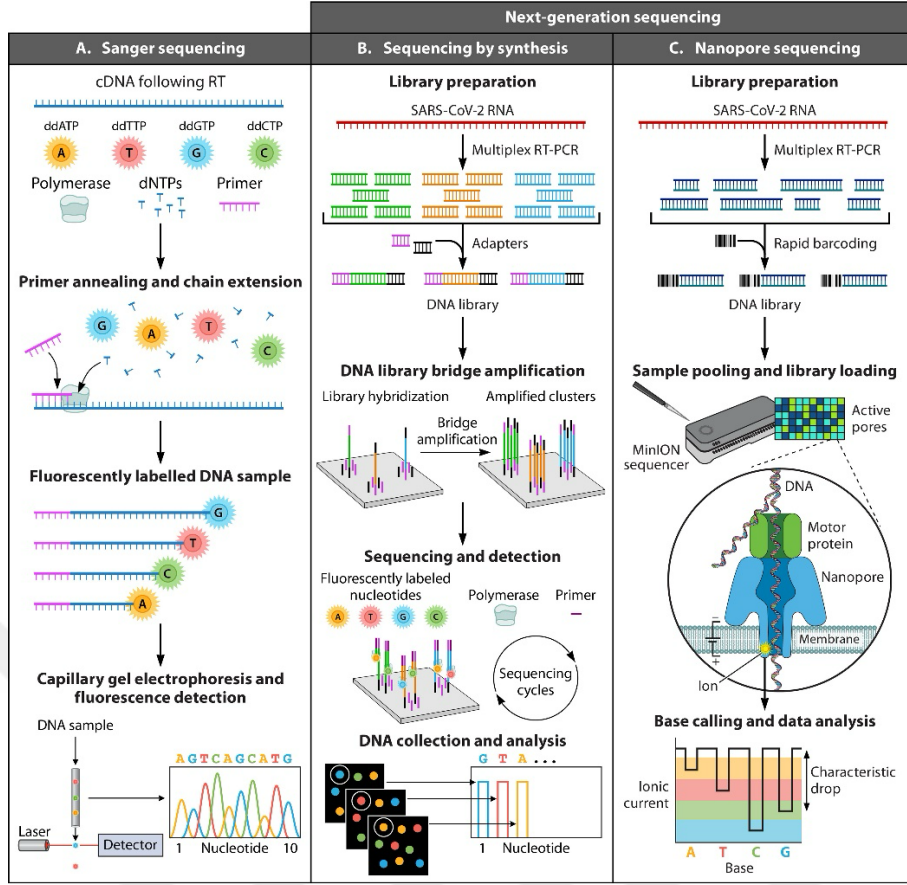


Şekil 2.9. Viral RNA tespiti için CRISPR-Cas teknolojisinin çalışma prensibi (Safiabadi Tali vd., 2021)

Bu testler birçok hastalığın teşhisinde gereken ihtiyacı karşılama potansiyeline sahip olup, gelecek için umut verici bir teknoloji olarak görülmektedir(Butiuc-Keul vd., 2022).

Yeni nesil gen dizilimi (NGS)

NGS, bir numunedeki tam genom dizilimini tanımlamak için özel ekipman gerektiren karmaşık bir teknolojidir. NGS genel olarak, klinik örneklerden elde edilen SARS-CoV-2'nin genomik dizisini anlamak, COVID-19 pandemisinin odak noktalarını ortaya çıkarmaya, bulaş yollarını belirlemeye, patogenez nedenlerini açıklamaya ve varyantların zaman içinde nasıl geliştiğini izlemeye yardımcı olur (Bloom vd., 2020). NGS teknolojisi 1970'lerde geliştirilen Sanger dizilemesinin modifikasyonlarına dayanmaktadır (Bhojar vd., 2021). Bu teknolojiyle belirli teknikleri kullanarak doğrudan klinik örneklerden yüksek kalitede diziler kolayca elde edilebilir. NGS'de kullanılan teknolojiler arasında sentez yoluyla dizileme, ligasyon yoluyla dizileme ve iyon yarı iletken dizileme (örn. nano-gözenek dizileme) yer alır (Safiabadi Tali vd., 2021)(Şekil 2.10).



Şekil 2.10. SARS-CoV-2'nin tanımlanması için dizileme teknikleri. (A) Sanger dizilimi. (B) Sentez yoluyla yeni nesil sıralama (NGS). (C) Nanopor dizilimi(Safiabadi Tali vd., 2021).

NGS, hızlı ve kapsamlı genom analizi sunarak COVID-19'un tespitinde giderek daha çok önem kazanmaktadır. Numunedeki viral RNA'nın en küçük farklılıklarının bile tanımlanmasına olanak sağladığı için, SARS-CoV-2'nin yeni varyantlarının izlenmesi ve bunların bulaşma, virülans ve aşılama etkinliği üzerindeki etkilerinin anlaşılması için kullanılmaktadır. Bu bağlamda NGS Delta, Omicron ve Alpha dahil olmak üzere SARS-CoV-2 varyantlarının tespit edilmesinde etkili olmuş ve halk sağlığına önemli katkılar yapmıştır. Diğer taraftan, NGS güçlü bir tanı aracı olmasına rağmen özel ekipman, deneyim ve biyoinformatik analiz gerektirir ve bulguların yorumlanması qRT-PCR'den daha uzun sürer. Bu sınırlamalara rağmen teknoloji ilerledikçe NGS, hem COVID-19 gibi küresel salgınla mücadelede hem de başka patojenlerle mücadelede giderek daha işlevsel hale gelmektedir (Rong vd., 2022).

2.7.2. Serolojik yöntemler

Viral antikor tespiti

Serolojik testler, hastaların SARS-CoV-2'ye karşı nasıl antikor ürettiğinin anlaşılmasını sağlar. Bu testler immünoglobulin IgA, IgM, IgG veya toplam antikoru tespit edebilir (Ernst vd., 2021).

Serolojik testler, serum, plazma veya tam kan gibi kan örneklerinde SARS-CoV-2'ye yönelik antikorları tespit eder. SARS-CoV-2'ye karşı antikor yanıt 1 ila 2 hafta sürdüğü için, hastalığın erken evrelerinde virüsün teşhisinde serolojik testlerin verimli olmadığı rapor edilmiştir. Ancak immun yanıt için yeterli süre geçtikten sonra bu testlerin işlevselliği artmaktadır (Ulinici vd., 2021).

Serolojik testlerde genellikle SARS-CoV-2'ye özgü antikorları tespit etmek için N proteini ve S proteininin S1 bileşeninin RBD alanının rekombinant antijenleri kullanılır (Chau vd., 2020).

SARS-CoV-2 serolojik testlerinde sıklıkla IgM ve IgG araştırılır, ancak IgA tespiti daha az yaygındır. IgA ve IgM, SARS-CoV-2'ye karşı serolojik olarak bazı avantajlar gösterebilmektedir. Ancak kan ve tükürükte IgA ve IgM'nin IgG'ye göre daha hızlı bir şekilde azalması kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Çeşitli ortamlarda veya hasta gruplarında serolojik reaksiyonların kapsamlı bir şekilde anlaşılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bununla birlikte IgA, IgM ve IgG'nin SARS-CoV-2'ye karşı nötralizan etkiye sahip olduğu açıktır. Antikor tespitinde kullanılan en yaygın teknikler, ELISA'lar ve CLIA'lardır. Hızlı sonuç verebilen LFIA'lar da kullanılmaktadır. Ancak zaman içinde gelişen nötralize edici antikorların derecesini değerlendirmek için araştırmalar devam etmektedir (Rotondo vd., 2022).

Antijen tespiti

SARS-CoV-2'yi tespit etmek amacıyla enfeksiyona yanıt olarak üretilen antikorların tespit edilmesinin yanı sıra, enfeksiyonun varlığını doğrulamak için viral antijenlerinin doğrudan tespiti de bir seçenektir. Antijenler, T ve B lenfositlerin yüzeyindeki antijen reseptörleri tarafından spesifik olarak tanınan, antikor üretimini ve hücre aracılı immün yanıtları indükleyebilen moleküllerdir (Ernst vd., 2021)

Antijen tespit yöntemleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun erken aşamalarında aktif replike olan virüsleri tespit etmek için kullanılır. NAAT'lerin aksine, antijen tespiti SARS-CoV-

2 proteinlerinin tanımlanmasına dayanmaktadır. Antijen bazlı testler, enzime bağlı immünosorbent analizleri (ELISA'lar) veya kemilüminesans immünolojik analizler (CLIA'lar) gibi enzim immünolojik testi (EIA) teknolojileri kullanılarak yarı otomatik veya otomatik cihazlarda gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte bugüne kadarki çoğu antijen saptaması, LFIA'lar aynı zamanda yanal akışlı immünokromatografik gibi taşınabilir cihazlar kullanılarak, kullanımı kolay ve hızlı testlerle gerçekleştirilmektedir (WHO, 2020).

2.8. Guanilat Bağlayıcı Poteinler (GBP)

Doğal bağışıklık sistemi enfeksiyona karşı birincil savunma hattıdır. Omurgalılarıdaki özel kalıp tanıma reseptörleri (PRR'ler), patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PAMP'ler) tespit eder. Daha sonra spesifik adaptör proteinleri, kinazları aktive ederek ve aktive edilmiş transkripsiyon faktörlerinin çekirdeğe hareketini kolaylaştırarak sinyal yollarını başlatır. Bu süreç interferonlar (IFN), inflamatuvar sitokinler ve kemokinler gibi çözünür araçların üretimine yol açar. IFN tarafından uyarılmış bir hücre, IFNAR'a bağlanır ve JAK-STAT sinyal yolunu tetikleyerek birçok interferonla uyarılan genin (ISG'ler) ekspresyonununa yol açar. Bu efektör kimyasallar virüsün yaşam döngüsünün çeşitli aşamalarında hedefleyebilir. Ayrıca konağın proliferatif, immünolojik ve inflamatuvar yollarını da etkileyebilir (Ezzikouri vd., 2020; Merad vd., 2022).

Guanilat bağlayıcı proteinler (GBP'ler), patojen enfeksiyonuna yanıt olarak indüklenen immün GTPazlardır. Bu proteinler tümör nekrozundan antimikrobiyal işlevlere kadar çok sayıda fizyolojik role sahiptir. Örneğin bazı çalışmalarda bakteri/patogen vakuolünün parçalanması ve inflamazomun aktivasyonundaki mekanik rolleri tanımlanırken, viral enfeksiyonlardaki işlevleri de ortaya çıkmaktadır. GBP'lerin virüs enfeksiyonlarındaki rolü, viral RNA/protein sentezinin engellenmesi, viral zarf glikoproteininin işlenmesinin bloke edilmesi ve viral proteinin degradasyon için hedeflenmesi gibi çeşitli fonksiyonları içermektedir (Kutsch & Coers, 2021).

2.8.1. GBP yapısı ve hücrel lokalizasyon

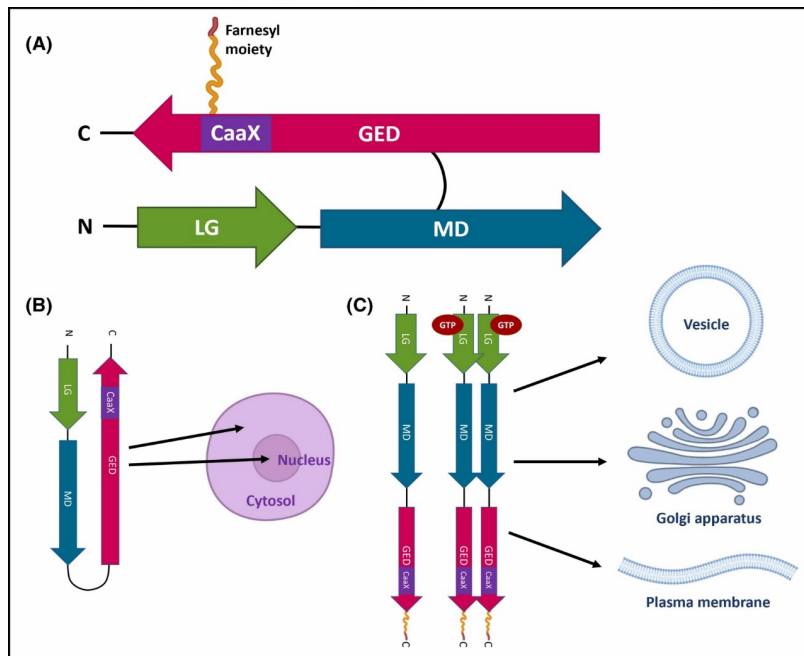
GBP yapısı

GBPler öncelikle protistlerde ve bitkilerde tanımlanmıştır. Günümüze kadar 32 takson arasında 132 korunmuş GBP geni tanımlanmıştır. İnsanlarda hepsi tek bir kromozom kümesi içinde yedi GBP (hGBP-1'den 7'ye kadar) bulunmaktadır (Kirkby vd., 2023; Kutsch & Coers, 2021).

GBP'ler, ökaryotik hücrelerde çok çeşitli hücre içi patojenlere karşı koruma sağlayan bağışıklık proteinlerinin bir süper ailesini oluşturur. Bu proteinler interferon IFN gama (IFN- γ) tarafından indüklenen bir GTPaz ailesinin üyesidir. (Kutsch & Coers, 2021).

Daha önce yapılan çalışmalarda, GBP'lerin başlangıçta doğuştan gelen bağışıklığın temel unsurları olduğu belirtilirken daha sonra, insanlar, fareler ve zebra balıkları üzerinde yapılan araştırmalar, GBP'lerinin enflamasyonu ve mikrobiyal enfeksiyonları kontrol ettiğini ortaya koymuştur. Bu nedenle, GBP'lerin temel işlevi hücre otonom konak savunma mekanizmalarını yürütmektir. Bu durum inflamatuvar yanıtı kolaylaştırarak GBP'lerin hücrenin doğal bağışık yanıtına katkı sunduğunu ortaya koymaktadır(Kirkby vd., 2023).

GBP'ler, bir orta (MD) alana bağlı bir N-terminal Büyük GTPaz (LG) alanı ve izoprenilasyona uğrayan bir CaaX motifi barındıran bir C-terminal GTPaz efektör (GED) alanı olmak üzere üç ana alandan oluşur (Şekil 2.11). GBP'ler İzoprenilasyon öncesi sitozol veya çekirdekte eşit olarak lokalize olur. Dimerizasyon ve CaaX bölgesinden gerçekleşen izoprenilasyon üzerine GBP'ler golgi, vezikül benzeri organeller ve plazma membranı gibi farklı hücresel organellere lokalize olur ve farklı fizyolojik işlevler yerine getirir(Meunier vd., 2015).



Şekil 2.11. GBP Yapısı ve Hücresel Lokalizasyon.

Hücresel lokalizasyon

GBP'ler, akciğer, karaciğer, böbrek, sindirim sistemi, beyin ve cilt dahil olmak üzere çeşitli dokularda bulunur. Hücre içindeki dağılımı şu şekildedir(Kutsch & Coers, 2021):

- GBP1, yaygın veya granüler bir dağılım sergiler. Ayrıca hem plazma zarında hem de sitoplazmada bulunabilir.
- GBP2 ve GBP4 sitoplazma ve çekirdek boyunca geniş bir şekilde dağılmıştır.
- GBP3 sitoplazma da lokalize olmuştur.
- GBP5 perinükleer bölgede lokalize olmuştur.
- GBP6 ve GBP7 ağırlıklı olarak sırasıyla orofaringeal kanal ve karaciğerde bulunur.

Virüs enfeksiyonunda GBP'ler

Çeşitli viral enfeksiyonlar GBP'lerin ekspresyonunu güçlü bir şekilde indükler. GBP'lerin bakteriyel ve protozoal enfeksiyonlar sırasındaki antimikrobiyal işlevleri, daha çok bakterileri ve inflamatuvar bölgeleri hedeflemektedir. Ayrıca, bu proteinlerin viral enfeksiyonlardaki rolleri ile ilgili yapılan çalışmalar da mevcuttur. Mevcut araştırmalar kapsamında aşağıda, virüs merkezli temel GBP çalışmalarını geniş bir işlevsel gruplandırma altında özetlenmiştir(Chhabra & Kalia, 2023) (Tablo 2.4). Bu çalışmaların çoğu insan ve fare GBP'lerine odaklanmıştır. Ayrıca domuz, Tupaia belangeri chinensis (Çin ağaç faresi) gibi diğer canlılar üzerine yapılan birkaç çalışmanın raporu mevcuttur (Praefcke, 2018).

Tablo 2.4. Virüs enfeksiyonlarında GBP'lerin rolü(Chhabra & Kalia, 2023)

GBP	Yerleşim	Virüs	Konak	Etki şekli
GBP1	Sitoplazma ve Plazma zarı	VSV, EMCV	İnsan Çin ağaç faresi	IFN aracılı antiviral yanıt VSV genomik transkripsiyon inhibisyonu
		HSV-1	Çin ağaç faresi	Otofaji indüksiyonu
		HCV	İnsan	GTPaz aktivitesine bağlı antiviral yanıt
		HEV	İnsan	Kapsid proteininin lizozomal kompartmana hedeflenmesi
		KSHV	İnsan	Aktin filamet oluşumunu bozar.
		CSFV	İnsan Domuz	Replikasyonun erken evresinin GTPaz aktivitesine bağlı inhibisyonu
Gbp1	Sitoplazma ve Hücre zarı	DENV	Fare	KSHV viryonlarının nükleer ihracını şu şekilde engeller
GBP2	Sitoplazma ve Çekirdek	VSV	Fare	GTP bağlanma modelinden bağımsız antiviral yanıt
		EMCV	Fare	GTP bağlanma modeline bağlı antiviral yanıt
		MNV	Fare	GTPaz aktivitesi için gerekli olan Arg48 ve Lys51 aracılığıyla antiviral etki
GBP3	Sitoplazma	IAV	İnsan	Viral RNA polimeraz aktivitesini inhibe ederek GTP bağlanma aktivitesine bağlı antiviral yanıt
GBP5	Perinükleer bölge ve Golgi aygıtı	IAV	İnsan	IFN sinyalizasyonunu aktive eder ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimi
		RSV	İnsan	RSV SH proteininin aşırı salgılanmasına bağlı hatalı virüs üretimi
		HIV-1	İnsan	Viral zarf glikoproteininin (Env) işlenmesine ve virion entegrasyonuna müdahale eder.
GBP2,	Golgi aygıtı	HIV, ZIKV, MLV, MaV,	İnsan	FURIN proteazın proteolitik aktivitesini
GBP5		Kızamık, IAV, RABV, EBLV-1, HERV, SARS-CoV-2	Fare	inhibe eder, böylece viral glikoproteinin olgunlaşmasını ve işlenmesini baskılar.

GBP'lerin interferon ve inflamatuvar aktivasyonda rolü

GBP'ler, çeşitli hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna yol açan patojen vakuolünü veya bakterileri spesifik olarak hedefleme yeteneğine sahiptir. Bu, NLRP3 ve AIM2 inflamatuvarlarının yanı sıra kaspaz-11'in uyarılmasını içerir ve bu durum kaspaz-1'e bağlı piroptozun indüklenmesiyle sonuçlanır. Piroptoz, hücre içi patojenleri ortadan kaldırmaya yarayan, programlanmış hücre ölümünün oldukça inflamatuvar bir şeklidir. Bununla birlikte bu süreç, enfeksiyon etkenlerine karşı proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını kolaylaştırır(Meunier vd., 2015; Shenoy vd., 2012).

GBP'lerin virüs enfeksiyonunda interferon ve inflamatuvar aktivasyonun düzenleyici rolü, yapılan bazı çalışmalarda ortaya konmuştur. Örneğin Fare makrofaj RAW hücrelerinde Gbp1'in susturulmasını içeren bir çalışmada, DENV yüklerinde bir artış, NF- κ B aktivasyonunda bir bozulma, IFN β ve IL6 salgılanmasında ise bir azalma olduğu rapor edilmiştir (Pan vd., 2012).

Başka bir çalışmada GBP1 ve GBP2 ekspresyon seviyelerinin, ciddi Dang humması hastalarının plazma numunelerinde azaldığı bulunmuştur. Bu durum, GBP1 ve GBP2'nin ekspresyon düzeylerinin hastalık patogenezindeki önemine işaret etmektedir (Mariappan vd., 2023). Ayrıca başka bir çalışmada benzer şekilde, GBP5'in aşırı ekspresyonunun sırasıyla, IAV virüsünün replikasyonunu kısıtladığı, İnfluenza hastalarında ise IFN ve NF- κ B sinyal yolunun aktive edildiği rapor edilmiştir(Feng vd., 2017).

Bu bulgular, GBP'lerin interferon-inflamatuvar eksenini aktive etmede çok önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte yapılan çalışmaların sonuçları GBP'lerin viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıt mekanizmalarının anlaşılmasının önemini göstermektedir(Shenoy vd., 2012).

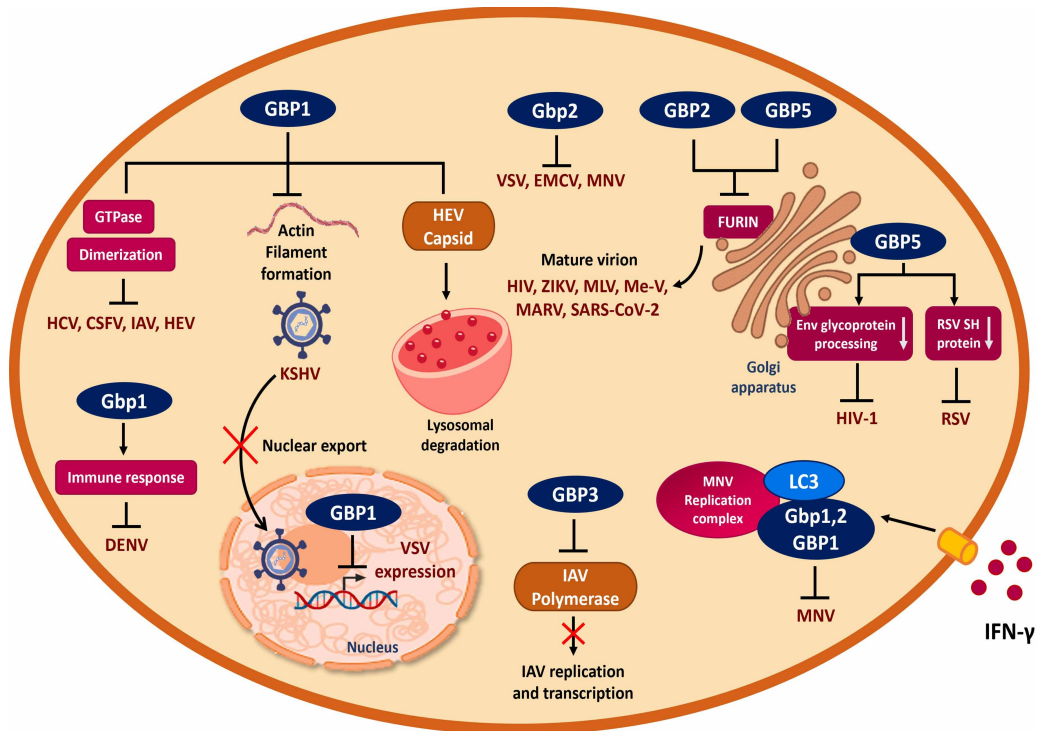
GBP'lerin GTPaz aktivitesine bağlı antiviral rolleri

GBP'lerin viral enfeksiyonlarda GTPaz aktivitesine bağlı olarak gerçekleşen antiviral rolü yapılan araştırmalar sonucu ortaya konulmuştur (Şekil 2.12). Bu çalışmalar içinde en kapsamlı olanı GBP1'in etkileri üzerine yapılmıştır. GBP1'lerin bu araştırmalarda ortaya konulan etkileri şu şekildedir (Chhabra & Kalia, 2023): GBP1'in GTPaz aktivitesi, dimer oluşturma yeteneği ve virüs kaynaklı bağışıklık yanıt sonucu virüslerin replikasyonunu kısıtlaması biçiminde etki gösterir. Hücre hatlarının üzerinde yapılan çalışmalarda GBP1'in aşırı ekspresyonunun, İnfluenza A virüsü (IAV), klasik domuz ateşi virüsü (CSFV), domuz üreme

ve solunum sendromu virüsü (PRRSV), Şap hastalığı virüsü (FMDV), Vesiküler stomatit virüsü (VSV), Ensefalomyokardit virüsü (EMCV), Hepatit C virüsü (HCV), Dang virüsü (DENV) gibi RNA virüslerinin replikasyonunu azalttığı bildirilmiştir. (Naschberger vd., 2006; Ostler vd., 2014)

Yapılan bir çalışmada GBP2'nin, GTP bağlama ve hidroliz aktivitesi yoluyla EMCV ve Murine Norovirus (MNV)'nin replikasyonunu anti-VSV aktivitesi göstermeksizin inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca GBP2 ve GBP5 hücrel proteaz FURIN'in aktivitesini inhibe ederek virüsün hem olgunlaşmasını hem de olgun viryon partikülünün işlenmesi bozduğu da belirtilmiştir (Mariappan vd., 2023). GBP5 RSV'nin SH (küçük hidrofobik) protein miktarını azaltarak replikasyonunu engellediği bildirilmiştir. Aynı zamanda GBP5, HIV-1 (İnsan bağışıklık yetmezlik virüsü tip 1)'in zarf glikoprotein (Env) replikasyonunu ve işlenmesini ve olgun viryon partikülüne dahil edilmesini engelleyerek HIV-1 enfektivitesini de kısıtladığı gösterilmiştir (Feng vd., 2017).

GBP3, viral polimeraz kompleksinin aktivitesini inhibe ederek IAV enfeksiyonunu baskılar. GBP3 ayrıca IFN γ tarafından indüksiyon üzerine, LC3 ve interferon ile indüklenebilir GTPazlar, MNV'nin replikasyon kompleksi ile etkileşime girerek replikasyonunu inhibe eder (Nordmann vd., 2012).



Şekil 2.12. GBP'lerin GTPaz aktivitesine bağlı antiviral rolleri

Mevcut çalışmalardan elde edilen bulgular, GBP'lerin artan ekspresyonunun, GTP'nin bağlanmasına ve hidrolizine yol açtığını göstermektedir. Bu durumun çeşitli virüslerin replikasyonunu engellediğini görülmektedir. Ayrıca bu inhibitör etki, viral nükleik asit sentezinin ve viral protein translayonunun baskılanmasına bağlanabilir. Araştırmaların sonuçları, GBP'lerin viral enfeksiyonlara karşı konakçı savunma mekanizmasındaki potansiyelini vurgulamaktadır. (Zhao vd., 2023)

GBP2 ve GBP5 antiviral mekanizması

HIV-1 ve diğer retrovirslere karşı antiviral özellikleriyle bilinen bir protein olan GBP5'in, Env'in glikozilasyon sürecini hedefleyerek viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Spesifik olarak, Golgi lokalize GBP5, Env glikoproteinini gp120'nin N-bağlı glikozilasyonunu engelleyerek yüzey ekspresyonunun ve virüs enfektivitesinin azalmasına yol açtığı belirtilmiştir(Hotter vd., 2017).

Daha sonraki araştırmalar, GBP2 ve GBP5'in ayrıca Golgi'de yerleşik proteaz furinin aktivitesine müdahale ettiğini, dolayısıyla Env glikoproteinlerinin HIV-1 virionlarına dahil edilmesini baskıladığını ortaya çıkardı. GBP2 ve GBP5'in devre dışı bırakılmasının bulaşıcı HIV-1 verimini arttırdığı gözlemlendi. Bununla birlikte GBP5'in devre dışı bırakılmasının ise kızamık, IAV ve ZIKV replikasyonunu arttırdığı bulundu. Ek olarak GBP2 ve GBP5, Marburg ve murin lösemi virüslerine karşı viral enfektivitenin azaldığını gösterdi (Braun vd., 2019).

COVID-19 salgını sırasında yapılan bir araştırmada, GBP2 ve GBP5'in, furin aracılı spike protein bölünmesini bozarak erken nesil SARS-CoV-2 suşları Wuhan-Hu-1 ve VIC'nin neden olduğu enfeksiyonu önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte SARS-CoV-2'nin Alfa ve Delta suşları, GBP aracılı inhibisyondan kaçacak mekanizmalar geliştirdiği rapor edilmiştir(D. Mesner vd., 2023).GBP5 ayrıca RSV SH proteininin mikro partiküllere hücre dışı salınımının arttırılmasıyla da ilişkilendirilerek virüs replikasyonunun kısıtlanmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu bulgular, Golgi'de lokalize GBP2 ve GBP5'in çeşitli viral proteinleri modüle etmede ve virionların oluşumunu engellemedeki kritik rolünü vurgulamaktadır(Kirkby vd., 2023).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Hasta seçimi

Bu çalışmaya, Kasım 2020 ile Şubat 2021 tarihleri arasında Meram Tıp Fakültesi Hastanesine başvuran ve SARS-CoV-2 qRT-PCR sonucu pozitif olarak tespit edilen 18-80 yaş aralığında 150 hasta dahil edildi. Bu çalışmanın kontrol grubunu, COVID-19 tanısı alan hasta ile benzer yaş aralığında ve benzer ko-morbid hastalıklara sahip SARS-CoV-2 RT-PCR testi negatif olan 50 yetişkin oluşturuldu. Klinik klavuzlarda COVID-19 tanılı hastaların klinik semptom ve bulguları baz alınarak hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak sınıflandırılmaktadır (Tingbo, 2020). Çalışma grubumuz bu şekilde sınıflandırılmış hastalardan elde edilmiş tam kan numunelerini içermektedir.

3.1.2. Araç ve gereçler

Kullanılan cihazlar ve laboratuvar araçları

- Santrifüj (Sigma k-15-1, Almanya)
- Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
- -20 °C Derin dondurucu (Uğur Derin Dondurucu, Türkiye)
- -80 °C Derin dondurucu (Jouan, Danimarka)
- +4 °C Soğutucu (Bosch, Almanya)
- 1, 5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Isolab, Almanya)
- Otomatik ayarlanabilir pipetler (Eppendorf, Almanya)
- qRT-PCR (LightCycler96, Roche Diagnostics GmbH Mannheim, Almanya)
- Distile su cihazı (Milli pore, Fransa)

Kullanılan kimyasallar

- Total mRNA izolasyon kiti - Sanprep column microRNA miniprep kit-SK8811 (Biobasic- New York, ABD)
- cDNA izolasyon kiti - OneScript Plus cDNA Synthesis Kit –G236 (Abm, Richmond, Canada)
- mRNA qPCR mastermix - BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix-G291 (Empirical Bioscience, Waltham, ABD)
- Referans Gen Primerleri
- Hedef RNA Primerleri

3.2. YÖNTEM

Hasta gruplarının kendi aralarında ve kontrol grubu ile GBP2 ve GBP5 ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması amaçlanmıştır. Bu amaçla hasta ve kontrol grubundan alınan numunelerde qRT-PCR yöntemi ile GBP2 ve GBP5 gen ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. Deneysel süreç genel olarak RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve hedef gen ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak analizini içermektedir.

3.2.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazır kit kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, hasta ve kontrol grubundan alınan her bir tam kan örneği 1,5 ml, RNaz içermeyen santrifüj tüpüne 0,5 ml antikoagülasyon ajanı eklendi. Oda sıcaklığında 2 dk bekletilen tüpler 10.000 x g'de santrifüjlenip süpernatant atıldı. Daha sonra 0,5 ml USS eklenen tüpler ters çevrilerek karıştırılmıştır. Karıştırılan tüp yine oda sıcaklığında 2 dk 10.000 x g'de santrifüjlenerek süpernatant atıldı. Süpernatant atıldıktan sonra 1 ml miRNAExtractor ekleyip, tekrar ters çevrilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edilen numuneler 0.2 ml kloroform eklenerek 30 saniye boyunca vortekslendi. Vortekslenen örnek 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüjlendi. Santrifüj işleminden sonra numunenin 3 faza ayrıldığı gözlemlendi. Üstteki RNA içeren renksiz faz (yaklaşık 540 µl) yeni bir santrifüj tüpüne aktarılıp absöü etanol eklenerek pipetaj yapıldı. Daha sonra Spin kolon TR'ye aktarılıp, 12.000 g'de 2 dk santrifüjlenip süzüntü kısmı atıldı. Spin kolona 0,5 ml RPE solüsyonu ekleyip, 12.000 g'de 30 saniye santrifüjlenip tekrar süzüntü kısmı atıldı. Daha sonra 5. adım bir kez daha tekrarlanmıştır. Elde edilen örnek 12.000 g'de 30 saniye boyunca santrifüjlendi. Daha sonra kolon yeni bir tüpe yerleştirilip üzerine 30-50 µl USS eklenerek 2 dakika bekletilmiş ve 30 saniye boyunca 12.000 g'de santrifüjlendi. Elde edilen RNA çözeltisi -80°C'de muhafaza edildi.

3.2.2. cDNA eldesi

cDNA eldesinde OneScript Plus cDNA sentez kiti kullanıldı (Tablo 3.1). Üretici firmanın önerileri doğrultusunda tüm örnekler için termal döngü şartları belirlendi. Sırasıyla 50-55°C'de 15 dk inkübasyon, 85°C'de 5 dk inkübasyon ve soğutma döngüsüyle cDNA sentezini gerçekleştirildi. Uygulanan protokol sonrasında elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. OneScript Plus cDNA sentez kit bileşenleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (μ l)
5X RT Buffer	4 μ L
dNTP	1 μ L
Primers	1 μ L
Toral RNA or poly(A) + mRNA	Değişken (1 ng- 2 μ L/rxn)
OnerScript Plus RTase	1 μ L
Nuklease- free H ₂ O	20 μ L ye kadar

3.3.3 Gen ekspresyonunun belirlenmesi

GBP2 ve GBP5 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonunun tespiti için qRT-PCR analizi yapıldı. Bunun için hazırlanan ön karışımda BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix-G291 (Empirical Bioscience, Waltham, ABD) kullanıldı (Tablo 3.2). Kullanılan primer dizileri (Tablo 3.3) ve bu primelerin özellikleri (Tablo 3.4) verilmiştir.

Tablo 3.2. GBP2 ve GBP5 proteinlerinin gen ekspresyon düzeyi ölçümü için PCR bileşenleri

Bileşenler	Örnek başına hacim (μ l)
BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix	10 ul
F-primer	0,6 ul
R-primer	0,6 ul
ddH ₂ O	3,8 ul
cDNA	5 ul
Toplam Hacim	21ul

Tablo 3.3. GBP2 ve GBP5 geninin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan primer dizileri

Primer	Forward	Revers
GBP2	CATCACTCCTGCCAAGTGGT	ACAGATCATGCAGCCTCCAC
GBP5	CATCACTCCTGCCAAGTGGT	ACAGATCATGCAGCCTCCAC

Tablo 3.4. GBP2 ve GBP5 genlerine ait primerlerin özellikleri

Primer Adı	Ürün boyutu (bç)	Tm (°C)	% GC	Primer Uzunluğu	
GBP2	129	F	59,96	55.00	20
		R	60,11	55.00	20
GBP5	175	F	59,87	47.62	21
		R	59,96	50.00	20

Her örneğe ait elde edilen cDNA, Tablo 3.5'te verilen bileşimleri içeren karışımla birlikte tüplere eklendi. GBP2 ve GBP5 ekspresyon düzeyinin ölçülebilmesi için Tablo 3.6'da verilen koşullar sağlandıktan sonra qRT-PCR reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3.5. GBP2 ekspresyon düzeyinin ölçüldüğü qRT-PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denaturasyon	95°C	180 sn	
Amplifikasyon	95°C	10 sn.	45
	59°C	30 sn	
	72 °C	5 sn	
Erime Eğrisi	95°C	10 sn	
	65 °C	60 sn	
	97 °C		
Soğuma	37 °C	30 sn	

Tablo 3.6. GBP5 ifade düzeyinin ölçüldüğü qRT-PCR ayarları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denaturasyon	95°C	180 sn	
Amplifikasyon Bu döngü 45 kez sağlanır. (45 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi)	95°C	10 sn.	45
	57°C	30 sn	
	72 °C	5 sn	
Erime Eğrisi	95°C	10 sn	
	65 °C	60 sn	
	97 °C		
Soğuma	37 °C	30 sn	

3.3.4 Verilerin analizi

Her hasta örneği için referans ve hedef Ct değerleri hesaplandı. Elde edilen Ct değerleri kullanılarak göreceli fold change analizi yapıldı. Ekspresyon düzeyleri arasındaki grup farklarının istatistiksel analizi için Graphpad Prism 9 Yazılım programı tercih edildi. GBP2 ve GBP5 proteinleri için her biri kendi içinde farklı hasta grupları arasında yapılan analizlerde prognoza ait bağımsız örneklem tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Analiz edilen tüm değerler için $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi. Daha sonra elde edilen veriler tablo halinde ifade edildi.





4.BULGULAR

Çalışmaya klinik kılavuzlar doğrultusunda COVID-19 tanılı hastaların klinik semptom ve bulguları baz alınarak hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak sınıflandırılan 150 COVID-19 olgusu (76 kadın, 74 erkek) ve COVID-19 olmayan 50 kontrol dahil edildi.

COVID-19 tanılı farklı prognoza sahip hasta gruplarından alınan kan örneklerinde GBP2 geninin mRNA düzeyinde ekspresyonu için qRT-PCR analizi yapıldı. GBP2 ce GBP5 geninin qRT-PCR sonuçları, birinci adım Ct değeri ölçüldü. Bu iki hedef gene ait CT verileri GAPDH geni ile normalize edildi ve kat değişiminin hesaplanması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Tablo 4.1) formülü kullanıldı.

4.1. GBP2 Bulguları

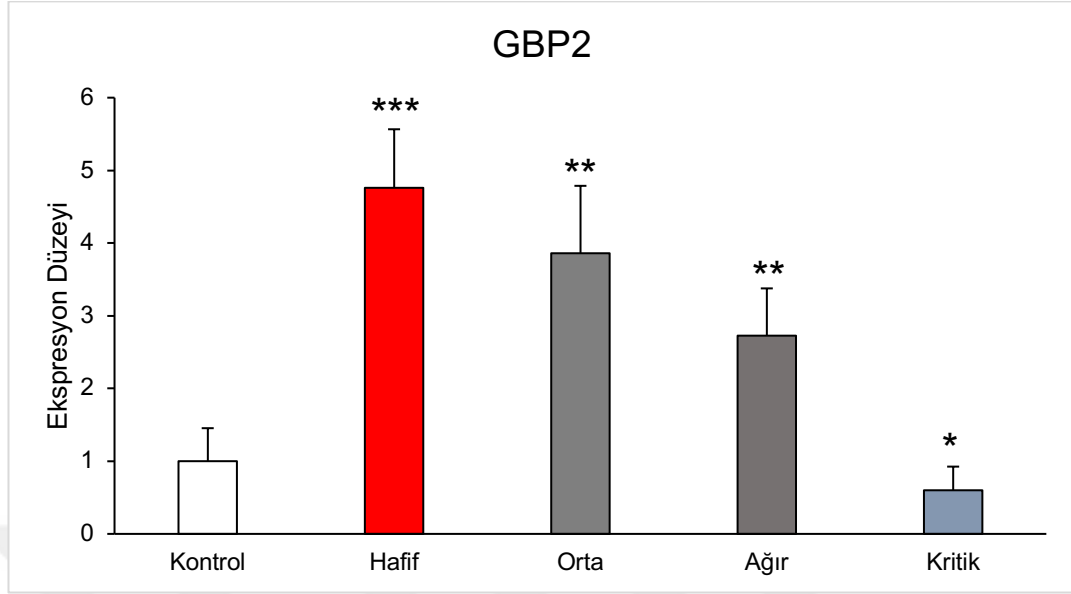
GBP2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi açısından hasta gruplarına göre istatistiksel olarak ($p=0,001$) anlamlı bir dağılım sergiledi. GBP2 geninin ekspresyon düzeyi hafif, orta, ağır ve kritik hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyinin hastalığın şiddetiyle ters orantılı (Tablo 4.1, Şekil 4.1) olduğu gözlemlendi.

GBP2 ekspresyon düzeyi ile hastalığın şiddeti arasında korelasyon olduğu görüldü. COVID-19 tanılı farklı prognoz sergileyen hastalarda GBP2 geninin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi.

Tablo 4.1. Referans gen GAPDH'ye göre GBP2 geninin ekspresyonundaki kat değişimi

Hasta Gurupları	GAPDH Ct	GBP2Ct	DCt (Avg. GBP2- Avg. GAPDH)	DDCt (Avg. DCt - Avg. DCt control \pm SD)	Normalized GBP2 mRNA expression relative to control $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$ SD (min, max)
Kontrol	22.81	30.08	7,27	0	1
Hafif	23,20	28,22	5,02	-2,25	4,76
Orta	23,55	29,37	5,32	-1,95	3,86
Ağır	23,26	29,08	5,82	-1,45	2,73
Kritik	23,23	31,10	7,87	0,6	0,66
Toplam Hasta	23.30	29.40	6,1	-1,17	2,25

GBP 2	Mean	SD
Kontrol	1,00	0,453959
Hafif	4,76	0,805402
Orta	3,86	0,927376
Ağır	2,73	0,650211
Kritik	0,6	0,325459



Şekil 4.1. GBP2 ekspresyon düzeyinin farklı prognoz gruplarındaki dağılımı

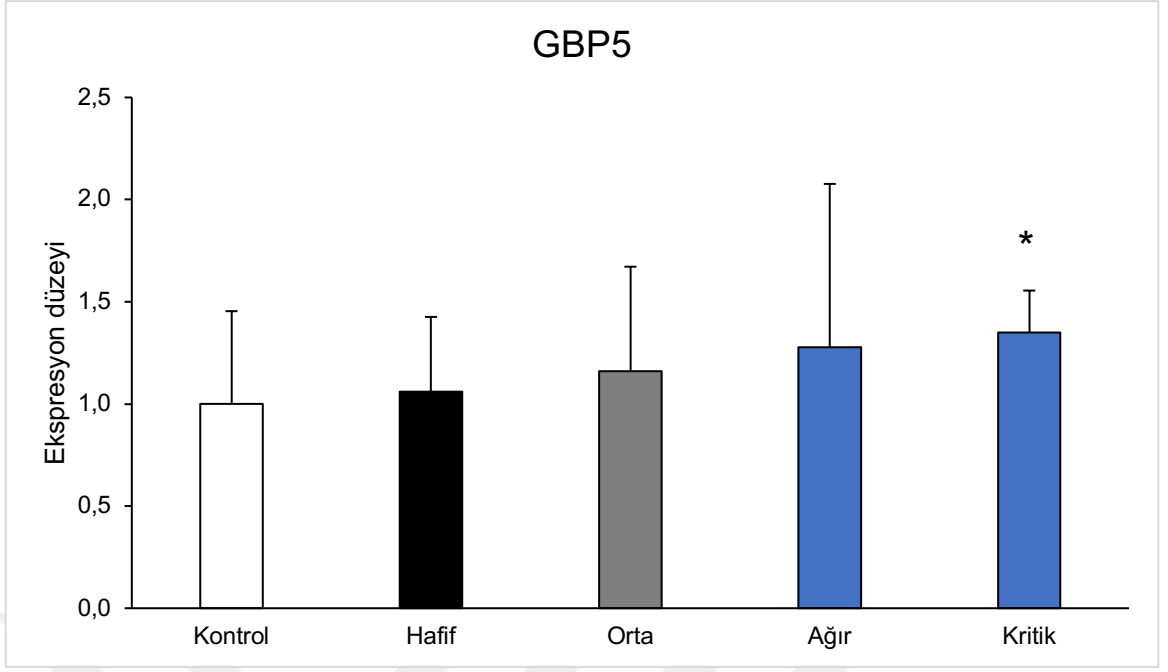
4.2. GBP5 Bulguları

Hafif, orta, ağır ve kritik hasta grupları arasında karşılaştırıldığında GBP5 geninin ekspresyon düzeyinin farklı oranlara sahip (Tablo 4.2, Şekil 4.2) olduğu gözlemlendi. Sadece kritik hasta grubunda GBP5 geninin ekspresyon düzeyinin ılımlı bir artış olduğu görüldü.

Tablo 4.2. Referans gen GAPDH'ye göre GBP5 geninin ekspresyonundaki kat değişimi

Hasta Gurupları	GAPDH Ct	GBP5 Ct	DCt (Avg. GBP5- Avg. GAPDH)	DDCt (Avg. DCt - Avg. DCt control \pm SD)	Normalized GBP5 mRNA expression relative to control $2^{-\Delta\Delta CT} \pm$ SD (min, max)
Kontrol	22,81	37,31	14,50	0	1
Hafif	23,20	37,62	14,42	-0,08	1,06
Orta	23,55	37,84	14,29	-0,21	1,16
Ağır	23,26	37,40	14,14	-0,36	1,28
Kritik	23,23	37,30	14,07	-0,43	1,35
Toplam Hasta	23,30	37,55	14,25	-0,25	1,19

GBP5	Mean	SD
Kontrol	1,00	0,453959
Hafif	1,06	0,365772
Orta	1,16	0,511557
Ağır	1,28	0,800459
Kritik	1,35	0,204867



Şekil 4.2. GBP5 ekspresyon düzeyinin farklı prognoz gruplarındaki dağılımı



5.TARTIŞMA

COVID-19, salgının başlangıcından itibaren her yaş grubundaki insanı etkiledi. Enfekte olan çoğu kişide hafif ila orta derecede semptomlar görülmekte olmasına karşın altta yatan hastalığı olan 60 yaş üstü bireylerde ölüm riski oluşturdu. Hastalık dünya çapında hızla yayıldı ve milyonlarca insanın ölümüne yol açtı. Bu dramatik durum, etkenin genomik ve morfolojik özelliklerini, hastalığın patogenezi ve bulaş dinamiklerini ayrıntılı şekilde ortaya çıkararak etkili aşuların ve ilaçların geliştirilmesini zorunlu kıldığından tüm dünyada bu bağlamda yoğun çalışmalar yapıldı(W. Khan, Khan, vd., 2023)

COVID-19'in patogenezi, virüsün konak hücreye girişi ve viral replikasyon, hücresel istila, doğal immün yanıt, inflamasyon ve edinsel immün yanıt olmak üzere bir dizi karmaşık süreci içermektedir(Lee vd., 2022). COVID-19 patogenezi hala aydınlatılmamış pek çok kısım vardır. Bunların başında immün sistemin patojenezdeki rolü gelmektedir(Ezzikouri vd., 2020)

Doğal antiviral yanıtın güçlü ve en önemli komponentlerinden olan interferonlar, interferonla uyarılan geni (ISG) up-regüle etmektedir. Bu genlerin ürünlerinin pek çok işlevi bulunmaktadır ve esas olarak viral replikasyon döngüsünün her adımında yer alırlar. Bu ISG'ler arasında guanilat bağlayıcı proteinler (GBP) başı çeker. GBP'ler, antijenik moleküllere yanıt olarak indüklenen immün GTPaz'lardır. Covid-19 hastalığının seyri, bireysel farklılıklar ve değişken immün-dinamikler dikkate alındığında; GBP'lerin bu hastalığa yakalanan bireylerdeki hastalığın patogenezi ve prognozunda rol alan kritik bir faktör olduğu anlaşılmaktadır (Ulinici vd., 2021). Yapılan çalışmalarda viral enfeksiyonların GBP'lerin ekspresyonunu artırıcı etki gösterdiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, inflamatuvar aktivasyonu düzenleyici rolü olduğu da ortaya konmuştur (Kutsch & Coers, 2021). Literatürde GBP'ler ile ilgili viral enfeksiyonlar ya da daha farklı alanlarda klinik çalışmalar mevcut olmasına rağmen GBP'lerin COVID-19 prognozu üzerine etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmamızda COVID-19 hastalarındaki GBP2 ve GBP5'in ekspresyon düzeylerinin prognoza etkilerini incelenmiştir.

GBP'lerin tümör nekrozundan antimikrobiyal işlevlere kadar çok sayıda fizyolojik role sahip olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Örneğin bir araştırmada (Kutsch & Coers, 2021) patojen vakuolünün parçalanması ve inflamazomun aktivasyonunda mekanik rolleri olduğu tespit edilmiştir. GBP'lerin virüs enfeksiyonunda interferon ve inflamatuvar

aktivasyonun düzenleyici rolüne ilişkin, fare makrofaj RAW hücrelerinde Gbp1'in susturulmasını içeren bir çalışmada, DENV yüklerinde artış, NF- κ B aktivasyonunda bir bozulma, IFN β ve IL6 salgılanmasında ise azalma olduğu rapor edilmiştir(Chhabra vd., 2022). Başka bir çalışmada ciddi Dang humması hastalarının plazma numunelerinde Gbp1 ve GBP2 ekspresyon seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Dolayısıyla GBP1 ve GBP2'nin ekspresyon düzeylerinin Dang humması patogenezindeki önemi vurgulanmıştır (Mariappan vd., 2023). Ayrıca başka bir çalışmada benzer şekilde, GBP5'in aşırı ekspresyonunun sırasıyla, IAV virüsünün replikasyonunu kısıtladığı, influenza hastalarında ise IFN ve NF- κ B sinyal yolunun aktive edildiği rapor edilmiştir(Pan vd., 2012)

GBP'ler viral enfeksiyonlarda viral RNA/protein sentezinin engellenmesi, viral zarf glikoproteininin işlenmesinin bloke edilmesi ve viral proteinin degradasyon için hedeflenmesi gibi çeşitli roller üstlenmektedir (Kutsch & Coers, 2021). GBP'lerin antiviral rolüne ilişkin Chhabra ve Kalia tarafından yapılan kapsamlı bir araştırmada GBP1'in GTPaz aktivitesi, dimer oluşturma yeteneği ve virüs kaynaklı bağışıklık yanıt sonucu virüslerin replikasyonunu kısıtladığı tespit edilmiştir(Zou vd., 2017) Bununla birlikte yapılan başka bir çalışma da ise GBP1'in aşırı ekspresyonunun, İnfluenza A virüsü (IAV), klasik domuz ateşi virüsü (CSFV), domuz üreme ve solunum sendromu virüsü (PRRSV), Şap hastalığı virüsü (FMDV), Vesiküler stomatit virüsü (VSV), Ensefalomiyokardit virüsü (EMCV), Hepatit C virüsü (HCV), Dang virüsü (DENV) gibi RNA virüslerinin replikasyonunu azalttığı bildirilmiştir(Ostler vd., 2014). Nordmann ve arkadaşları tarafından 2012 de GBP3 ile ilgili yapılan bir çalışma da ise, proteinin viral polimeraz kompleksinin aktivitesini inhibe ederek IAV enfeksiyonunu baskıladığı bildirilmiştir. GBP3 ayrıca IFN γ aracılı indüksiyonu takiben LC3 ve interferon ile indüklenebilir GTPaz'ların Murine Norovirus (MNV) replikasyon kompleksi ile etkileşime girerek virüsün replikasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir (Nordmann et al., 2012).

GBP'lerin viral replikasyon üzerindeki önleyici etkileri olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmaktadır (Kirkby vd., 2023). Bu verilerle birlikte GBP'lerin virüsün enfektivitesi için gerekli olan zarf proteinlerinin furin aracılı işlenmesi gibi önemli viral süreçleri etkilediğini göstermiştir(D. ;Ann-K. R. Mesner vd., 2019). Araştırmamıza konu olan GBP2 ve GBP5'e dair yapılan bazı çalışmalarda, bu iki proteinin viral enfeksiyonun prognozunda anahtar rol oynadığı vurgulanmaktadır(D. Mesner vd., 2023) Braun ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da GBP2 ve GBP5 hücrel proteaz FURIN'in aktivitesini inhibe ederek virüsün hem olgunlaşmasını hem de olgun viryon partikülünün işlenmesini bozduğu belirtilmiştir(Braun vd.,

2019). Başka bir çalışmada ise GBP5'in, Env'in glikozilasyon sürecini hedefleyerek viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir(Krapp vd., 2016). Ayrıca GBP5'in Golgide lokalize olduğu, Env glikoproteini gp120'nin N-bağlı glikozilasyonunu engelleyerek yüzey ekspresyonunun ve virüs enfektivitesinin azalmasına yol açtığı Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma da rapor edilmiştir (Z. Li vd., 2020)

COVID-19 salgını sırasında yapılan bir araştırmada ise, GBP2 ve GBP5'in, furin aracılı spike protein bölünmesini bozarak erken nesil SARS-CoV-2 suşları Wuhan-Hu-1 ve VIC'nin neden olduğu enfeksiyonu önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir. Bununla birlikte SARS-CoV-2'nin Alfa ve Delta suşları, GBP aracılı inhibisyondan kaçacak mekanizmalar geliştirdiği rapor edilmiştir (D. Mesner vd., 2023)GBP5 ayrıca RSV SH proteininin mikro partiküllere hücre dışı salınımının artırılmasıyla da ilişkilendirilerek virüs replikasyonunun kısıtlanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Z. Li vd., 2020). Bu bulgular, golgide lokalize GBP2 ve GBP5'in çeşitli viral proteinleri modüle etmede ve virionların oluşumunu engellemedeki kritik rolünü vurgulamaktadır (Kirkby et al., 2023).

Yapılan çalışmalar viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıt mekanizmalarında GBP'lerin üstlendiği rolün anlaşılmasının önemini göstermektedir. Bizim çalışmamızda GBP2 ekspresyon düzeyi ile klinik prognoz şiddeti arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Ekspresyon en az kritik hastalarda gözlemlenirken hastalık şiddetinin azalmasıyla doğru orantılı olarak gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu verilerle birlikte COVID-19 tanılı farklı prognoz sergileyen hastalarda GBP2 geninin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Ortaya çıkan sonuca göre GBP2'nin ekspresyon düzeylerinin COVID-19'un patogenezinde rol oynadığı tahmin edilmektedir. Dolayısıyla çalışmamız, GBP 2'nin COVID-19enfeksiyonuna karşı konakçı direncine katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmamıza konu olan diğer bir protein olan GBP5'in, hafif, orta, ağır ve kritik hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, kritik hasta grubundaki ılımlı artış dışında ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Çalışmamız da ortaya çıkan bulgular, GBP2 ve 5'in gen ekspresyon düzeylerindeki değişimin COVID-19'un seyrindeki potansiyel etkilerini ortaya koymaktadır. Bu durumun COVID-19'un teşhisi ve tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi gibi klinik yaklaşımlara yardımcı olabileceği öngörülmektedir. İlgili proteinlerin COVID-19'un patogenezindeki rolünü tam olarak anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Çalışmamızda GBP2 ve GBP5 gen ekspresyon düzeylerinin COVID-19 prognozuna etkisi araştırdık. Bu çalışmaya, COVID-19 tanılı 150 hasta ve benzer ko-morbid hastalıklara sahip COVID-19 testi negatif olan 50 yetişkin oluşturmuştur. COVID-19 tanılı hastaların klinik semptom ve bulguları baz alınarak hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak sınıflandırılmıştır. Hasta gruplarının kendi aralarında ve kontrol grubu ile GBP2 ve GBP5 ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması yapılmıştır. GBP2 geninin mRNA ekspresyon düzeyi açısından hasta gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir dağılım sergilediği tespit edilmiştir. GBP2 geninin ekspresyon düzeyi hafif hastalarda en fazla ekspe, orta, ağır ve kritik hasta grupları arasında karşılaştırıldığında, ekspresyon düzeyinin hastalığın klinik prognozunun şiddetiyle doğru orantılı olduğu gözlemlenmiştir. Hafif, orta, ağır ve kritik hasta grupları arasında karşılaştırıldığında GBP5 geninin ekspresyon düzeyinin farklı oranlara sahip olduğu tespit edilmiştir. Sadece kritik hasta grubunda GBP5 geninin ekspresyon düzeyinin ılımlı bir artış olduğu görülmüştür.

6.2. Öneriler

Araştırmamızda analiz ettiğimiz örnekler hatalardan tek zamanlı olarak ve hastada n hastaya değişecek biçimde enfeksiyonun farklı evrelerinden elde edilmiştir ve enfeksiyon sürecini tam olarak gözlemleyebilecek çoklu ölçümler içermemektedir. Bu durum GBP'lerin enfeksiyon süresince oynadıkları rolün tam olarak açıklanabilmesi açısından araştırmamızın kısıtlayıcı yönü olarak değerlendirilmiştir.

GBP2 ve GBP5'in gen ekspresyon düzeyindeki farklılıklardan dolayı bu genlerin COVID-19 prognozu üzerinde etkisi olabileceğine dair kuvvetli ipuçları elde edilmiştir. Çalışmamız ile GBP2 ve GBP5'in gen ekspresyon düzeylerinde ortaya çıkarılan fotoğraf ile bu proteinlerin COVID-19'un seyirindeki potansiyel etkisi ortaya çıkarıldığı düşünülmektedir. Bu yeni bilgiler ışığında, sadece Covid-19 için değil diğer viral enfeksiyonlar için de yeni bir perspektifin çıkacağını ümit etmekteyiz. Ayrıca, COVID-19 ve benzeri viral hastalıklar için bu proteinlerin COVID-19'un patogenezindeki rolünü tam olarak anlamak, hastalığın teşhisi ve terapötik stratejileri için yeni yöntemlerin geliştirilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



7. KAYNAKLAR

- Al-Osail, A. M., & Al-Wazzah, M. J. (2017). The history and epidemiology of Middle East respiratory syndrome corona virus. İçinde *Multidisciplinary Respiratory Medicine* (C. 12, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s40248-017-0101-8>
- Artika, I. M., Dewantari, A. K., & Wiyatno, A. (2020). Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. İçinde *Heliyon* (C. 6, Sayı 8). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04743>
- Bai, C., Zhong, Q., & Gao, G. F. (2022). Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins. *Science China Life Sciences*, 65(2), 280-294. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-1964-4>
- Berry, M., Gamielien, J., & Fielding, B. (2015). Identification of New Respiratory Viruses in the New Millennium. *Viruses*, 7(3), 996-1019. <https://doi.org/10.3390/v7030996>
- Bhoyar, R. C., Jain, A., Sehgal, P., Divakar, M. K., Sharma, D., Imran, M., et al. (2021). High throughput detection and genetic epidemiology of SARS-CoV-2 using COVIDSeq next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247115>
- Bloom, J. S., Jones, E. M., Gasperini, M., Lubock, N. B., Sathe, L., Munugala, C., et al. (2020). Swab-Seq: A high-throughput platform for massively scaled up SARS-CoV-2 testing. *medRxiv: the preprint server for health sciences*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.20167874>
- Braun, E., Hotter, D., Koepke, L., Zech, F., Groß, R., Sparrer, K. et al. (2019). Guanylate-Binding Proteins 2 and 5 Exert Broad Antiviral Activity by Inhibiting Furin-Mediated Processing of Viral Envelope Proteins. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.063>
- Butiuc-Keul, A., Farkas, A., Carpa, R., & Iordache, D. (2022). CRISPR-Cas System: The Powerful Modulator of Accessory Genomes in Prokaryotes. İçinde *Microbial Physiology* (C. 32, Sayı 1-2). <https://doi.org/10.1159/000516643>
- Cao, Y., Yang, R., Wang, W., Jiang, S., Yang, C., et al. (2022). Probing the formation, structure and free energy relationships of M protein dimers of SARS-CoV-2. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 573-582. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.01.007>
- Chai, J., Cai, Y., Pang, C., Wang, L., McSweeney, S., Shanklin, J., & Liu, Q. (2021). Structural basis for SARS-CoV-2 envelope protein recognition of human cell junction protein PALS1. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23533-x>
- Chan, J. F. W., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K. W., Chu, H., Yang, J., Xing, F., Liu, J., et al. (2020). A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. *The Lancet*, 395(10223). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30154-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30154-9)
- Chau, C. H., Strobe, J. D., & Figg, W. D. (2020). COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy*, 40(8). <https://doi.org/10.1002/phar.2439>
- Chen, N., Zhou, M., Dong, X., Qu, J., Gong, F., Han, Y., Qiu, Y., Wang, J., Liu, Y., Wei, Y., Xia, J., Yu, T., Zhang, X., & Zhang, L. (2020). Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*, 395(10223). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
- Chhabra, S., & Kalia, M. (2023). Guanylate-binding proteins in virus infection. İçinde *Biochemical Society Transactions* (C. 51, Sayı 4). <https://doi.org/10.1042/BST20221500>
- Chhabra, S., Sharma, K. B., & Kalia, M. (2022). Human Guanylate-Binding Protein 1 Positively Regulates Japanese Encephalitis Virus Replication in an Interferon Gamma Primed Environment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.832057>
- Collins, L. T., Elkholy, T., Mubin, S., Hill, D., Williams, R., Ezike, K., & Singhal, A. (2021). Elucidation of SARS-Cov-2 Budding Mechanisms through Molecular Dynamics Simulations of M and E Protein Complexes. *Journal of Physical Chemistry Letters*, 12(51). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.1c02955>
- Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., et al. (2020). Nucleocapsid Protein Recruitment to Replication-Transcription Complexes Plays a Crucial Role in Coronaviral Life Cycle. *Journal of Virology*, 94(4). <https://doi.org/10.1128/jvi.01925-19>
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. İçinde *Nature Reviews Microbiology* (C. 17, Sayı 3). <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., et al. (2013). Commentary: Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV): Announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of Virology*, 87(14). <https://doi.org/10.1128/jvi.01244-13>
- Dhamad, A. E., & Abdal Rhida, M. A. (2020). COVID-19: Molecular and serological detection methods. *PeerJ*, 8. <https://doi.org/10.7717/peerj.10180>
- Dutta, N. K., Mazumdar, K., & Gordy, J. T. (2020). The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development. *Journal of Virology*, 94(13). <https://doi.org/10.1128/jvi.00647-20>
- Ernst, E., Wolfe, P., Stahura, C., & Edwards, K. A. (2021). Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2. İçinde *Talanta* (C. 224). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121883>
- Ezzikouri, S., Nourlil, J., Benjelloun, S., Kohara, M., & Tsukiyama-Kohara, K. (2020). Coronavirus disease 2019—Historical context, virology, pathogenesis, immunotherapy, and vaccine development. İçinde *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (C. 16, Sayı 12). <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1787068>
- Fabricant, J. (1998). The early history of infectious bronchitis. İçinde *Avian Diseases* (C. 42, Sayı 4). <https://doi.org/10.2307/1592697>
- Fang, P., Fang, L., Zhang, H., Xia, S., & Xiao, S. (2021). Functions of coronavirus accessory proteins: Overview of the state of the art. *Viruses*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/v13061139>
- Fehr, A. R., & Perlman, S. (2015). Coronaviruses: An overview of their replication and pathogenesis. İçinde *Coronaviruses: Methods and Protocols*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Feng, J., Cao, Z., Wang, L., Wan, Y., Peng, N., et al. (2017). Inducible GBP5 Mediates the Antiviral Response via Interferon-Related Pathways during Influenza A Virus Infection. *Journal of Innate Immunity*, 9(4). <https://doi.org/10.1159/000460294>
- Forni, D., Cagliani, R., Clerici, M., & Sironi, M. (2017). Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes. İçinde *Trends in Microbiology* (C. 25, Sayı 1). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.001>
- Glatter, K. A., & Finkelman, P. (2021). History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. İçinde *American Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.019>
- Han, Y., & Yang, H. (2020). The transmission and diagnosis of 2019 novel coronavirus infection disease (COVID-19): A Chinese perspective. *Journal of Medical Virology*, 92(6). <https://doi.org/10.1002/jmv.25749>
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. İçinde *Trends in Immunology* (C. 41, Sayı 12). <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- He, L., Ding, Y., Zhang, Q., Che, X., He, Y., Shen, H., et al. (2006). Expression of elevated levels of pro-inflammatory cytokines in SARS-CoV-infected ACE2⁺ cells in SARS patients: relation to the acute lung injury and pathogenesis of SARS. *The Journal of Pathology*, 210(3), 288-297. <https://doi.org/10.1002/path.2067>
- Hotter, D., Sauter, D., & Kirchhoff, F. (2017). Guanylate binding protein 5: Impairing virion infectivity by targeting retroviral envelope glycoproteins. İçinde *Small GTPases* (C. 8, Sayı 1). <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1189990>
- Huang, Y. W., Dickerman, A. W., Piñeyro, P., Li, L., Fang, L., Kiehne, R., et al. (2013). Origin, evolution, and genotyping of emergent porcine epidemic diarrhea virus strains in the united states. *mBio*, 4(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00737-13>
- Hurtado-Tamayo, J., Requena-Platek, R., Enjuanes, L., Bello-Perez, M., & Sola, I. (2023). Contribution to pathogenesis of accessory proteins of deadly human coronaviruses. İçinde *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (C. 13). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1166839>
- Jin, Y., Yang, H., Ji, W., Wu, W., Chen, S., Zhang, W., & Duan, G. (2020). Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of covid-19. İçinde *Viruses* (C. 12, Sayı 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v12040372>
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. İçinde *Journal of Basic Microbiology*. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>

- Khan, M. T., Irfan, M., Ahsan, H., Ahmed, A., Kaushik, A. C., Khan, A. S., et al. (2021). Structures of SARS-CoV-2 RNA-Binding Proteins and Therapeutic Targets. İçinde *Intervirology* (C. 64, Sayı 2). <https://doi.org/10.1159/000513686>
- Khan, W., Ahmad, U., Ali, M., Masood, Z., Sarwar, S., Hamidullah, Sabir, M., et al. (2023). The 21st century disaster: The COVID-19 epidemiology, risk factors and control. *Journal of King Saud University - Science*, 35(4). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2023.102603>
- Khan, W., Khan, A. A., Khan, J., Khatoon, N., Arshad, S., & De los Ríos Escalante, P. (2023). Death caused by covid-19 in top ten countries in asia affected by covid-19 pandemic with special reference to Pakistan. *Brazilian Journal of Biology*, 83. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.248281>
- Kirkby, M., Enosi Tuipulotu, D., Feng, S., Lo Pilato, J., & Man, S. M. (2023). Guanylate-binding proteins: mechanisms of pattern recognition and antimicrobial functions. İçinde *Trends in Biochemical Sciences* (C. 48, Sayı 10). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.07.002>
- Krapp, C., Hotter, D., Gawanbacht, A., McLaren, P. J., Kluge, S. F., et al. (2016). Guanylate Binding Protein (GBP) 5 Is an Interferon-Inducible Inhibitor of HIV-1 Infectivity. *Cell Host and Microbe*, 19(4). <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.02.019>
- Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., et al. (2003). A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 348(20), 1953-1966. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030781>
- Kutsch, M., & Coers, J. (2021). Human guanylate binding proteins: nanomachines orchestrating host defense. İçinde *FEBS Journal* (C. 288, Sayı 20). <https://doi.org/10.1111/febs.15662>
- Lamers, M. M., & Haagmans, B. L. (2022). SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 270-284. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>
- Lee, S. J., Kim, Y.-J., & Ahn, D.-G. (2022). Distinct Molecular Mechanisms Characterizing Pathogenesis of SARS-CoV-2. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(9), 1073-1085. <https://doi.org/10.4014/jmb.2206.06064>
- Li, L., Huang, Q., Wang, D. C., Ingbar, D. H., & Wang, X. (2020). Acute lung injury in patients with COVID-19 infection. *Clinical and Translational Medicine*, 10(1). <https://doi.org/10.1002/ctm2.16>
- Li, Z., Qu, X., Liu, X., Huan, C., Wang, H., Zhao, Z., Yang, X., Hua, S., & Zhang, W. (2020). GBP5 Is an Interferon-Induced Inhibitor of Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 94(21). <https://doi.org/10.1128/jvi.01407-20>
- Maier, H. E., Kuan, G., Saborio, S., Bustos Carrillo, F. A., Plazaola, M., et al. (2021). Clinical spectrum of SARS-CoV-2 infection and protection from symptomatic re-infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.
- Mariappan, V., Adikari, S., Shanmugam, L., Easow, J. M., & Balakrishna Pillai, A. (2023). Differential expression of interferon inducible protein: Guanylate binding protein (GBP1 & GBP2) in severe dengue. *Free Radical Biology and Medicine*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.037>
- McIntosh, K. (2005). Coronaviruses in the Limelight. *The Journal of Infectious Diseases*, 191(4), 489-491. <https://doi.org/10.1086/428510>
- Merad, M., Blish, C. A., Sallusto, F., & Iwasaki, A. (2022). The immunology and immunopathology of COVID-19. İçinde *Science* (C. 375, Sayı 6585). <https://doi.org/10.1126/science.abm8108>
- Meskini, M., Rezghi Rami, M., Maroofi, P., Ghosh, S., Siadat, et al. (2021). An Overview on the Epidemiology and Immunology of COVID-19. İçinde *Journal of Infection and Public Health* (C. 14, Sayı 10, ss. 1284-1298). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.07.021>
- Mesner, D., Reuschl, A.-K., Whelan, M. V. X., Bronzovich, T., Haider, T., et al. (2023). SARS-CoV-2 evolution influences GBP and IFITM sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.2212577120>
- Mesner, D. ;Ann-K. R., Whelan, M. V. X., Tafhima, T. B., Haider, Thorne1, L. G., & Greg J. Towers and Clare Jolly. (2019). *SARS-CoV-2 Spike evolution influences GBP and IFITM sensitivity*. 9-25.
- Meunier, E., Wallet, P., Dreier, R. F., Costanzo, S., Anton, L., Rühl, S., et al. (2015). Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nature Immunology*, 16(5). <https://doi.org/10.1038/ni.3119>

- Mohsen, M. O., Augusto, G., & Bachmann, M. F. (2020). A Comprehensive Review of Vaccines against Covid-19. *Immunological Reviews*, 296(1), 155-168. <https://doi.org/10.1111/imr.12863>
- Naschberger, E., Lubeseder-Martellato, C., Meyer, N., Gessner, R., Kremmer, E., Gessner, A., & Stürzl, M. (2006). Human guanylate binding protein-1 is a secreted GTPase present in increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *American Journal of Pathology*, 169(3). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060244>
- Neuman, B. W., Kiss, G., Kunding, A. H., Bhella, D., Baksh, M. F., et al. (2011). A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *Journal of Structural Biology*, 174(1). <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>
- Nordmann, A., Wixler, L., Boergeling, Y., Wixler, V., & Ludwig, S. (2012). A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication. *The FASEB Journal*, 26(3). <https://doi.org/10.1096/fj.11-189886>
- Ostler, N., Britzen-Laurent, N., Liebl, A., Naschberger, E., Lochnit, G., et al. (2014). Gamma Interferon-Induced Guanylate Binding Protein 1 Is a Novel Actin Cytoskeleton Remodeling Factor. *Molecular and Cellular Biology*, 34(2). <https://doi.org/10.1128/mcb.00664-13>
- Pan, W., Zuo, X., Feng, T., Shi, X., & Dai, J. (2012). Guanylate-binding protein 1 participates in cellular antiviral response to dengue virus. *Virology Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-292>
- Praefcke, G. J. K. (2018). Regulation of innate immune functions by guanylate-binding proteins. İçinde *International Journal of Medical Microbiology* (C. 308, Sayı 1). <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.10.013>
- Rando, H. M., MacLean, A. L., Lee, A. J., Lordan, R., Ray, S., Bansal, V., Skelly, A. N., et al. (2021). Pathogenesis, Symptomatology, and Transmission of SARS-CoV-2 through Analysis of Viral Genomics and Structure. *mSystems*, 6(5). <https://doi.org/10.1128/msystems.00095-21>
- Ravi, V., Saxena, S., & Panda, P. S. (2022). Basic virology of SARS-CoV 2. İçinde *Indian Journal of Medical Microbiology* (C. 40, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2022.02.005>
- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. İçinde *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.708264>
- Rong, G., Zheng, Y., Chen, Y., Zhang, Y., Zhu, P., & Sawan, M. (2022). COVID-19 Diagnostic Methods and Detection Techniques. İçinde *Encyclopedia of Sensors and Biosensors: Volume 1-4, First Edition* (C. 1-4). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822548-6.00080-7>
- Rotondo, J. C., Martini, F., Maritati, M., Caselli, E., Gallenga, C. E., et al. (2022). Advanced Molecular and Immunological Diagnostic Methods to Detect SARS-CoV-2 Infection. İçinde *Microorganisms* (C. 10, Sayı 6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10061193>
- Safa, A., Nair, G. B., & Kong, R. Y. C. (2010). Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. İçinde *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
- Safiabadi Tali, S. H., LeBlanc, J. J., Sadiq, Z., Oyewunmi, O. D., Camargo, C., et al. (2021). Tools and techniques for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)/COVID-19 detection. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3). <https://doi.org/10.1128/CMR.00228-20>
- Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2021). Product of natural evolution (SARS, MERS, and SARS-CoV-2); deadly diseases, from SARS to SARS-CoV-2. İçinde *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1797369>
- Shen, M., Zhou, Y., Ye, J., Abdullah AL-maskri, A. A., Kang, Y., Zeng, S., et al. (2020). Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. İçinde *Journal of Pharmaceutical Analysis* (C. 10, Sayı 2). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
- Shenoy, A. R., Wellington, D. A., Kumar, P., Kassa, H., Booth, C. J., et al. (2012). GBP5 Promotes NLRP3 inflammasome assembly and immunity in mammals. *Science*, 336(6080). <https://doi.org/10.1126/science.1217141>
- Singh, D., & Yi, S. V. (2021). On the origin and evolution of SARS-CoV-2. İçinde *Experimental and Molecular Medicine* (C. 53, Sayı 4). <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00604-z>
- Smith, G. J. D., Vijaykrishna, D., Bahl, J., Lycett, S. J., Worobey, et al. (2009). Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08182>

- Surjit, M., Kumar, R., Mishra, R. N., Reddy, M. K., Chow, V. T. K., & Lal, S. K. (2005). The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein Is Phosphorylated and Localizes in the Cytoplasm by 14-3-3-Mediated Translocation. *Journal of Virology*, 79(17). <https://doi.org/10.1128/jvi.79.17.11476-11486.2005>
- Tingbo, L. (2020). Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. *Handbook of Covid-19, Prevention and Treatment*.
- Ulinici, M., Covantev, S., Wingfield-Digby, J., Beloukas, A., Mathioudakis, A. G., & Corlateanu, A. (2021). Screening, diagnostic and prognostic tests for COVID-19: A comprehensive review. İçinde *Life* (C. 11, Sayı 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/life11060561>
- Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., et al. (2020). Immunology of COVID-19: Current State of the Science. İçinde *Immunity* (C. 52, Sayı 6, ss. 910-941). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.002>
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. İçinde *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(11). <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, L., & Xiang, Y. (2020). Spike glycoprotein-mediated entry of sars coronaviruses. İçinde *Viruses* (C. 12, Sayı 11). <https://doi.org/10.3390/v12111289>
- WHO. (2020). Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays Interim guidance, 11 September 2020. *World Health Organization, September*.
- WHO. (2021a). MERS Situation Update 2021. *Disease outbreak news, May*, 22765492. <http://www.emro.who.int/health-topics/mers-cov/mers-outbreaks.html>
- WHO. (2021b). Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS). *Sars*. https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1
- WHO. (2021c). *Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)*. *Sars*. https://www.who.int/health-topics/severe-acute-respiratory-syndrome#tab=tab_1
- Wu, W., Cheng, Y., Zhou, H., Sun, C., & Zhang, S. (2023). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein: its role in the viral life cycle, structure and functions, and use as a potential target in the development of vaccines and diagnostics. İçinde *Virology Journal* (C. 20, Sayı 1). <https://doi.org/10.1186/s12985-023-01968-6>
- Xia, B., Shen, X., He, Y., Pan, X., Liu, F. L., Wang, Y., et al. (2021). SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target. *Cell Research*, 31(8). <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00519-4>
- Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., et al. (2020). Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>
- Zandi, M., Shafaati, M., Kalantar-Neyestanaki, D., Pourghadamyari, H., Fani, M., et al. (2022). The role of SARS-CoV-2 accessory proteins in immune evasion. İçinde *Biomedicine and Pharmacotherapy* (C. 156). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113889>
- Zhao, Y., Lu, Q., Meng, X., Huang, S., Zhang, J., et al. (2023). A Comparative Study on Virology, Epidemiology, and Clinical Features of SARS and COVID-19. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 17(2). <https://doi.org/10.1017/dmp.2021.275>
- Zhou, S., Lv, P., Li, M., Chen, Z., Xin, et al. (2023). SARS-CoV-2 E protein: Pathogenesis and potential therapeutic development. İçinde *Biomedicine and Pharmacotherapy* (C. 159). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114242>

Zou, Z., Meng, Z., Ma, C., Liang, D., Sun, R., et al (2017). Guanylate-Binding Protein 1 Inhibits Nuclear Delivery of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Virions by Disrupting Formation of Actin Filament. *Journal of Virology*, 91(16). <https://doi.org/10.1128/jvi.00632-17>



8. EKLER

8.1. EK 1 Etik Kurul Kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 162

Toplantı Tarihi: 21 Ekim 2022

Karar Sayısı:2022/4020;(11517)N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'nun "**GBP2 ve GBP5 gen ekspresyon düzeylerinin COVID 19 prognozuna etkisi**" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 14.10.2022 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Abdullah Yücel BABA'nın doktora tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'nun sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin ilaç ve tıbbi cihaz dışı araştırmalar etik kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU

Yardımcı Araştırmacı: Abdullah Yücel BABA

ASLI GİBİDİR
21.10.2022

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı