

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNDA SERINC3 ve SERINC5 GEN BÖLGELERİNİN
ANTİVİRAL ROLLERİ ve MOLEKÜLER ANALİZLERİ

Kevser GECEKUŞU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Anabilim Dalı: Biyoteknoloji

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ

TUNCELİ – 2023

T.C.
MUZNUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNDA SERINC3 ve SERINC5 GEN BÖLGELERİNİN
ANTİVİRAL ROLLERİ ve MOLEKÜLER ANALİZLERİ

Kevser GECEKUŞU
200010016

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ

TUNCELİ-2023

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SARS-COV-2 ENFEKSİYONUNDA SERINC3 ve SERINC5 GEN BÖLGELERİNİN
ANTİVİRAL ROLLERİ ve MOLEKÜLER ANALİZLERİ

Kevser GECEKUŞU
YÜKSEK LİSANS SEMİNERİ
BİYOTEKNOLOJİ
ANA BİLİM DALI

Bu tez 12/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

İmza
Doç. Dr. Ahmet Yusuf
ŞENGÜL
Bingöl Üniversitesi
BAŞKAN
İmza:.....

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can
YAZDIÇ
Munzur Üniversitesi
DANIŞMAN
İmza:.....

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Altuğ
KARAMAN
Munzur Üniversitesi
ÜYE
İmza:.....

Bu tez, Enstitümüz Stratejik Hammadeler ve İleri Teknoloji Uygulamaları Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Murat KORUNUR
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Tezin hazırlanmasında danışman tarafından yürütülmekte olan TÜBİTAK 1001 projesi verilerinden faydalanılmıştır.

Proje No: YLMUB022-10

NOT: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı ‘‘ Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu’’ndaki hükümlere tabidir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza

Kevser GECEKUŞU

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ

TEŞEKKÜR

Tez çalışma sürecimde desteklerini benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ferit Can YAZDIÇ'a , çalışmalarım süresince ihtiyaç duyduğum her türlü bilgi, kaynak vb. durumlar için destek olan, gerek kişisel gerekse bilimsel tecrübeleriyle bana bakış açısı kazandıran değerli hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KARAMAN'a, arkadaşım Sevda Ateşli ve Gamze DALĞA'a teşekkür ederim.

Gerek etik kurul sürecinde, gerekse tez çalışmasının örneklerinin temini konusunda başta Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı ve Tunceli İl Sağlık Müdürlüğüne desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim. Ayrıca kısmen maddi destek sağlayan Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederim.

Kevser GECEKUŞU

TUNCELİ – 2023

İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER	III
ŞEKİLLER TABLOSU	V
TABLolar LİSTESİ.....	VI
RESİMLER LİSTESİ	VII
KISALTMALAR LİSTESİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
1.1. SARS-CoV-2'nin Genomu.....	2
1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısı ve Replikasyonu	3
1.3. SARS-CoV-2'nin Reseptöre Bağlanması	5
1.4. SARS-CoV-2'nin Giriş Yolu ve Proteaz Kullanımı	6
1.5. SARS-CoV-2'nin Epidemiyolojisi.....	7
1.5.1. Hastalık geçmişi	7
1.5.2. Coğrafi Dağılımı.....	7
1.5.3. Bulaşma Yolları.....	7
1.6. SARS-CoV-2'nin Patofizyolojisi ve Klinik Seyri	8
1.7. Bağışıklık Sistemi.....	9
1.7.1. Doğal veya doğuştan gelen bağışıklık sistemi	10
1.7.2. Edinilmiş veya adaptifbağışıklık sistemi.....	11
1.7.2.1. B hücreleri	12
1.7.2.2. T hücreleri	12
1.8. SERINC Genleri ve Enfeksiyonlara Karşı Etkileri	13
1.8.1. SERINC 3.....	15
1.8.2. SERINC 5.....	15
1.9. SERINC 3 ve SERINC 5'in virüslere karşı etkileri	16
2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ	19
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Örneklerin Toplanması.....	20
3.2. DNA ve RNA İzolasyonu.....	20
3.3. DNA İzolasyonu.....	20
3.4. RNA İzolasyonu	21
3.5. Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi	22
3.5.1. Primer Dizaynı ve PCR	22
3.5.2. Sekans Dizilimi	23
3.6. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi ve Dataların Değerlendirilmesi	24
3.6.1. Gen dizianalizleri	24
3.6.2. Gen ekspresyonlarının belirlenmesi	25
3.7. EtikKurulOnayBilgileri	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Kan Örneklerinden Genomik DNA ve RNA İzolasyonu.....	27
4.2. SERINC3 ve SERINC5 Gen Bölgelerinin PZR Optimizasyonu	28
4.3. ERINC3 ve SERINC5 PZR Amplifikasyon Sonucu.....	28
4.4. SERINC3 ve SERINC5 DNA Dizileme Sonuçları	30

4.5.	SERINC3 ve SERINC5 Gen Bölgelerinin Filogenetik Analizi	30
4.6.	SERINC3 Genotip Analizi	34
4.7.	SERINC5 Genotip Analizi	35
4.8.	SERINC3 Gen ekspresyon analizi	35
4.9.	SERINC5 Gen Ekspresyon Analizi.....	37
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	39
6.	KAYNAKLAR	40
	ÖZGEÇMİŞ	48



ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 1.1. SARS-CoV-2 genom haritası https://www.snapgene.com/resources/coronavirus-resources/?resource=SARS-CoV-2_(COVID-19)_Genome	3
Şekil 1.2. SARS-CoV'nin yapısı. Virüsün elektron mikroskopu görüntüsü (A), Virüsün şematik gösterimi (B) (Stadler ve ark., 2003)	4
Şekil 1.3. Doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklıkta yer alan hücre tipleri	10
Şekil 1.4. SERINC3 gen bölgesinin insan 20. kromozomundaki konumu (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERINC3)	155
Şekil 1.5. SERINC5 gen bölgesinin insan 5. Kromozomundaki konumu (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERINC5)	166
Şekil 3.1. DNA ve RNA izolasyon basamakları. A: Kan örnekleri, B, C, D: Örneklerin hazırlanması ve izolasyonu	211
Şekil 4.1. SERINC3 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir	30
Şekil 4.2. SERINC5 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir	30
Şekil 4.3. Hastalardaki SERINC3 bölgesinin filogenetik ağacı	32
Şekil 4.4. Hastalardaki SERINC5 bölgesinin filogenetik ağacı	33
Şekil 4.5. Referans ve çalışmada kullanılan gen bölgelerinin R^2 denklem sonuçları.	36
Şekil 4.6. SERINC3 gen ekspresyon seviyeleri	37
Şekil 4.7. SERINC5 gen ekspresyon seviyeleri	38

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Primer listesi.....	222
Tablo 4.1. RNA izolasyonu sonucunda elde edilen örneklerin bir kısmının saflık ve konsantrasyonu	277
Tablo 4.2. SERINC3 gen bölgesi genotip bölgeleri ve amino asit değişikliklerinin önemli olanları	344
Tablo 4.4. Serinc5 gen bölgesi genotip bölgeleri ve amino asit değişikliklerinin önemli olanları	355



RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. Clone Manager 9 primerTm değeri hesaplamaları	233
Resim 4.1. Kandan elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	277
Resim 4.2. SERINC3 Gen bölgesi PCR sonucu (M=1 kb).....	299
Resim 4.3. SERINC5 Gen bölgesi PCR sonucu (M=1 kb).....	299



KISALTMALAR LİSTESİ

α	:Alfa
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AT2	:Alveolarepitel tip 2
β	:Beta
CoV	:Koronavirüs
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
MERS	:Orta Doğu Solunum Yetmezliği Sendromu
MHC	: Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
Nef:	: Negatif Faktör
NsP	: Yapısal Olmayan Protein
RBD	: Reseptör Bağlama Bölgesi
SARS	:Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SERINC	: Serineincorporator-Serin düzenleyici
TMPRSS2	: Transmembran serin proteaz 2

ÖZET

SERINC genleri tüm ökaryotlarda bulunmakla birlikte bilinen moleküler fonksiyonları transmembran proteinlerini kodlamalarıdır. İnsan genomunda, transmembran topolojisine sahip homolog proteinleri kodlayan beş SERINC geni mevcuttur. SERINC3, poliomavirüs karşı etkinken, SERINC5'in antiretroviral aktivitesi göstermektedir. Yukarıda bahsedilen bilgiler ışığında dünya'da ve ülkemizde insan sağlığındaki yıkıcı etkilerinin belirlenmesi için covid-19 ile ilgili yapılacak bu tez çalışması ülkemizde SERINC bölgeleri ile yapılan ilk çalışma özelliğine sahiptir. Bu açıdan önemli bir yerde bulunmakla beraber gelecekteki yapılacak çalışmalara basamak niteliğindedir. SERINC3 ve SERINC5 genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlemek için, DNA ve cDNA sekans analizlerinden elde edilen veriler kullanılmıştır. Dizi çalışmaları sonunda, kullanılan hasta örneklerin de Serin3 için 671 mutasyonun 301 amino asit değişikliğine neden olurken, Serin5 için 333 mutasyonun 105 amino asit değişikliğine neden olduğu belirlenmiştir. Gen ekspresyon çalışmaları sonunda elde edilen Ct değerleri Gene Globe program ile analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin verileri GAPDH geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir. Ekspresyon kat değişimi analizi için gruplar parametrik olmayan Mann-Whitney testi ($p < 0.05$) kullanılmıştır. Her iki gen içinde farklı genotipler ve hastalığın seyrini değiştirebilecek genetik özellikler belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: SERINC, SARS-CoV-2, Real-Time PCR, Gen ekspresyonu

ABSTRACT

Antiviral Roles and Molecular Analyses of SERINC3 and SERINC5 Gene Regions in SARS-CoV-2 Infection

SERINC genes are ubiquitous in all eukaryotes, but their only known molecular function is to encode transmembrane proteins. The human genome has five SERINC genes, which encode homologous proteins with a transmembrane structure. SERINC3 has antiretroviral activity, whereas SERINC5 is anti-polyomavirus. In view of the foregoing information, this thesis study on covid-19 to assess its disastrous impacts on human health in the globe and in our country has the distinction of being the first study undertaken in our country with SERINC areas. In this regard, while it has an important place, it is merely a stepping stone for future research. The expression levels of the SERINC3 and SERINC5 genes were determined using data from DNA and cDNA sequence analyses. In the patient samples analyzed, sequence analysis showed that 333 serine5 mutations caused 105 amino acid changes while 671 serine3 mutations caused 301 amino acid changes. The Gene Globe program was used to assess the Ct values received at the end of gene expression studies. The data from the genes used in the study were normalized using the GAPDH gene, and statistical analysis was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula data. The non-parametric Mann-Whitney test (p 0.05) was used to compare groups for expression fold change analysis. In both genes, different genotypes and genetic characteristics that can alter the course of the disease have been identified.

Keywords: SERINC, SARS-CoV-2, Real-Time PCR, Gene expression

1. GİRİŞ

Coronaviridae ailesinin üyesi olan koronavirüsler (SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2), yaklaşık 27-32 kb büyüklüğünde, tek sarmallı, pozitif polariteli tek iplikli RNA genomu içeren zarflı virüslerdir (Pyrce ve ark., 2006). Genomları tipik olarak başlangıçta bulunan 50-metilguanosa, sonda bulunan 30 tekrarlı Poli-A kuyruğu ve 6-10 toplamda 6 ile 10 genden oluşmaktadır (de Wit ve ark., 2016). Koronavirüs ailesi Alfakoronavirüs (α -CoV), betakoronavirüs (β -CoV), gamakoronavirüs (γ -CoV) ve deltakoronavirüs (δ -CoV) olmak üzere dört gruba ayrılmaktadır. Bunlardan γ -CoV ve δ -CoV çoğunlukla kuşları enfekte ederken α -CoV ve β -CoV sadece memelileri enfekte etmektedir. İnsanları enfekte eden virüslerden SARS-CoV ve Orta Doğu Solunum Yetmezliği Sendromu (MERS-CoV2) ise β -CoV grubuna aittir (Perlman ve Netland, 2009). Genomik ve filogenetik analizler, COVID-19'a neden olan CoV virüsünün SARS virüsü ile aynı alt cins içerisinde olmasına rağmen farklı bir sınıfta olduğunu göstermiştir. Bu virüs 2020 yılının başlarında, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından SARSCoV-2 olarak isimlendirilmiştir (Zhu ve ark., 2020). SARS-CoV-2 virion yapısı nükleokapsid, transmembran, zarf ve spike proteinlerinden oluşan bir virüstür.

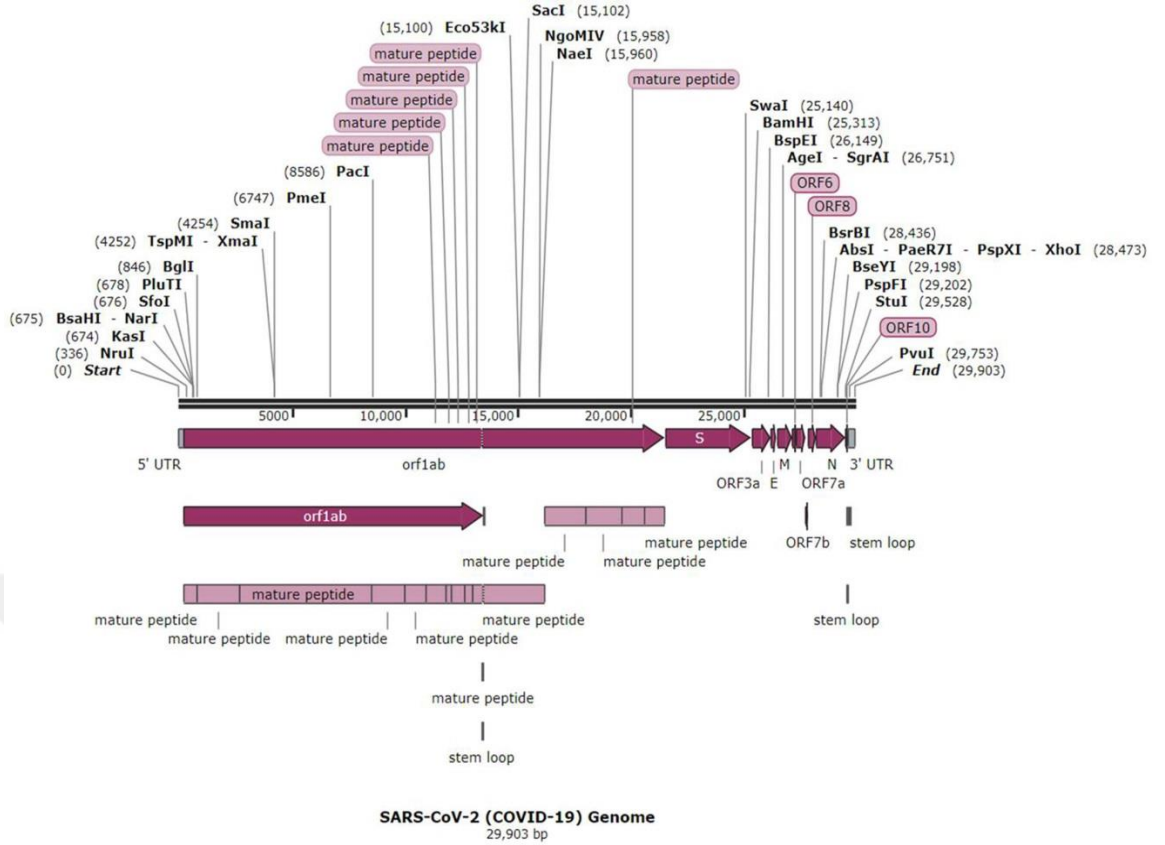
2019 yılının sonlarına doğru Wuhan şehri sağlık komitesi tarafından Dünya Sağlık Örgütü'ne sebebi bilinmeyen bir dizi pnömoni vakası bildirilmiştir. Söz konusu vakaların ilkinin, 26 Aralık 2019'da hastaneye başvurmuş olan 41 yaşındaki erkek hasta olduğu tespit edilmiştir. 6 gündür devam eden ateş, göğüste sıkışma hissi, kuru öksürük ve halsizlik şikayetleri olan hastada etken saptanamaması üzerine yapılan araştırmalarda, hastanın yerel bir et ve deniz ürünleri marketinde çalıştığı, aynı ortamda bazı yabani hayvanların satışının da yapıldığı ve hastanın temasta bulunmuş olabileceği öğrenilmiştir (Wu ve ark., 2020). Yapılan genetik analizler sonucu, DSÖ 7 Ocak 2020 tarihinde Çin'de yeni bir koronavirüs türü (novelkoronavirüs, 2019-nCoV) ortaya çıktığını açıklamıştır. Novelkoronavirüsün ortaya çıkışı ile birlikte birçok genetik çalışma başlatılmıştır. Bu yeni etkenin diğer koronavirüs türlerinden tamamen farklı bir tür olup olmadığı veya bilinen türlerin belirli mutasyonları sonucu ortaya çıkıp çıkmadığı konuları üzerinde durulmuştur. Bir çalışmada, bu yeni patojenin S protein gen analizi yapılmış olup aminoasit diziliminin yarasalarda saptanan CoV türleri ile %82,3 ve SARS-CoV ile %77,2 oranında benzer olduğu saptanmıştır (Wu ve ark., 2020). Diğer yandan Chan ve arkadaşlarının yaptığı genetik çalışmalarda novelkoronavirüs genomunun bat SARS-likeCoV ile %89, SARS-CoV ile %82

oranında nükleotid benzerliği taşıdığı görülmüştür (Chan ve ark., 2019). Novelkoronavirüs S proteininin, tıpkı SARS-CoV'da olduğu gibi insan hücrelerinde ACE-2 reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada bu bağlantının yüksek affiniteli olduğu ve insandan insana bulaşta rol oynadığı gösterilmiştir (Xu ve ark., 2020). Öte yandan yine S proteininin N-terminal kısmındaki aminoasit diziliminin, insan koronavirüslerinden en çok SARS-CoV ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Wu ve ark., 2020). Tüm bunlar ışığında bu yeni virüse SARS-CoV-2 adı verilmiştir.

1.1. SARS-CoV-2'nin Genomu

İlk olarak, SARS-CoV-2'nin genom dizisi 11 Ocak 2020'de GenBank'ta yayınlanmasıyla (Erişim no: MN908947.3) (Wu ve ark., 2020) birlikte genom analizleri hız kazanmıştır. Dizi ve evrimsel analizlere dayanarak, SARS-CoV-2 Nidovirales takımından Coronaviridae familyasındaki Betacoronavirus (β -CoV) cinsinin B soyunun en yeni üyesi olarak kabul edilmiştir (Zhu ve ark., 2019). Genomik analizler SARS-CoV-2'nin sekans dizilerinin %79 oranında SARS-CoV'a benzerken, %50 oranında Orta Doğu solunum sendromu (MERS) ile özdeş olduğunu göstermiştir (Lu ve ark., 2020). Benzer şekilde filogenetik analizler de SARS-CoV-2'nin MERS-CoV'den çok SARS-CoV'ye benzedi bulunmuştur. Ayrıca homoloji modelleme çalışmalarına dayanarak , SARS-CoV-2'nin *Rhinolophus affinis*'ten bir yarası koronavirüsü olan BatCoV RaTG13 ile %96,2 homoloji paylaştığı önenmli bir noktadır (Zhou ve ark., 2020).

SARS-CoV-2 virüsü, bilinen RNA virüsleri arasında tek sarmallı ve pozitif anlamda RNA virüsleri olan koronavirüsler, GC içeriği (%32-%43) ile diğer RNA virüsleri arasında en büyük genoma sahip olanıdır (Woo ve ark., 2010). Ek olarak genom yapısında %29,9 Adenin, %32,1 Timin, %19,6 Guanin ve %18,4 Sitozinden oluşmaktadır. SARS-CoV-2 genomik dizileri 29,8-29,9 kb arasında değişmekle birlikte 27 proteini kodlayan 12 açık okuma çerçevesine (ORF'ler) sahip bir genomu bulunmaktadır (Oostra ve ark., 2007). Genomik organizasyonu (Erişim numarası: NC_045512.2) (Şekil 1.1), soldan sağa doğru yani 5' uçundan başlayarak 3' ucuna doğru ORF1/ab-S-ORF3a-E-M-ORF6a-ORF7a-ORF7b-ORF8-N-ORF10 bölgelerini içerirken β -CoV'lerde farklı olarak hemagglutinin-esteraz geni bulunmamaktadır (Wu ve ark., 2020). Ayrıca transkripsiyon düzenleyici sekans (TRS), bu ORF'lerin her biri arasında bulunmaktadır (Yang ve Leibowitz, 2015).

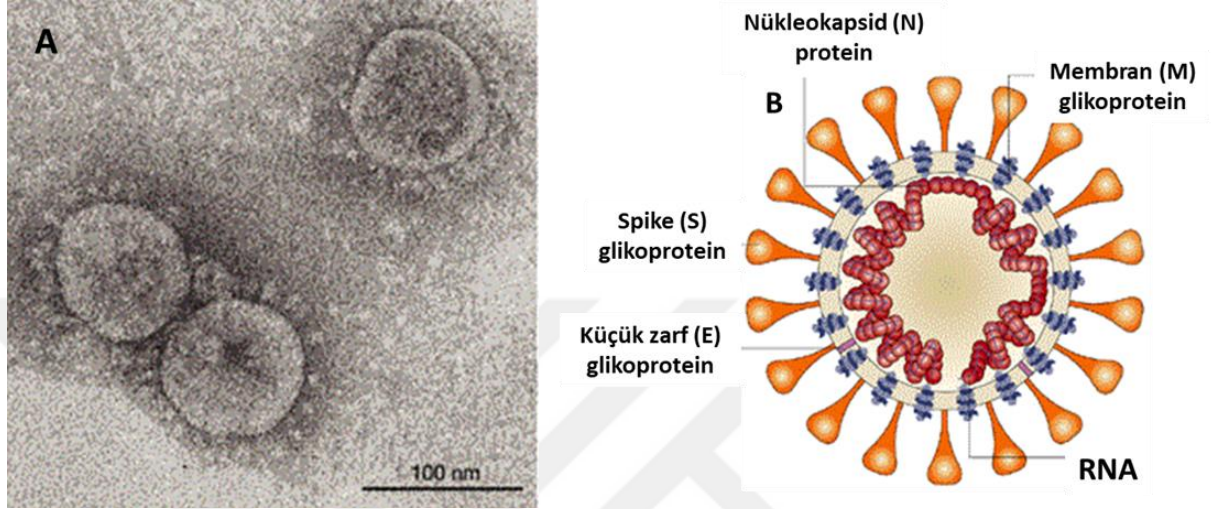


Şekil 1.1. SARS-CoV-2 genom haritası [https://www.snapgene.com/resources/coronavirus-resources/?resource=SARS-CoV-2_\(COVID-19\)_Genome](https://www.snapgene.com/resources/coronavirus-resources/?resource=SARS-CoV-2_(COVID-19)_Genome)

1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısı ve Replikasyonu

SARS-CoV-2 tek sarmallı RNA virüslerindendir. Virüs genomu, spike (S), küçük zarf (E) ve membran (M) glikoproteinleriyle birlikte nükleokapsid proteini (N) tarafından oluşturulmuş bir yapı tarafından korunur (Brian ve Baric, 2005) (Şekil 1.2). SARS-CoV-2, dört yapısal protein (S, E, M ve N) ve on altı yapısal olmayan protein (nsp1–16) içerir. Nsp1, RNA'nın işlenmesine ve replikasyonunda görevlidir. Nsp2, konakçı hücrenin hayatta kalma sinyal yolunu değiştirmekten sorumludur. Nsp3'ün oluşturulan proteinlerin ayrılmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Wang ve ark., 2020). Nsp4, transmembran domainini içerir ve endoplazmikretikulumun zarlarını değiştirir. Nsp5, replikasyon sırasında poliprotein sürecine katılır. Nsp6, bir transmembran domaini bulunur. Nsp7 ve Nsp8'in varlığı, Nsp12 ve kalıp-primer RNA miktarını önemli ölçüde arttırmaktadır. Nsp9, ssRNA'nın bağlayıcı proteini olarak işlev görür. Nsp10, viralmRNA'ların metilasyonu için kritiktir. Nsp12, koronavirüs replikasyonu/transkripsiyonunun kritik bir bileşimi olan

RNA'ya bağımlı RNA polimerazı içerir (Wang ve ark., 2020). Nsp13, ATP ile bağlanarak replikasyon ve transkripsiyon sürecine katılır. Nsp14, bir ekzoribonükleaz düzenleme domainine sahiptir. Nsp15, Mn(2+) bağımlı endoribonükleaz aktivitesine sahiptir. Nsp16, bir 2'-O-riboz metiltransferazdır (Naqvi ve ark., 2020).



Şekil 1.2. SARS-CoV'nin yapısı. Virüsün elektron mikroskopu görüntüsü (A), Virüsün şematik gösterimi (B) (Stadler ve ark., 2003)

SARS-CoV'ye benzer şekilde SARS-CoV-2 enfeksiyonu da, temel olarak S proteinlerinin konak hücre reseptörü ACE2 ile etkileşimleri yoluyla hedef hücelere viriyonun bağlanmasıyla başlar (Walls ve ark., 2020). S proteininin transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) tarafından proteolitik bölünmesi, viral ve konakçı zarın birleşmesiyle birlikte viral RNA'nın sitoplazmaya salınmasını başlatan S proteininin yapısal değişikliklerine neden olur (Brant ve ark., 2021). Hem ACE2 hem de TMPRSS2, özellikle akciğerlerde ve bağırsak epitelinde ve endotel hücrelerinde yüksek ekspresyon ile birçok hücre tipinde eksprese olabilmektedir ve böylelikle SARS-CoV-2'nin çok sayıda hayati organı hedeflemesinin yolunu açmaktadır (Lukassen ve ark., 2020; Davidson ve ark., 2020). Bir RNA virüsü olarak SARS-CoV-2, yalnızca viral genomun hücresel proteazlar tarafından bağlı olduğu viral N proteinlerinden ayrıldığı enfekte hücrelerin sitoplazmasında çoğalabilir. Viral RNA daha sonra doğrudan ORF1a ve ORF1b'nin ekspresyonu için bir mRNA ve ayrıca RNA transkripsiyonu için bir şablon RNA olarak hizmet eder. ORF1a ve ORF1b poliproteinlerinden türetilen viral RNA'ya bağımlı RNA polimeraz dahil olmak

üzere nsp'lerin etkileşimleri, virüs enfeksiyonunun neden olduğu çift zarlı veziküller içinde virüs gRNA transkripsiyonu ve sgRNA sentezi için şablon gRNA üzerinde bir replikasyon ve transkripsiyon kompleksi oluşumuna yol açar (Klein ve ark., 2020). Çift zarlı veziküllerden salınan yeni sentezlenen sgRNA'lar, viral yapısal ve yardımcı proteinleri kodlarlar. Son olarak, yeni üretilen bir gRNA, viral bir zarf tarafından çevrelenen ve enfekte olmuş hücrelerden salınan N proteinleri ile kapsüllenir (Hartenian ve ark., 2020).

1.3. SARS-CoV-2'nin Reseptöre Bağlanması

Koronavirüs'ün temel proteinlerinden birisi olan spike (S) proteini, reseptör bağlanmasına ve virüs partiküllerinin hedef hücrelerle birleşmesine aracılık eder. S proteini tip I füzyon proteinidir ve konakçı proteazlar tarafından S1 alt birimi ve S2 alt birimi olmak üzere iki kısma ayrılır ve alt birimler, viral füzyon meydana gelene kadar kovalent olmayan bir formda bulunurlar (Tortorici ve ark., 2019). Dikkat çeken kısmı, SARS-CoV'den farklı ancak MERS-CoV'ye benzer olan SARS-CoV-2 S proteini, S1/S2 bağlantısında verimli viral giriş, yayılma ve patogeneze yardımcı olan bir furinproteolitik bölünme bölgesi içerir (Evans ve Liu, 2021). Furin, patojenik ajanlardan büyüme faktörlerine, reseptörlere ve hücre dışı matris proteinlerine kadar birçok propeptin substratını proteolitik olarak aktive eden bir hücre endoproteazdır (Wise ve ark., 1990). Çeşitli koronavirüslerin S proteinleri, giriş sürecini kolaylaştırmak için ACE2, dipeptidilpeptidaz 4, aminopeptidaz-N ve sialik asit parçaları dahil olmak üzere çok çeşitli reseptörlerle etkileşime girerler (Wielgat ve ark., 2020). Reseptör kullanımının bu çeşitliliği, koronavirüslerin insanlara zoonotik bulaşma şeklinde olduğunu bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Bağlanma ve giriş için aynı reseptör olan ACE2'yi kullanmasına rağmen, SARS-CoV-2 S'in dinamikleri ve reseptör bağlanma özellikleri SARS-CoV'ninkinden biraz farklıdır. SARS-CoV-2 S'in reseptör bağlama bölgesinin (RBD), ACE2 ile bağlanma afinitesi daha yüksektir (Evans ve Liu, 2021). SARS-CoV-2'nin bağışıklıktan kaçınma strateji olarak bu bağlanma afinitesi gösterilebilir (Shang ve ark., 2020).

1.4. SARS-CoV-2'nin Giriş Yolu ve Proteaz Kullanımı

Bilim adamları, akciğer, kolon veya böbrek gibi farklı doku türlerine SARS-CoV-2 virüsü bulaştırdılar. Çalışma sırasında, virüsün hücre yüzeyine bağlanmasından yaklaşık 10-50 dakika arasında değiştiğini gösterdiler. Bu hızlı giriş yolunun, enfekte hücrelerin yüzeyinde bir proteazın yani transmembran serin proteaz 2 (TMPRSS2) ile ilişkili olduğunu belirlemişlerdir (Meng ve ark., 2022). Bu görüş bize SARS-CoV-2, hücrelere nüfuz etmek için özel olarak TMPRSS2 yolunu kullandığını göstermiştir. TMPRSS2, özellikle yüksek virüs seviyelerinin tespit edildiği iki organ olan akciğerlerde ve bağırsakta bulunduğundan bu organlar bu hastalık açısından yüksek riskli olarak görülebilir. TMPRSS2 proteazı olmadığında, virüs endolizozomal yol boyunca başka bir yol izlemektedir (Trogakos ve ark., 2021). Ancak bu yol TMPRSS2 yoluna göre daha yavaştır. Aslında, bu yolu takip etmek için virüs, aktivasyonu için gerekli olan endolizozomal proteazların işleyişini sağlamak için özellikle düşük bir pH'a (veya bir asit ortamına) ihtiyaç duyar. Bu yolları hedefleyen ilaçların bu hastalıkla mücadelede fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Birçok sınıf I viral füzyon proteini gibi, koronavirüs girişi için koronavirüslerde bulunan S proteinlerinin konakçı proteazlar tarafından işlenmesi gerekir. Bu sürecin başlangıcında öncü S'nin S1/S2 sınırında bir bölünmeyi, S proteininin S2' bölgesinde bir bölünmeyi veya her ikisi şeklinde görülebilir. Bu süreç S1 alt biriminin S2'den ayrılmasıyla sonuçlanır ve böylece S2 alt birimi yardımıyla viral zarf ve hücre zarı arasında bir birleşme olmasını sağlar (Millet ve Whittaker, 2015). Önceki çalışmalar, SARS-CoV'nin S2' bölgesinde hücre zarıyla ilişkili transmembran proteaz serin 2/4 (TMPRSS2/4), endozomalkatepsin ve diğer tripsin benzeri proteazlar tarafından kullanılabileceği göstermiştir (Simmons ve ark., 2005; Matsuyama ve ark., 2010; Bertram ve ark., 2011). Benzer şekilde, SARS-CoV-2'nin aynı hücre yüzeyi seti aracılığıyla aktive edilebileceğini göstermiştir. Bu proteazların ve bölünme olaylarının SARS-CoV-2 girişi, patogenezi, tropizmi ve konak aralığını belirlemedeki göreceli önemini belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

1.5. SARS-CoV-2'nin Epidemiyolojisi

Coronavirüsler, insanlarda hafif solunum yolu hastalıkları ürettiği bilinen Coronaviridae familyasına ait, İlk olarak 1965 yılında insanlardan izole edilen zarflı ve tek sarmallı RNA virüsleridir (Tyrrell ve Bynoe, 1966).

1.5.1. Hastalık geçmişi

Aralık 2019'da Çin, Hubei eyaletinin başkenti Wuhan'da nedeni bilinmeyen bir pnömoni salgınının bildirilmesi ile birlikte, buradaki vakaların çoğu, epidemiyolojik olarak suda yaşayan hayvanların ve canlı hayvanların satıldığı Huanan deniz ürünleri toptan satış pazarıyla bağlantılı olduğu görülmüştür (Li ve ark., 2020). Yeni nesil DNA dizileme kullanılarak, bu hastaların alt solunum yolu örneklerinde bilinmeyen bir betakoronavirüs olduğu keşfedilmiştir. 2019-yeni Coronavirüs (2019-nCoV) olarak adlandırılan virüsü izole etmek için insan akciğer epitel hücreleri kullanılmıştır (Zhu ve ark., 2020). 11 Şubat 2020'de soy geçmişi ve taksonomiye dayanarak, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'nin Coronaviridae çalışma grubu virüsü SARS-CoV2 olarak adlandırdı (Gorbalenya ve ark., 2020). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO), ortaya çıkan hastalığa Coronavirüs hastalığı (COVID-19) adını verilerek, 11 Mart 2020'de DSÖ, dünya çapındaki durumu değerlendirdikten sonra COVID-19'u bir pandemi olarak ilan etmiştir (WHO, 2020).

1.5.2. Coğrafi Dağılımı

Çin'den gelen ilk rapordan bu yana hastalık hızla yayıldı ve vaka sayısı katlanarak artmıştır. 11 Ocak'ta, Çin anakarasının dışında Tayland'da ilk vaka bildirildi ve aylar içinde hastalık Antarktika hariç tüm kıtalara yayılmıştır (WHO, 2020).

1.5.3. Bulaşma Yolları

İlk vakaların birçoğunun su ürünleri pazarlarına maruz kalma geçmişi olduğundan, zoonotik bulaşma başlangıçta makul bir neden gibi görmüştür. Ancak 2020 Ocak ayının sonuna kadar, bu pazarlara maruz kalmadan hastalığın görüldüğü kişi sayısının artmasıyla birlikte bulaşma yolunun farklı olabileceği fikri ortaya çıkmaya başlamıştır. Hastalığın

Wuhan'ı ziyaret etmeyen kişiler ve sağlık çalışanları arasında yayılması, virüsün kişiden kişiye bulaştığını düşündürdü (Chan ve ark., 2020). Bu virüsün tam olarak bulaşma şekli bilinmemekle birlikte, diğer solunum yolu virüslerinde olduğu gibi, doğrudan veya dolaylı olarak, solunum yoluyla havadan ve fomitler vasıtasıyla kontamine yüzeye temas maruziyeti yani damlacık yoluyla bulaştığı üzerinde durulmaktadır (Wong ve ark., 2019). Hem semptomatik hem de iyileşen hastaların dışkı örneklerinde virüs partikülleri tespit edilmiş olmasına rağmen feko-oral bulaşma riski belirsizdir.

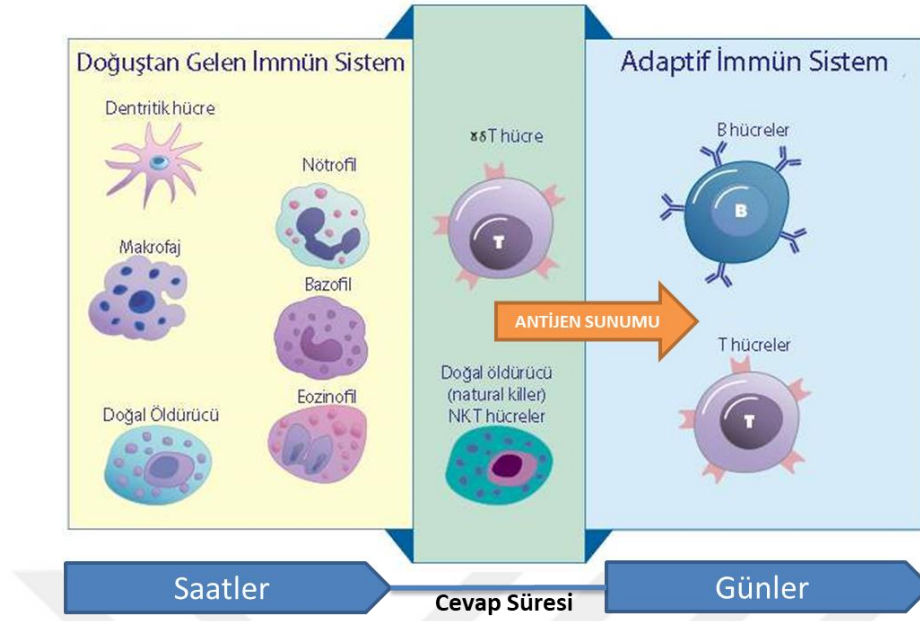
1.6. SARS-CoV-2'nin Patofizyolojisi ve Klinik Seyri

Virüs solunum yolu yoluyla akciğerlere girer ve alveolarepitel tip 2 (AT2) hücrelerine saldırır. AT2, alveoller içindeki yüzey gerilimini azaltmak için bir sürfaktan üretir. SARS-CoV-2'nin spike proteinlerinin AT2 hücreleri üzerindeki ACE-2 reseptörlerine bağlanırlar (Wang ve ark., 2020). ACE2 reseptörleri aynı zamanda böbrek, kalp, enterositler, pankreas ve endotel hücrelerinin tübülarepitelinde de bulunmaktadır (Diao, ve ark., 2021). Daha önceki çalışmalarda, SARS-CoV-2'nin konakçı hücreye girişinde ACE2 ve TMPRSS2'nin rolünü belirlenmiştir (Hoffmann ve ark., 2020). Ayrıca integrinlerin (epitel hücrelerini matrikse veya bazal laminaya bağlar), SARS-CoV-2 ile etkileşimi sırasında ACE2 reseptöründe konformasyonel değişiklikleri de indükleyebilir olduğu gösterilmiştir (Hoffmann ve ark., 2020). Konak hücreye girdikten sonra virüs, ssRNA'sını serbest bırakır. ssRNA, poliproteinleri üretmek için konakçı hücre ribozomunu ve RNA'sını çoğaltmak için RNA'ya bağımlı RNA polimerazlarını kullanır. Hücrenin paketlenme yapısı, sentezlenen spike proteinlerini vezikül taşıyıcılarına dağıtır ve sonrasında sitoplazmadaki proteinazlar, SARS-CoV-2'nin sentezlenmiş poliproteinlerini (nükleokapsid enzimleri, spike proteinleri, M-proteini, E-proteini vb.) ayırır (Sigrist ve ark., 2020). Virüs ayrıca makrofajları uyarmak için spesifik inflamatuvar araçları da serbest bırakır (Walls ve ark., 2020). Aktif makrofajlar, kan dolaşımına sitokinler (IL-1, IL-6 ve TNFa) ve kemokinler (CXCL10 ve CCL2) salmaya başlarlar. Bu moleküllerin salınması vazodilatasyona ve kılcal geçirgenliğin artmasına neden olur. Alveol hücrelerinin interstisyel boşluklarına sızan plazma, alveollerin etrafında birikecek ve alveolleri sıkıştıracaktır (de Wit ve ark., 2016; Wu ve ark., 2020). Bunun sonucunda AT2 hücrelerinde sürfaktan düzeylerinde azalma olur. Kademeli olaylar sonuçta alveolerkollaps ve bozulmuş gaz değişimine yol açar. Eşzamanlı olarak, enflamatuarsitokin salgılanmasında bir artış ortaya çıkar (Palm ve Medzhitov, 2007). Yardımcı T hücreleri

(CD4+) yoluyla inflamatuarmediatörler, IL-17, IL-21 ve IL-22'yi kullanarak nötrofillerin ve makrofajların üretimini ve toplanmasını artırır (de Wit ve ark., 2016). Bunların sonucunda hastalığın seyrini etkileyen nefes almada güçlüğü, hipoksemi ve öksürüğe neden olur (Wan ve ark., 2020). Hipotalamus vücut ısını kontrol eder. Serbest bırakılan IL-1, IL-6 ve TNF- α kanda dolaşarak, hipotalamusu etkileyerek, prostaglandin salınımını tetiklerler ve vücut ısısında artışa neden olurlar. Hipoksik durum göz önüne alındığında, sempatikler taşikardiye neden olabilir. Tüm bu anormal inflamatuvar yanıtlar septik şoka ve çoklu organ yetmezliğine yol açabilir (Balk, 2014). Kısaca pnömoni nedeniyle efektif kan hacmini ve periferik direnci azaltan vazodilatasyon hipotansiyona, kalbin perfüzyon hızında azalmaya ve çoklu organ yetmezliğine yol açabilir (Connors ve Levy, 2020).

1.7. Bağışıklık Sistemi

Çok hücreli organizmalar, mikroorganizmalara karşı savunmaya yardımcı olan doğuştan gelen bir bağışıklık sistemine sahiptirler. Bu sistem özellikle, konakçıya zararlı olan ve bu nedenle dokulara, hücrelere ve metabolik süreçlere çok fazla zarar vermeden, önceliği patojenik mikropları hedeflemektedir. Bulaşıcı hastalıklar, patojenlerin konağın ilk bağışıklık savunmasından kaçıp çoğalmaya ve hasara neden olmaya başladığında ortaya çıkar. Daha yüksek organizmalar, uyarlanabilir bağışıklık sistemi adı verilen ikinci, daha gelişmiş bir sisteme sahiptir. Literatürde sıklıkla ayrı ayrı ele alınsa da, aslında bağışıklık sisteminin her iki dalından gelen hücreler ve proteinler arasında sürekli bir etkileşim vardır. Birçok özelliğini bilsek de, immünolojinin bilinmeyen birçok noktası hâlâ bulunduğu ve karmaşık bir sistem olduğu birçok kişi tarafından kabul edilmektedir. Aynı zamanda hayatta kalmak için gereklidir ve kontrol edilmezse kendine zarar verebilecek güçlü bir araçtır; karmaşık genler, moleküller, peptitler ve proteinler ağı içinde yüksek oranda düzenlenir ve bu nedenle bir enfeksiyonun virölansı gibi organizmanın karşı karşıya olduğu duruma uygun bir seviyede cevap oluşturan sistemin adı bağışıklık sistemidir. Bağışıklık sistemine ilişkin mevcut anlayışımızın çoğu, insanlar ve fareler, sıçanlar, tavuklar, domuzlar ve *Drosophila* gibi model sistem hayvanları üzerinde yapılan çalışmalardan kaynaklanmaktadır (Chou ve ark., 2013). Bağışıklık sistemi, hücreler arasında sinyal göndermek ve hücreleri enfekte bölgelere toplamak için kullanılan farklı moleküller aracılığıyla yüksek oranda koordine edilir (Male ve ark., 2012) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklıkta yer alan hücre tipleri.

1.7.1. Doğal veya doğuştan gelen bağışıklık sistemi

Konakçı organizmadaki savunmanın hayati bir bileşeni doğuştan gelen bağışıklık sistemidir. Farklı bağışıklık hücreleri ve kimyasallardan oluşan bir savunmanın genel adıdır. Enfeksiyondan dakikalar veya saatler sonra etki gösteren ve tüm canlı organizmalarda bulunan spesifik olmayan bir savunmadır. En çok bulunan doğuştan gelen bağışıklık hücreleri, kemik iliğinde üretilen ve kanda dolaşan nötrofillerdir. Nötrofiller, patojenleri yutan ve dokulara girdikten sonra kısa ömürlü olmalarına rağmen kanı kolayca terk edip enfekte dokulara girebilen fagositik hücrelerdir. Ayrıca nötrofiller, enfeksiyon üzerine granüler depodan farklı maddeler salabilir (Gasteiger ve ark., 2017). Ayrıca buna ek olarak diğer doğuştan gelen bağışıklık hücre tipleri şunlardır: 1) monositler - nötrofillere benzerler, ancak dokulara göç ettiklerinde daha uzun ömürlü olan ve patojenleri yutan makrofajlara dönüşebilirler; 2) dendritik hücreler - iltihaplanma sürecini başlatır ve adaptif bağışıklık sistemini uyarır; 3) mast hücreleri – iltihabı uyarır ve sitokinler gibi farklı kimyasal maddeler salabilir ve 4) doğal öldürücü (NK) hücreler - enfekte olmuş hücreleri doğrudan parçalayabilen ve hücre içi patojenleri öldürmek için kullanılan proteinlere sahip granüller içeren sitotoksik lenfositlerdir (Abbas ve ark., 2016; Abel ve ark., 2018). Ayrıca, farklı tipte plazma proteinleri ve sitokinler vardır. Hızlı bir bağışıklık tepkisi, istilacı patojenlerin

yapılarını tanımak için farklı bağışıklık hücrelerinin içindeki ve üzerindeki tanıma reseptörlerine dayanır.

1.7.2. Edinilmiş veya adaptif bağışıklık sistemi

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, çok çeşitli patojenleri hızlı bir şekilde algılayacak ve ortadan kaldıracak şekilde evrimleşmiş olsa da, tanıyabileceği patojenik molekül aralığı sınırlıdır. Doğuştan gelen bağışıklık sisteminden gelen sinyaller yoluyla ve antijenlerin adaptif bağışıklık sisteminde lenfositler olan antijen sunan hücreler (APC'ler) üzerindeki reseptörlere bağlanmasıyla aktive edilir. Adaptif bağışıklık sisteminin 'yeni' bir patojenle karşılaştığında aktive olması daha uzun sürer. Bununla birlikte, bir kez etkinleştirildiğinde, adaptif bağışıklık tepkisi, doğuştan gelen bağışıklık tepkisinden daha spesifiktir. Antijenik yapıların ezici değişkenliği ve ayrıca patojenlerin konak tespitinden kaçınmak için mutasyona uğrama yeteneği, adaptif bağışıklık sisteminin evrimsel olarak gelişmesini sağlamıştır (Cooper ve Alder, 2006). Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin tanıma reseptörlerinin, tümü germ (cinsiyet) hücreleri hattı genomunda tamamen işlevsel formlarında kodlanmış olanlarının aksine, adaptif bağışıklık tepkileri, özel olarak uyarlanmış ve geniş bir gen dizisinin somatik rekombinasyon süreci yoluyla seçilen reseptörlere bağlıdır. Bunlar, oldukça spesifik ve esnek bağışıklık tepkileri oluşturmak için omurgalıların evriminin erken dönemlerinde gen kopyalanması yoluyla ortaya çıkmıştır. İlk patojen karşılaşmalarından sonra, bu bağışıklık reseptörlerini eksprese eden hücreler konakçıda ömür boyu kalabilir ve yeniden maruz kalma durumunda hızlı yanıt verme kapasitesi ve immünolojik hafıza sağlar. Ek olarak, adaptif bağışıklık sisteminin hafızası olduğundan, aynı patojenle bir sonraki karşılaşmada, bağışıklık tepkisi çok daha hızlı ve güçlüdür. Genel olarak, adaptif bağışıklık sistemi hümmoral (B hücreleri ve antikorlar) ve hücre aracılı (T hücreleri ve makrofajlar) yollar olmak üzere iki kısma ayrılabilir. Hem B hem de T hücreleri kemik iliğinde üretilir ve reseptör genlerinin proliferasyonunu, ekspresyonunu ve reseptör seçimini içeren bir olgunlaşma sürecinden geçer (Abbas ve ark., 2016).

1.7.2.1. B hücreleri

B hücreleri, immüoglobulinler veya Igs olarak da bilinen antikorları üreten lenfositlerin genel adıdır başka bir deyişle bir tür beyaz kan hücreleridir. Antikorlar, antijenleri tanıyarak patojenleri nötralize eden büyük Y-şekli proteinlerdir. Antikorlar, B hücresi yüzeyinde B hücresi reseptörleri olarak adlandırılan reseptörler olarak dolaşıma salınabilir. Her B hücresi, belirli bir antijene afinitesi olan yalnızca bir tür antikor üretir (Alberts, 2002). Kemik iliğinde B hücresi gelişimi, hücre proliferasyonunu ve B hücresi reseptörleri ekspresyonunu içerir. B hücresi reseptörleri bir ağır ve bir hafif zincirden oluşan protein yapıları içerir ve reseptörün ekspresyonu, ağır zincirin ve ardından hafif zincirin DNA rekombinasyonu ile başlar. Reseptörler, rekombinasyon işlemi sırasında üretilen üç gen segmentinin farklı kombinasyonları nedeniyle ve farklı segmentler bir araya getirildiğinde birleşme çeşitliliği yoluyla oldukça değişkendir. Bu işlem sırasında nükleotitler uzaklaştırılabilir veya rastgele nükleotidler eklenebilir, bu da genomda kodlanmayan varyasyona yol açar (Market ve Papavasiliou, 2003). Bu özellikleri B hücresi reseptörlerinin çok çeşitli antijenleri tanıyabileceği anlamına gelir. Daha sonrasında olgunlaşmaları için B hücreleri dalağa göç ederler. Burada B hücreleri, bir dendritik hücre tarafından sunulan ilk yabancı antijeniyle karşılaşır ve plazma hücrelerine farklılaşır veya hafıza hücrelerinin geliştirildiği germinal merkez reaksiyonuna girer (LeBien ve Tedder, 2008; Abbas ve ark., 2016).

1.7.2.2. T hücreleri

T hücreleri, kemik iliğinde üretilen ve olgun T hücrelerine dönüşmek üzere timusa göç eden lenfositlerdir. T hücreleri üzerindeki T hücresi reseptörü, yukarıda B hücresi reseptörü için açıklanana benzer şekilde, DNA rekombinasyonunu içeren bir süreçte üretilen alfa ve beta zincirleri olarak adlandırılan iki zincirden oluşur. Timusta, olgunlaşmamış T hücreleri, büyük doku uygunluk kompleksi (MHC) molekülünün tanınmasını içeren negatif ve pozitif seçime tabi tutulur. MHC ile başarılı bir şekilde etkileşime giren T hücreleri hayatta kalırken kalan hücreler apoptoz yoluyla ölür. Ek olarak, T hücresi reseptörlerin farklılaşma kümesi 4 (CD4) veya CD8 olarak adlandırılan yardımcı reseptörleri vardır ve bunlar hangi MHC moleküllerinin tanınacağını belirler. CD4, sınıf II MHC'yi tanıırken CD8, sınıf I MHC moleküllerini tanımaktadır (Boon ve ark., 1997). CD4 pozitif T hücreleri,

yardımcı T hücreleri olarak da bilinir ve hem hücre dışı hem de hücre içi patojenleri tanırlar (Alberts, 2002). Hücre içi patojenlere karşı savunma sırasında, yardımcı T hücreleri, hücre yüzeyindeki sınıf II MHC molekülleri üzerinde patojen protein fragmanları sunan patojen yutan fagositlerin aktivasyonunda yer alır (Abbas ve diğerleri, 2016). Ayrıca yardımcı T hücreleri sitotoksik T hücreleri olarak da bilinen CD8 pozitif T hücrelerini uyarır ve hücre yüzeyi sınıf I MHC molekülleri üzerinde patojenle ilişkili antijenlerin sunumuyla hücre içi mikroplarla enfekte olmuş hücreleri tanırlar (Bevan, 2004). Bir kez aktive edildiğinde, sitotoksik bir T hücresi, salgı keseciklerinden içeriği serbest bırakır ve bunu sonucunda enfekte olmuş hücrenin apoptoz (programlanmış hücre ölümünün) geçirmesine neden olurlar (Prager ve Watzl, 2019).

1.8. SERINC Genleri ve Enfeksiyonlara Karşı Etkileri

SERINC genleri (Serine incorporator-Serin düzenleyici) tüm ökaryotlarda korunur ve bilinen moleküler fonksiyonları transmembran proteinlerini kodlamalarıdır. İnsan genomunda, transmembran topolojisine sahip homolog proteinleri kodlayan beş SERINC geni mevcuttur. İlk tanımlanan SERINC3 genidir, poliomavirüs karşı T-antijenli transgenik farelerde gelişen testis tümörlerine karşı eksprese edildiği bulunmuştur (Lebel ve Mes-Masson 1994). SERINC3'ün tüm fare dokularında eksprese edilmiş olmasına rağmen bazı insan hücre hatlarında, farklı tümör türevli dokularda daha yüksek ekspresyonunun belirlenmesi, bu gen ailesinin başlangıçta TDE (tümör diferansiyel olarak eksprese edilen gen) olarak adlandırılmasını sağlamıştır (Lebel ve Mes-Masson 1994). Daha sonrasında ise, yakından ilişkili transmembran anahtar (TMS) proteinlerini kodlayan bir gen ailesi olduğu öne sürülerek ek homolog gen dizileri tanımlanmıştır (Grossman ve ark., 2000). SERINC5'i kodlayan transkript ilk olarak kültürlenmiş sıçan pro-oligodendrositlerinde tanımlanmıştır. SERINC5'in aksine SERINC1'in insan akciğer ve karaciğer kanserlerinde görüldüğü bildirilmiştir (Ren ve ark., 2014).

DNA dizi veritabanları SERINC genlerinin, bitkiler ve maya dahil olmak üzere tüm ökaryotlarda gözlemlenebilir olduğunu ortaya çıkarmıştır. *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster*'da sadece bir SERINC geni bulunmasına rağmen, daha gelişmiş ökaryotlarda beş kopyası (SERINC1-5) bulunmaktadır (Firrito ve ark., 2018). SERINC2-4, esansiyel olmayan bir polar amino asit olan serini hücre zarlarına dahil eder ve serinden türetilmiş iki lipidin, fosfatidilserin ve sfingolipidlerin

sentezini kolaylaştırır (Chu ve ark., 2017; Trautz ve ark., 2017).SERINC ailesinin topolojik yapısı, amino asit taşıyıcılarına benzer şekilde 10-11 transmembransegment içerir(Qiu ve ark., 2020). Ayrıca SERINC ailesi üyeleri, uzunlukları yaklaşık 30 amino asitten oluşan ve %53-%58 hidrofobik olan 11 bölgeye kümelenmiş zar domainlerinden oluşurlar (Inuzuka ve ark., 2005). SERINC'ler içerisinde en yakından ilişkili olan SERINC4 ve SERINC5 ile filogenetik olarak ilişkili iki grup olarak görülmektedir. İnsanlardaki SERINC genleri için çoklu izoformlar rapor edilmiştir, ancak bunlardan sadece SERINC5 varyantının stabil bir proteini kodladığı bulunmuştur (Zhang ve ark., 2017). Ökaryotlarda SERINC genlerinin varlığı, bu genlerin karmaşık organizmaların hayatta kalması ve evrimi için temel bir rolü veya rolleri olduğunu düşündürmektedir. SERINC genlerinin tümör progresyonundaki rolleri göz önüne alındığında, kanser hücrelerinde yüksek ekspresyona dayalı oldukları varsayılmıştır (Tay ve ark., 2011).

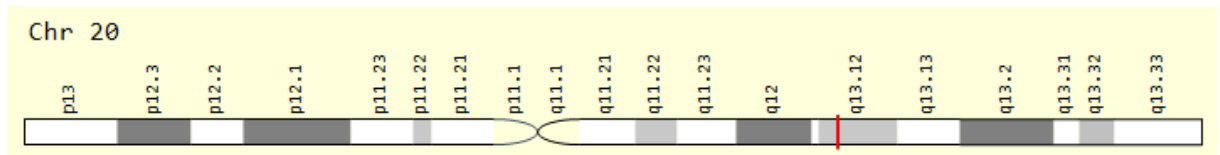
SERINC5'in antiretroviral aktivitesinin keşfi, primat lentivirüslerdeNef (negatif düzenleyici faktör) çalışmasıyla ortaya çıkarılmıştır. Nefin virüs partikülü enfektivitesiniinhibe eden zarla ilişkili hücre tipine özgü bir aktiviteyi hedeflediği bilinmekle birlikte SERINC'lerinde bu yönde etkinliğinin olabileceği tahmin edilmektedir (Sharma ve ark., 2018). SERINC5'in insan SERINC genleri arasındaki en güçlü antiviral aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bunun aksine SERINC2'nin HIV enfektivitesini değiştirme yeteneği bulunmamaktadır (Zutz ve ark., 2020). SERINC1 ve SERINC3'ün HIV'in orta düzeyde inhibe ettiği belirlenmiştir ve SERINC4'ün de aynı zamanda güçlü bir antiviral aktivite taşıdığı ortaya çıkartılmıştır, bu sonuç SERINC5 ile filogenetik olarak yakınlığının bir göstergesi olarak yorumlanmıştır (Schulte ve ark., 2017). Bununla birlikte, SERINC4'ün rolü hakkında bilgiler henüz kısıtlıdır, çünkü bugüne kadar mevcut olan gen ekspresyonu veri setleri incelendiğinde, proteini kodlayan mRNA'nın eksprese edildiğine dair herhangi bir doku tespit edilememiştir (Kosti ve ark., 2016).

SERINC3 ve 5'in, retrovirüslere ve hepatit B virüsüne (HBV) karşı kısıtlama faktörleri olarak tanımlanmışlardır (Matheson ve ark., 2015; Liu ve ark., 2020). Bununla birlikte, son zamanlarda SERINC4'ün HIV'e karşı antiviral etkisi de kanıtlanmıştır (Qiu, X ve ark., 2020). Daha da önemlisi de, SERINC ailesinin tüm üyelerinden sadece SERINC3, 4 ve 5 kısıtlama faktörleridir ve viral birleşmeyi bloke ederek viral enfeksiyonu önleme yeteneğine sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır (Timilsina ve ark., 2020; Xu ve ark., 2022). SERINC3 ve 5, insan periferik kan mononükleer hücrelerinde yüksek oranda eksprese

edilirler ve bunun sonucunda da viryonlara dahil olurlar ve virüsün yeni hedef hücrelerle bağlanmasını inhibe ederler (Sood ve ark., 2017).

1.8.1.SERINC 3

SERINC3 (Serine Incorporator 3), insan 20. kromozomu üzerinde bulunan (20q13.12), yaklaşık 25.850 nükleotidden oluşan 11 ekzon bölgesi içeren bir gendir (Şekil 1.4). L-serin transmembran taşıyıcı aktivitesini etkinleştirebileceği tahmin edilmektedir (Samaržija ve ark., 2023). Virüslere karşı virüs tespiti ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisi oluşmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Golgi aparatında bulunduğu ve membranda aktif olduğu bildirilmektedir (Liu ve ark., 2021; Timilsina ve ark., 2022). SERINC3, spastik paralizi ve otozomal resesif hastalıklar ilişkili bir protein kodlama genidir (Hedera, 2021; Timilsina ve ark., 2022). Viralpartikülün sitoplazmaya penetrasyonunu bozmakla ilişkilendirilmiştir. HIV-1 gibi lentivirüslerin enfektivitesini kısıtlamak için gerekli kısıtlama faktörü olarak viralenfeksiyonun erken bir aşamasını inhibe ederek etki eder. SERINC3, polyomavirüs büyük T antijeni transgenik farelerin testis tümörlerinde yüksek oranda eksprese edilir (Bossolasco ve ark., 1999). Ayrıca SERINC3, akciğer tümörlerinin ve kolorektal tümörlerin gelişimini etkiler (Nimmrich ve ark., 2000).



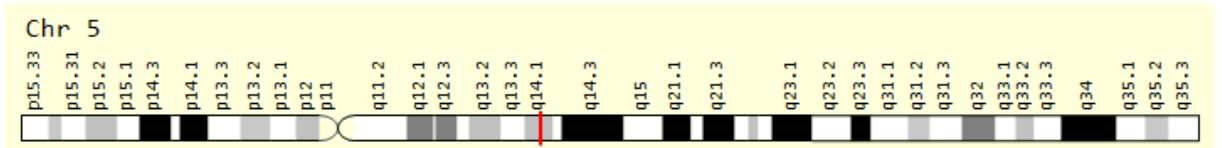
Şekil 1.4. SERINC3 gen bölgesinin insan 20. kromozomundaki konumu (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERINC3>)

1.8.2.SERINC 5

SERINC5 (Serine Incorporator 5), insan 5. kromozomu üzerinde bulunan (5q14.1), yaklaşık 144.824 nükleotidden oluşan 18 ekzon bölgesi içeren bir gendir (Şekil 1.5). SERINC5 ilk olarak kültürlenmiş sıçan oligodendrositlerinde ve fare beyin dokularında tanımlanmıştır, bu da merkezi sinir sisteminde olası bir biyolojik rolüne işaret eden en belirgin gözlemdir (Krueger ve ark., 1997; Grossman ve ark., 2000). SERINC3 gibi SERINC5’inde L-serin transmembran taşıyıcı aktivitesini etkinleştireceği tahmin

edilmektedir. Ayrıca Virüslere karşı virüs tespiti ve doğuştan gelen bağışıklık tepkisi oluşmasında görevli olduğu düşünülmektedir. Sentrozomdahil olmak üzere çeşitli hücresel bileşenlerde (sitozol ve plazma zarı) bulunur. SERINC5, protein kodlayan, genom çapında bir ilişkilendirme çalışması, insan SERINC5 SNP'lerinin borderline kişilik bozukluğu ile bir ilişkisi olan bir gendir (Lubke ve ark., 2014). Bununla birlikte, insan SERINC5'in doku özgüllüğü düşüktür ve plasenta, iskelet kası, dalak, timus, testis, lökositler, kalp ve karaciğer dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilir (Xu ve ark., 2003). İnsan SERINC5 çoklu ek izoformlarını kodlarken, yalnızca en uzun SERINC5 transkript varyantı 10 transmembran alandan (TM) oluşan kararlı bir proteini kodlar (Zhang ve ark., 2017). Bu genin önemli bir paralogu SERINC4'tür. Viral partikülün sitoplazmaya penetrasyonunu bozar. Serinin fosfatidilserin ve sfingolipidlerde dahil edilmesini artırır.

Oligodendrositlerde miyelinlik sfingolipidlerin oluşumu için serin moleküllerinin sağlanmasında rol oynayabilir. SERINC5'in virüsler tarafından enfektiviteyi inhibe etmek üzere kendisini plazma zarına lokalize etmesi için, ekstra bir c-terminal transmembran alanı sahiptir. Bu ekstra transmembran alan, proteinin kendisini kararlı bir şekilde ifade etmesine izin verir (Zhang ve ark., 2017). SERINC protein ailesinin 5 üyesinden en çok çalışılan SERINC5'tir. SERINC5'in fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamış olsa da, SERINC5 son zamanlarda çok sayıda virüsü hedef alan bir antiviral faktör olduğu düşünülmektedir.



Şekil 1.5. SERINC5 gen bölgesinin insan 5. Kromozomundaki konumu (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SERINC5>)

1.9. SERINC 3 ve SERINC 5'in virüslere karşı etkileri

SERINC (1-5) ailesinin tüm üyelerinden sadece SERINC3 ve SERINC5, viral enfeksiyonu viral döngünün erken bir aşamasında inhibe etme, viral birleşmeyi inhibe etme ve kısıtlama faktörleri olarak hareket etme yeteneğine sahiptir (Rosa ve ark., 2015; Usami ve ark., 2015). SERINC3'ün izoformları yoktur ve doğrudan hücre zarına taşınır. SERINC5 proteini, alternatif ekleme ile üretilen beş izoforma sahiptir. Bunlar, terminal karbon ucunda ve transmembran alanlarından kaynaklanan farklılıklardan oluşmuştur. SERINC5-001

izoformunun 10 transmembran alanı vardır, yalnızca bunlar hücre zarındadır ve HIV enfektivitesinininhibisyonunda rol oynarlar (Gonzalez-Enriquez ve ark., 2017). SERINC5'in antiretroviral aktivitesinin keşfi, Negatif faktör'ün (Nef) primat lentivirüslerde çalışılmasıyla bağlantılıdır. Nef geni, çoğu in vitro koşullarda viralreplikasyon için vazgeçilmez olan ancak in vivo olarak hastalığın ilerlemesi için çok önemli olan 27-kDa miristoillenmiş (miristoil:proteinin iç kısmında yer alan sisteine bağlı palmitoil grubu) bir proteindir. Çeşitli aktiviteleri arasında Nef, hücrelerin aktivasyon durumunu modüle eder, hücre iskeletini manipüle eder, reseptörlerin yüzey ifadesini değiştirir ve virüs partiküllerinin enfektivitesini artırır (Vermeire ve ark., 2011). SERINC5'in antiviral aktivitesi, Nef tarafından etkisiz hale getirilir (viryonlara dahil edilmesinde bir azalmaya yol açarak), çünkü Nef onu plazma zarından çıkarır ve sonrasında bozunması için endozomlarda tutar (Usami ve ark., 2015).

SERINC3 ve SERINC5'in Nefdelesyonu ile HIV-1 içeren hücre kültürlerinde viralenfektiviteyiinhibe etme yeteneği, genomik ve proteomik araçlarla gösterilmiştir (Liu ve ark., 2020). Bununla birlikte SERINC5, viralinhibisyon kapasitesi açısından SERINC3'ten daha güçlü olduğu bilinmektedir. SERINC5'in HIV enfektivitesini %50 ila %90 aralığında azaltırken, SERINC3 enfektivitede yalnızca %20'lik bir azalma gösterdiği belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2017).

SERINC3 ve SERINC5'in viralenfektiviteyiinhibe etmek için hareket ettiği kesin mekanizma hala bilinmemektedir ve SERINC5 kısıtlama aktivitesine aracılık eden Nef'e ek olarak başka elementler de varlığı bilinmektedir (Trautz ve ark., 2016). Virüslerin taşıdığı zarf glikoproteinlerinin bazıları, SERINC3-5'in yapacakları aktiviteye karşı koyabilen ve buna direnebilen diğer belirleyicidir ve bu, HIV-1 ile enfekte olmuş bazı hücrelerde SERINC5'in neden birleşmeyi bloke etmediğini açıklayabileceği söylenmektedir (Sood, ve ark., 2017). Bu nedenle, Nef ve glikoproteinlerinin, SERINC3-5'e karşı koymak için farklı mekanizmalarla hareket edebileceği düşünülebilir (Beitari ve ark., 2017). Buna mekanizmaya örnek olarak, SERINC5'in lipit difüzyonunu kısıtlayarak ve/veya zarların sertleşmesini tetikleyerek, viral partiküllerin hareketliliğinin azalmasına yol açar ve bunların birleşmeyi kesintiye uğratarak büyük oligomerler oluşturmak üzere hareket etmesi şeklinde olduğu varsayılmaktadır (Sood ve ark., 2017).

Yakın zamanda SERINC5'in, bir SARS-CoV-2 yardımcı proteini olan ORF7a'nın yokluğunda Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2 (SARS-CoV-2) enfektivitesini kısıtladığı bulunmuştur (Timilsina ve ark., 2022). Son çalışmalar, SERINC5'in influenza A

virüsü (IAV) enfeksiyonunu da inhibe ettiğini bildirmiştir, ancak SERINC5'in antiviral etkisine karşı koymak için hiçbir viral protein tanımlanmamıştır (Zhao ve ark., 2022). Ayrıca hepatit B virüsü (HBV) ve klasik domuz gribi virüsünün (CSFV) SERINC5 tarafından bloke edildiği bulunmuştur (Li ve ark., 2020). Yine de SERINC3 ve SERINC5'in gerek mekanizmalarının anlaşılması gerekse virionların bağlanması için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



2. TEZİN AMACI VE ÖNEMİ

COVID-19 tüm dünyaya yayılarak küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Milyonlarca insanın enfekte olmasına sebep olan bu hastalıkla ilgili dünya literatüründeki bilgiler kısıtlıdır ve hala birçok çalışma yapılmaktadır. Bizim bu çalışma ile amacımız, SARS-CoV-2 geçiren hastalardaki SERINC3 ve SERINC5 gen bölgelerindeki farklılıkları moleküler düzeyde ortaya çıkarmaktır. Böylelikle bağışıklık sistemini etkileyen bu virüse karşı farklı immün yanıtlara sahip birlerdeki farklılıkların ortaya çıkartılması hedeflenmektedir.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmada, SARS-CoV-2 enfeksiyonu yönünden pozitif çıkan bireylerden 5 ml'lik EDTA'lı tüplere alınan kan materyalleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılacak örnekler başta Tunceli olmak üzere yakın illerden temin edilmiştir. Ayrıca bahsi geçen örneklerden daha önceden belirlenmiş daha önce bu hastalığa yakalanmamış 2'şer örnek toplanmıştır. Kan alma işleminde sterilizasyona azami derecede dikkat edilmiştir. Kan alınan tüpler alt-üst ettirilerek kanın EDTA ile iyice karışması sağlanmıştır ve her bir tüp laboratuvara gelene kadar buz kaplarında muhafaza edilmiştir. Tüplerin birbiri ile karıştırılmaması için bireyler numaralandırılmıştır. Yaş ve cinsiyet yazılarak her birey kodlanmıştır. Ayrıca bireylerin kan grupları da çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. DNA ve RNA İzolasyonu

Laboratuvara getirilen örnekler DNA ve RNA izolasyonu gerçekleştirilene kadar sıvı azot ile dondurularak -80 C de saklanmıştır. Ayrıca RNA izolasyonu için kan örnekleri yarı yarıya RNAlater® (Life Technologies Kat.No: AM7021) içinde -80 °C'de saklanmıştır. RNAlater® çok kırılgan nitelikteki RNA'yı korumak için kullanılmıştır.

3.3. DNA İzolasyonu

Kandan DNA izolasyonu QiagenDNeasy Blood &Tissue DNA kiti (Kat.No: 69581) kullanılmıştır, üretici firmanın protokolüne uyularak yapılmıştır. Sonuç alınamaması veya saflık ve konsantrasyonunun yetersiz kalması durumunda manuel olarak standart amonyum asetat ile çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Miller ve ark. 1998). DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (Thermo-NanoDropOne/One^e) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. 260 nm DNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorbans verdiği dalga boylarıdır. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmıştır ve 1.8-2.0 arasındaki değerlerde DNA örnekleri saf kabul edilmiştir. İzolasyonu istenilen saflıktaki DNA örnekleri PCR uygulaması için – 20 C de saklanmıştır (Resim3.1).

3.4. RNA İzolasyonu

RNAlater® kiti ile -80 °C’de korunan kan örneklerinden total RNA izolasyonun için , RNeasy Mini Kit (Qiagen, Kat. No: 74104) kullanılmıştır, üretici firmanın protokolüne göre yapılmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirilen örneklerdeki DNA kontaminasyonunu önlemek için DNaz enzimi veya DNA’seTreatment Kiti (DNA-free™ Kit DNaseTreatmentandRemovalReagents, Kat. No: AM1906) kullanılmıştır. RNA kantitatif olarak A260/A280 değerleri kullanılarak Nanodrop’da değerlendirilmesi yapılmıştır. RNA örnekleri sıvı nitrojenle aniden dondurularak, -80 °C’de saklanmıştır (Resim3.1).



Şekil 3.1. DNA ve RNA izolasyon basamakları. A: Kan örnekleri, B, C, D: Örneklerin hazırlanması ve izolasyonu

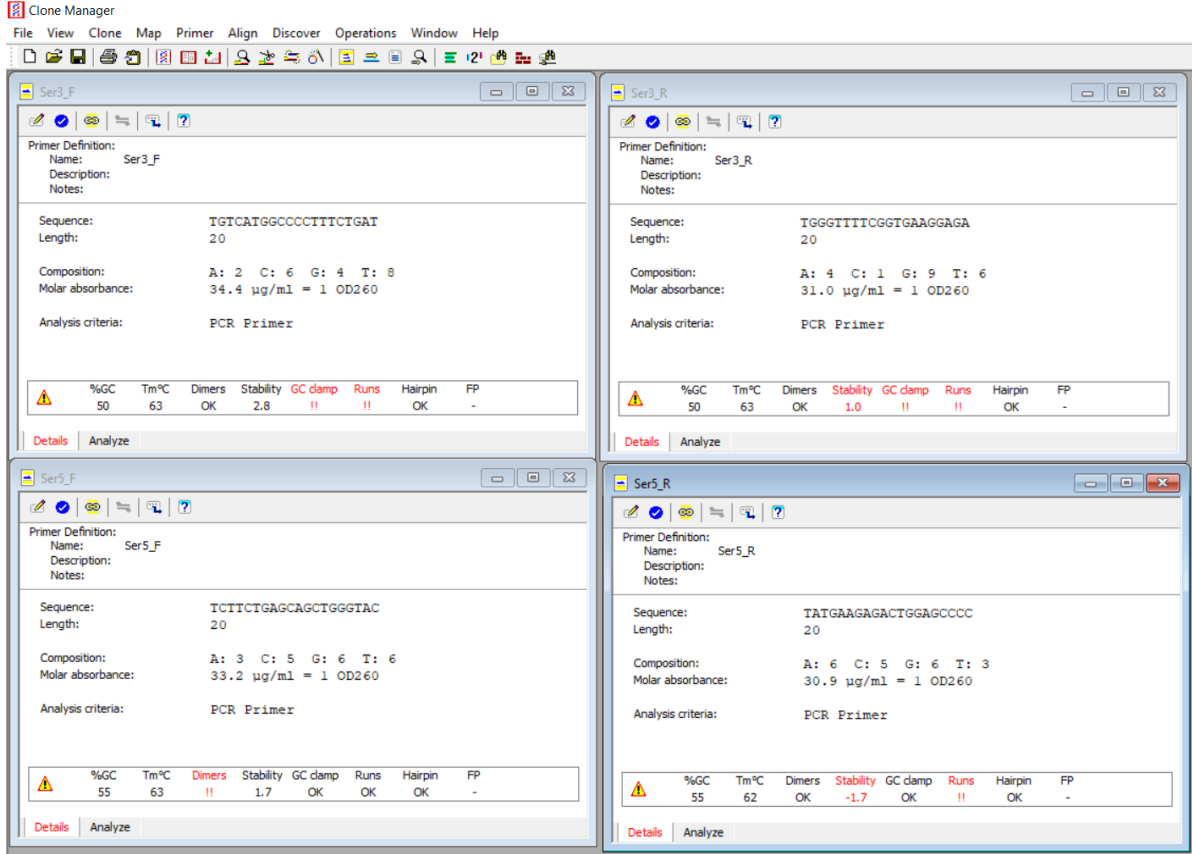
3.5. Gen Bölgelerinin Moleküler Analizi

3.5.1. Primer Dizaynı ve PCR

NCBI'daki referans Human genomunun nükleotid dizisi Clone Manager 9 programına (Resim 3.2) indirilerek SERINC bölgesindeki hedef gen bölgeleri belirtilmiştir, bu bölgelere özgü primerler Primer3web version 4.0.0 (<http://primer3.ut.ee/>) kullanılarak yapışma sıcaklıkları ve GC oranlarına dikkat edilerek tasarlanmıştır (Tablo 3.1). Herhangi bir primer bölgesinin çalışmaması durumunda alternatif primerler tasarlanarak kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Primer listesi

GAPDH-Forward 5'-ATGACATCAAGAAGGTGGTG-3'
GAPDH-Reverse 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTG-3'
mSerinc3-Forward 5'-AATGAACCTGAGCGGTCCTG-3'
mSerinc3-Reverse 5'-GCATAGGCAGGAGCAAGAGT-3'
mSerinc5-Forward 5'-AAAAGTTGCCGGGCCTACAT-3'
mSerinc5-Reverse 5'-CCCACATAGCGCCAGACTTT-3'
SERINC3-Forward 5'-AATTCAGGAACACCAGCCTC-3'
SERINC3-Reverse 5'-GGTTGGGATTGCAGGAACGA-3'
SERINC5-Forward 5'-ATCGAGTTGTGACGCTCTGC-3'
SERINC5-Reverse 5'-GCTCTTCAGTGTCCTCTCCAC-3'



Resim 3.1. Clone Manager 9 primer Tm değeri hesaplamaları

PCR işlemi toplam 40 μl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için; 4 μl buffer (10X) [500 mM Tris-HCl (25°C’de pH8.0), 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT], 1 μl dNTP (1 mM), ileri ve geri primerlerden 1’er μl (20 pmol), 0.5 μl DNA polimeraz (5 u/μl) [25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT ve %50 (v/v) gliserol], 1 μl kalıp DNA (~400 ng/ml) ve 40 μl’ye tamamlamak üzere 31.5 μl dH₂O ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

3.5.2. Sekans Dizilimi

Gen bölgelerin agaroz jelde teyit edilmesiyle, PCR ürünleri iki yönlü olarak Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi bünyesindeki 3130xl DNA dizileme aleti ile sekanslanmıştır. Sekanslama işlemi; Sephadex kolon yardımıyla temizlenen PCR ürünleri BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem) kullanılarak PCR (Cycle Sequence) yapılmıştır (2 μl DNA, 1 μl primer (3,2 pmol/ ml), 1 μl BigDye Terminator V1.1, V3.1 5x Sequencing Buffer, 2 μl BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing RR-100, 4 μl ultra saf su). Daha sonra karışım PCR cihazına yerleştirilerek ve cihaz 96 °C de 1 dakikada

1 döngü, 96 °C de 10 saniye, 50 °C de 5 saniye, 60 °C de 4 dakikada 30 döngü ve 4 °C de bekletilecek şekilde ayarlanmıştır. DNA dizileme öncesi 10 µl PCR ürünlerini saflaştırmak için Sefadex G-50 (Sigma-Aldrich) kolonlar kullanılmıştır. Bu amaçla, 1gr Sephadex G-50 ile 15 ml ultra saf su 5 dakika çözünecek ve boş spin kolonlara 650 µl eklenilmiştir. Yarım saat beklendikten sonra 4800 rpm'de 2 dakika santrifüj edilecek ve süpernatantlar uzaklaştırıldıktan sonra 10 µlpcr ürünleri Sephadex kolonundan 5400 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek kullanılmıştır. Kolondan geçen PCR ürünlerinden 10 µl 96'lık platelerin dip kısmına aktarılacaktır. Platelerde aynı hizada olmayan örnekler Hi-Di TM formamide (AppliedBiosystems) ile tamamlanmıştır. Daha sonra plate dizileme cihazına (3130x Genetic Analyzer, AppliedBiosystems) yerleştirilerek, 3130 pop-7 TM PerformanceoptimizedPolymeri kullanılarak DNA dizilimleri gerçekleştirilmiştir. Bahsedilen işlemler üzerinden DNA dizileme işlemi hizmet alımı şeklinde yapılmıştır. 3130xl DNA dizileme cihazı üniversitemiz bünyesinde bulunmadığı için dolayı hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Bunun dışındaki tüm işlemler laboratuvarında yapılmıştır.

3.6. Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi ve Dataların Değerlendirilmesi

3.6.1. Gen dizianalizleri

Sekans dizisi belirlenen gen bölgesi bugüne kadar belirlenmiş genlerden farklılık ve benzerliklerinin bulunması için NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) başta olmak üzere, Sanger (<http://pfam.sanger.ac.uk>) ve Uniprot (<http://services.uniprot.org/blast/blast-20100729-0748405592>) gibi farklı veri tabanlarında da incelenmiştir. Ayrıca sekans dizisi hakkında bilgi edinmek ve belirli formatlara (Fasta, Java v.b.) dönüştürmek için BioEdit, Clone Manager 9, Treeview, AppliedBiosystems DNA Sequencing Analysis Software v5.1 gibi bilgisayar üzerindeki programlardan yararlanılırken, internet tabanlı NCBI Blast, ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>), Expasy (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) programları kullanılmıştır. Bu açıdan elde edilen dizi bilgileri, daha önceden çalışılmış ve NCBI'a girilmiş genlere benzerliği yönünden araştırılmıştır. Bunu için BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) programı kullanılmıştır (Altschul ve ark., 1997). Genlerin çoklu dizilenmesiClustalX programı (Thompson ve ark., 2003) ve ClustalW2 - MultipleSequenceAlignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) ile gerçekleştirilmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar SplitsTree4 programı (Huson ve Bryant,

2005) yardımı ile Kimura2 parametresi kullanılarak NeighbourJoining (NJ) (Saitou ve Nei, 1987) veya UnweighedPairGroupMethod of AritmeticAverages (UPGMA) metodları (Davis ve ark., 2004) ile dendrogram elde edilmiştir. Bunun dışında DNASP V4.10 programı (Rozas ve ark., 2003) kullanılarak gen dizilimleri Mega formatına dönüştürülerek ve MEGA 6 programında (Tamura ve ark., 2013) Jukes-Cantorparametrisi ile NJ veya UPGMA metodları ile dendogramları elde edilmiştir. Elde edilen dizi sonuçları belirtilen paket programlar ve belirtilen yöntemlerle belirli gruptaki dizi sonuçları ve GenBank'tan alınan dizi sonuçları ile birlikte analiz edilerek, oluşan gruplara ve elde edilen dallandırma sistemlerine göre sonuçlar yorumlanmıştır.

3.6.2. Gen ekspresyonlarının belirlenmesi

Gen ekspresyon seviyelerinin belirlemek için, DNA ve cDNA sekans analizlerinden elde edilen veriler kullanılarak Real-Time Sybr Green yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Sybr Green PCR için seSybr Green Master Mix'den (Qiagen, Hilden, Germany) faydalanılacak ve amplifikasyon prosedürü üretici firmanın bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. Real-time PCR işlemleri laboratuvarımızda bulunan Rotor-Gene® Q sistemi (Qiagen) ile yapılmıştır. qPCR reaksiyonu, 10 µl Rotor-Gene Probe PCR Kit veya TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) (2X), ileriprimeri (10 µM) 1 µl, geriprimeri (10 µM) 1 µl, prob (5 µM) 0.5 µl, DNA (100 ng/µL) 7.5 µl ve H₂O 5 µl eklenerek toplam 20 µL hacimde yapılmıştır. PCR şartları; 50°C'de 2 dakika, 95°C'de 10 dakikave 50 döngü, 95°C 15 saniyeve 60°C'de 1 dakika şeklinde yapılmıştır. Real Time PCR metodunun bileşenlerinin konsantrasyonu ve PCR şartları gerektiğinden odifiye edilerek optimize edilmiştir. Bütün reaksiyonlar da güvenilirliği control etmek için hedef DNA (mikrobiyal) içermeyennegatifkontrollerkullanılmıştırveayrıcatekrarlanabilirliği test etmek amacıyla kit deneyleri en az 3 tekrar yapılmıştır.

Genlerine kspresyon ilişkisi için sığırlarda house keeping bir gen olan GAPDH (Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz) referans geni kullanılmıştır (Tablo 1). Housekeeping genlerininbütünhücrelerdekiüretimininsabitolmasındanyararlanılarak gen ekspresyonlarının kıyaslanmasında kullanılmıştır (Barber ve ark, 2005). Çalışma sonunda elde edilen Ct değerleri Gene Globe program ile analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin verileri GAPDH geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirilmiştir (Pfaffl, 2001). Ekspresyon kat değişimi analizi için gruplar parametrik

olmayan Mann-Whitney testi ile analize dilerek ve $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.7. Etik Kurul Onay Bilgileri

Etik kuruladı: FIRAT ÜNİVERSİTESİ Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

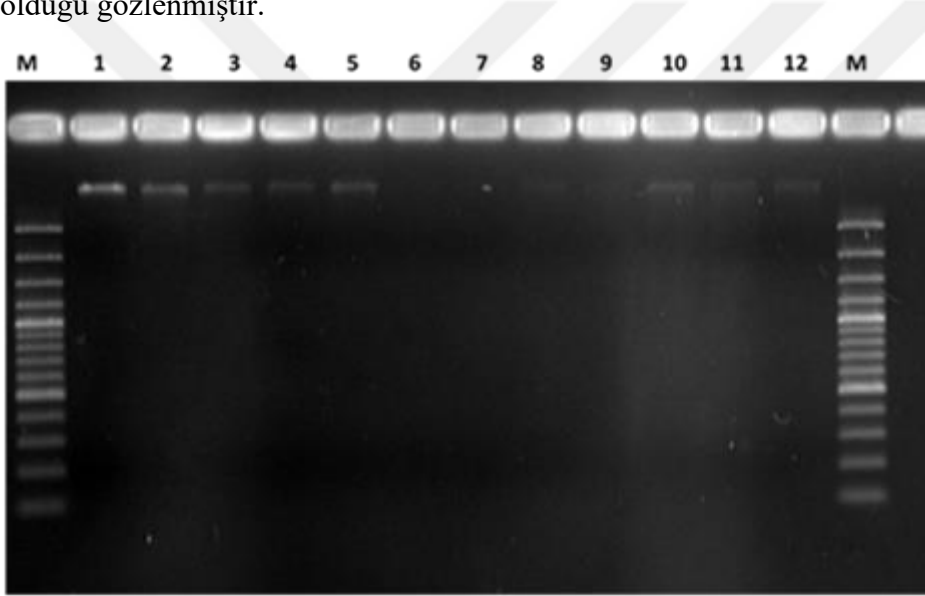
Etik kurul kararının sayısı: 2022/07-12



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kan Örneklerinden Genomik DNA ve RNA İzolasyonu

Materyal ve metot'da 3.3 ve 3.4'de tanımlandığı gibi elde edilen örneklerden DNA ve RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Resim 4.1). DNA örneklerinin izolasyon etkinliği %1'lik agaroz jel elektroforez ile kanıtlanırken (Resim 4.1), RNA için nanodrop okuması yapılarak saflık ve konsantrasyonu belirlenmiştir (Tablo 4.1). DNA ve RNA örneklerinin genotiplendirme analizlerinde kullanılabilecek kalitede saflığa ve konsantrasyona sahip olduğu gözlenmiştir.



Resim 4.1. Kandan elde edilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

Tablo 4.1. RNA izolasyonu sonucunda elde edilen örneklerin bir kısmının saflık ve konsantrasyonu

Hasta Numarası	Cinsiyeti	Konsantrasyonu	Birimi	Saflığı OD (260/280)
H1	Bayan	115,3	ng/μl	2,22
H2	Bayan	207,7	ng/μl	2,29
H3	Bayan	246,9	ng/μl	2,64
H4	Bayan	72,7	ng/μl	2,23
H5	Bayan	96	ng/μl	2,4
H6	Bayan	133,5	ng/μl	2,28
H7	Bayan	7,4	ng/μl	2,6
H8	Bayan	93,8	ng/μl	2,46
H9	Bayan	109,9	ng/μl	2,46

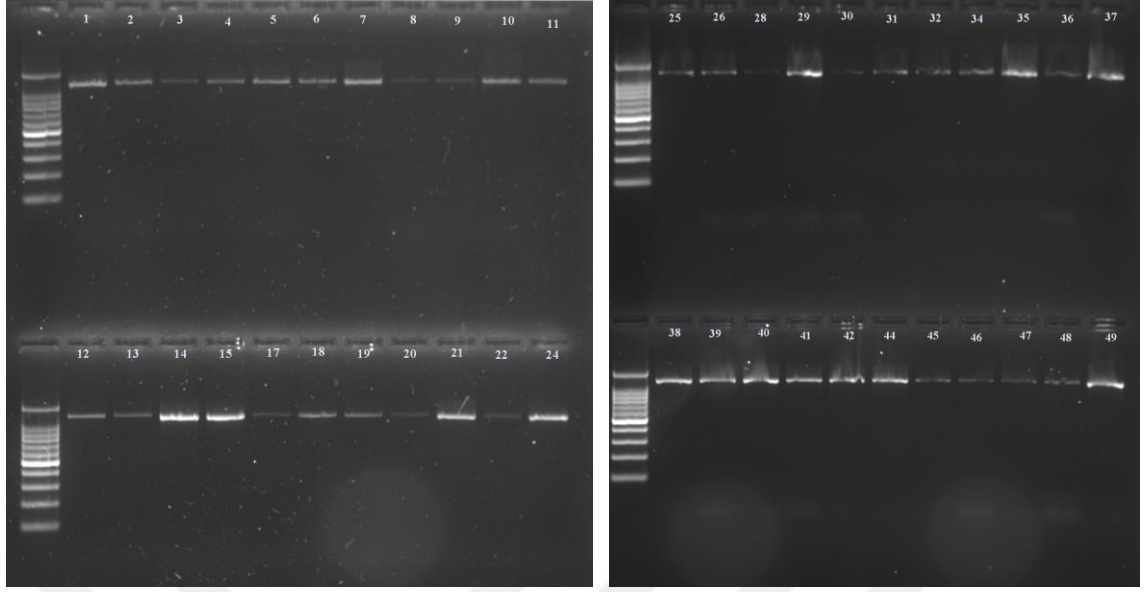
H10	Bayan	132,7	ng/ μ l	2,42
H11	Bay	51,4	ng/ μ l	2,42
H12	Bay	89,8	ng/ μ l	2,43
H13	Bay	63,3	ng/ μ l	2,42
H14	Bay	86,6	ng/ μ l	2,2
H15	Bay	139,7	ng/ μ l	2,23
H16	Bay	200,9	ng/ μ l	2,27
H17	Bay	159,1	ng/ μ l	2,24
H18	Bay	165,5	ng/ μ l	2,24
H19	Bayan	125,1	ng/ μ l	2,23
H20	Bay	222,7	ng/ μ l	2,29

4.2. SERINC3 ve SERINC5 Gen Bölgelerinin PZR Optimizasyonu

Hasta örnekler için belirlenen genlerle ilgili NCBI’da hiçbir dizi bulunmamasından dolayı, kullanılan uluslararası genom veri tabanından elde edilen GRCh38.p14 dizisi kullanılarak tasarlanan primerler ile konvansiyonel PZR amlifikasyon çalışmaları yürütülmüştür. 3.5.1’de bahsedilen şekilde tasarlanan primer çiftleri ve gradient PZR işlemi tüm gen ekzonlarına (SERINC3 ve SERINC5) uygulanmıştır. Primer sıcaklıklarının belirlenmesi için yapılan gradient PZR ile primer sıcaklıkları tam olarak belirlenmiştir.

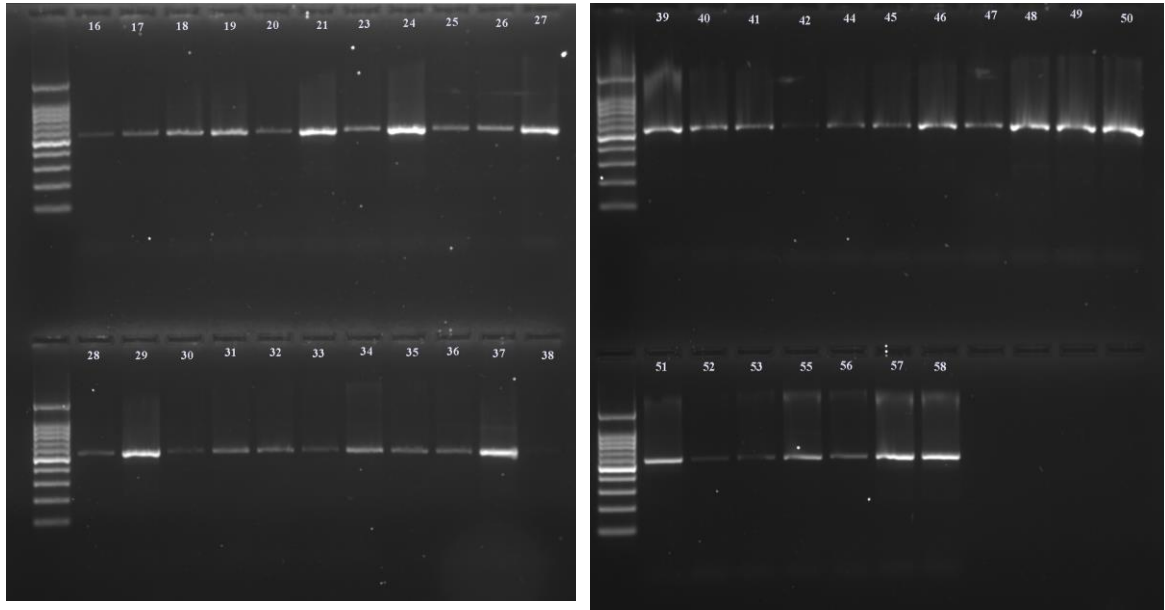
4.3. ERINC3 ve SERINC5 PZR Amplifikasyon Sonucu

Hasta örneklerindeki **SERINC3 ve SERINC5** gen bölgesini oluşturan intron I, ekzon II ve intronIII için 3.5.1.’de bahsedilen şekilde tasarlanan primerler kullanılarak (Tablo 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.5.1.’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Resim 4.2). Hedef bölge yaklaşık 1109 bp uzunluğunda lineer bir bölgedir.



Resim 4.2. SERINC3 Gen bölgesi PCR sonucu (M=1 kb)

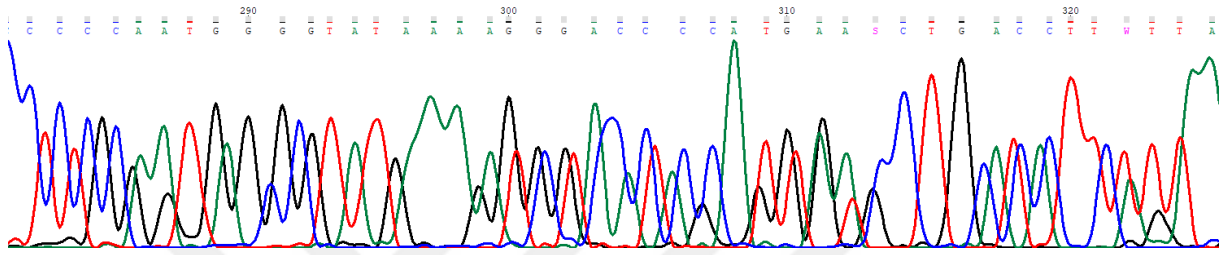
Hasta örneklerindeki **Serinc5** gen bölgesini oluşturan ekzon II ve intronII için 3.5.1’de bahsedilen şekilde tasarlanan primerler kullanılarak (Tablo 3.1) PZR işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonu, 3.5.1’de detaylandırılan PZR şartları kullanılarak yapılmış ve çoğaltılan bölge % 1,5’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Resim 4.3). Hedef bölge yaklaşık 517 bp uzunluğunda lineer bir bölgedir.



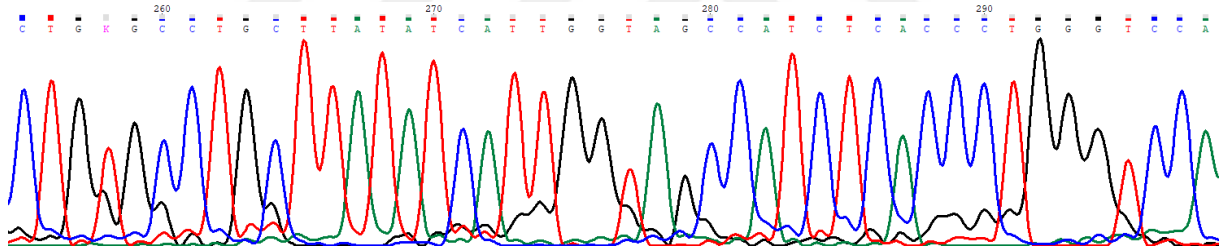
Resim 4.3. SERINC5 Gen bölgesi PCR sonucu (M=1 kb)

4.4. SERINC3 ve SERINC5 DNA Dizileme Sonuçları

SERINC 3 ve SERINC 5 bölgesinin her iki zinciri de ileri ve geri primerleri kullanılarak 1109 bp ve 517 bp uzunluğundaki her iki bölgenin de nükleotid dizisi belirlenmiştir. Tüm örneklerden elde edilen dizi bilgileri farklı formatlarda kaydedilmiştir. 3.6’da ayrıntılı bir şekilde bahsedildiği gibi hedef bölge için farklı olarak düşünülen örneklerin kromatogramlarına bakılarak SERINC3 ve SERINC 5’in konsensüs dizileri belirlenmiştir.



Şekil 4.1. SERINC3 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir

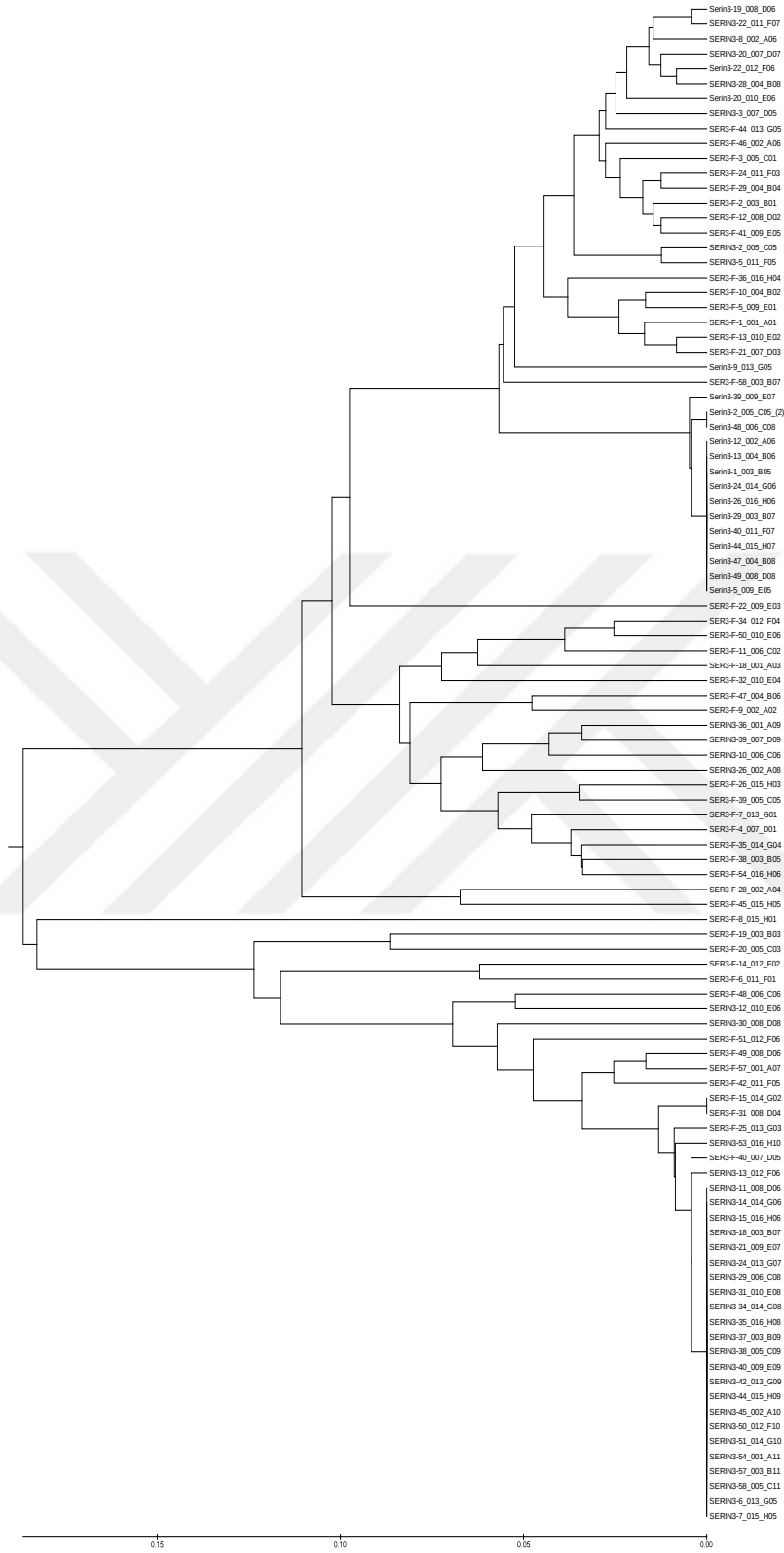


Şekil 4.2. SERINC5 bölgesinin ileri primer ile elde edilen dizilime ait kromatogram görüntüsünün bir kısmı örnek olarak gösterilmiştir.

4.5. SERINC3 ve SERINC5 Gen Bölgelerinin Filogenetik Analizi

Covid hastaları için oluşturulan filogenetik ağaçlar Neighbor-Joining (NJ) yöntemi, Jukes–Cantor modeli ve Bootstrap metoduna (1000) dayanmaktadır. Dallar üzerinde gösterilen değerler bootstrap değerleridir. Konsensüs dizileri filogenetik ilişkileri bakımından referans diziye göre nükleotid ve amino asit dizisi ayrımı serinc3 için %30 serinc5 için %40 hesaplanırken mRNA dizisi SERINC3 için %60 ve SERINC5 %70 şeklinde belirlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Tanımlanan SERINC3 ve SERINC5 bölgesindeki SNP’ler, hastalık seyrine göre kümelenmişlerdir.

Andolfo ve ark. (2021) yaptıkları bir çalışmada COVID-19 nedeniyle hastaneye yatırılan 7.970 kişinin genetik analizleri sonucunda TMPRSS2/MX1 lokusundaki (chr.21) beş SNP'nin , şiddetli COVID-19 ile ilişkilendirmişlerdir. Elde edilen veriler bu beş SNP'nialelinin, kanda yüksek düzeyde MX1 ekspresyonu ile bağlantılı olduğu görülmüştür. MX1, hücrel antiviral yanıtta yer alan bir guanozintrifosfatmetabolize edici proteini kodlayan bir interferon- α/β ile indüklenebilen bir gendir (Ciancanelli ve ark., 2016). Konak genetik faktörlerinin COVID-19'un farklı klinik göstergelerini etkileyebileceğini ve MX1'in potansiyel bir terapötik hedef olabileceğini göstermektedir. Benzer bir durum bizim sonuçlarda da görülmektedir. Serinc3 ve 5 bölgelerindeki SNP farklılıklarının ekspresyon seviyelerindeki farklılık oluşturma potansiyelinde olduğu, bunun en belirgin göstergesi de amino asit değişikliklerindeki farklılıklar olarak gösterilebilir.



Şekil 4.3. Hastalardaki SERINC3 bölgesinin filogenetik ağacı.



Şekil 4.4. Hastalardaki SERINC5 bölgesinin filogenetik ağacı.

4.6. SERINC3 Genotip Analizi

Tunceli'deki hastalardaki kan örneklerindeki Serin3 için genomikprofiller elde edildi. Genotipleme, PCR ile üretilmiş DNA dizileri kullnılarakCodonCodeAligner programı kullanarak otomatik olarak yapılmıştır. Muhtemel olarak 671 mutasyonun 301 pozisyonunun amaino asit değişikliğine neden olduğu belirlenmiştir. Önemli görülen değişiklikler Tablo 4.2'de özetlenmiştir.

Tablo 4.2. SERINC3 gen bölgesi genotip bölgeleri ve amino asit değişikliklerinin önemli olanları

Allel	Örnek	Genetik Özellikleri	
		Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği
Heterozigot A-G	H_25, H48	G>A	Gly→Lys
		A>G	Asn→Asp
Heterozigot A-G	H_14, H15, H18, H31, H35, H54, H58	119-G>A	Arg→Lys
Heterozigot A-C	H7, H21, H50	127-A>C	Thr→Pro
Homozigot T-T	H4, H7,H11, H14, H15, H18, H25, H32, H35,H40, H45, H49, H50, H54, H58	143-G>T	Gly→Val
Heterozigot A-G	H21, H45, H49	146-A>G	Asp→Gly
Heterozigot C-T	H6, H21, H31, H50, H51, H54, H57	185-T>C	Phe→Ser
Heterozigot C-T	H4, H6, H11, H14, H18, H21, H24, H31,H32,H34, H40, H42, H45, H50, H57, H58	187-C>T	His→Tyr
Heterozigot A-C	H6, H11, H18, H21, H31, H32, H37, H38, H40, H42, H45,H50, H51, H54, H58	188-A>C	His→Pro
Heterozigot C-T	H4, H6, H11, H21, H24, H49	190-C>T	Leu→Phe
Heterozigot C-G	H7, H14, H15, H24, H25, H32, H35, H37, H38, H42, H50, H51, H54	434-G>C	Ser→Thr
		434-G>T	Ser→Ile
Heterozigot A-C	H13, H39, H40, H47,H49	574-A>C	Ser→Pro
Heterozigot C-T	H24, H39, H47, H49	857-T>C	Phe→Ser
Heterozigot C-T	H2, H39, H40, H47	860-C>T	Thr2→Phe

4.7. SERINC5 Genotip Analizi

Tunceli'deki hastalardaki kan örneklerindeki Serin5 için genomikprofiller elde edildi. Genotipleme, PCR ile üretilmiş DNA dizileri kullnılarakCodonCodeAligner programı kullanarak otomatik olarak yapılmıştır. Muhtemel olarak 333 mutasyonun 105 pozisyonunun amino asit değişikliğine neden olduğu belirlenmiştir. Önemli görülen değişiklikler Tablo 4.3'de özetlenmiştir.

Tablo 4.3. Serinc5 gen bölgesi genotip bölgeleri ve amino asit değişikliklerinin önemli olanları

Allel	Örnek	Genetik Özellikleri	
		Nükleotit Değişikliği	Amino Asit Değişikliği
Heterozigot C-T	H_1-58 (tüm örneklerde)	163-C>T	His→Tyr
Heterozigot C-G	H1, H2, H6, H9	168-C>G	Cys→Trp
Heterozigot G-T	H1, H4, H6, H8, H9	189-T>G	Asp→Glu
Heterozigot C-G	H_1-58 (tüm örneklerde)	217-C>G	Leu→Val
Heterozigot G-T	H1, H2, H3, H6, H8, H9, H11, H19, H30, H31, H40	218-T>G	Leu→Arg
Heterozigot C-G	H_1-58 (tüm örneklerde)	220-C>G	His→Asp
Heterozigot A-G	H_1-58 (tüm örneklerde)	224-G>A	Gly→Glu
Heterozigot A-T	H1, H6, H8, H9, H11, H16, H18, H25, H30, H32, H33	232-A>T	Asn→Tyr
Heterozigot A-G	H1, H5, H6, H8, H9, H11, H19	253-A>G	Arg→Gly

4.8. SERINC3 Gen ekspresyon analizi

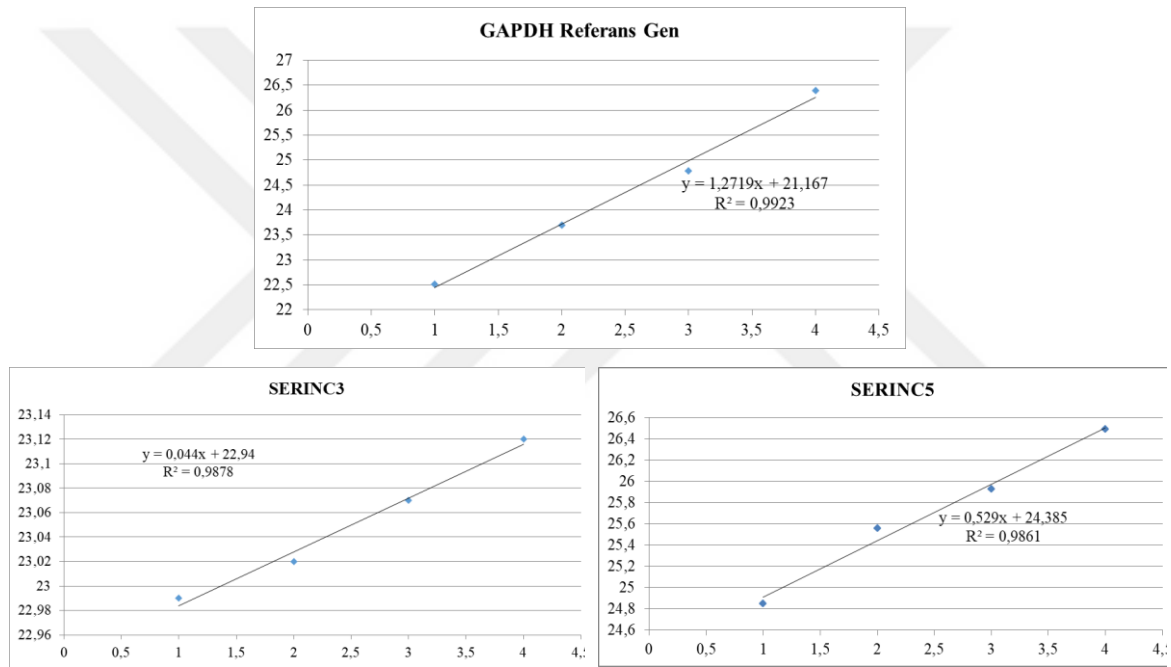
Gliseralehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), gen ekspresyon verilerinin belirlenmesinde tercih edilen standart genlerden birisidir (Bas ve ark., 2004). Hedef genler ve referans genler uygun şartlarda seyreltilerek kullanılmıştır. Her gen bölgesi için, verimlilik değerleri hesaplanmış R^2 standartları oluşturulmuştur (Şekil 4.5).

Reaksiyonların doğruluk oranlarının artırılması için her reaksiyon üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında amplifikasyon verimliliği (E) aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir.

$$E = (10^{(-1/\text{slope})} - 1) \times 100$$

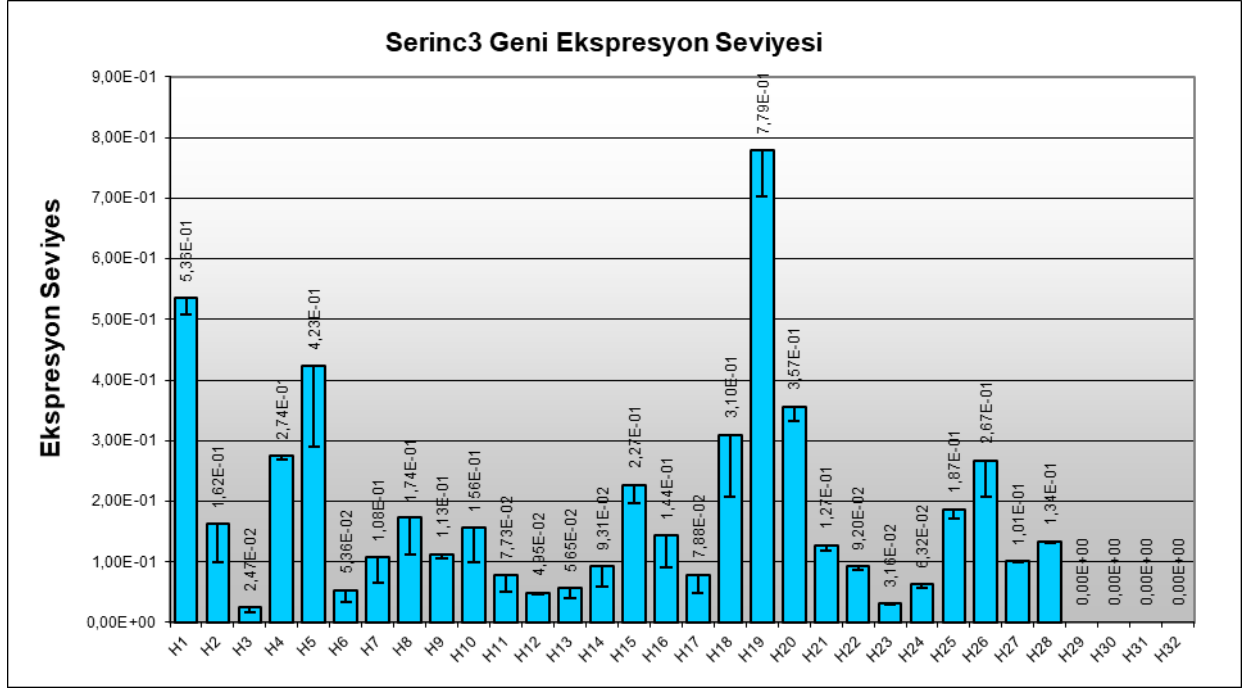
PCR Verimliliği [E] : %99 verimlilik

Ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu kullanılarak semi-kantatif olarak hesaplanmıştır. Amplifikasyon etkinlik oranının 2 ve üzeri olduğu durumlarda çalışmada kullanılan ve dizayn edilen primerlerin gene özgünlüğü %100 demektir, bu değer azaldıkça ise primerlerin özgünlük azaldığı bilinmektedir (Hazman, 2022).



Şekil 4.5. Referans ve çalışmada kullanılan gen bölgelerinin R² denklem sonuçları.

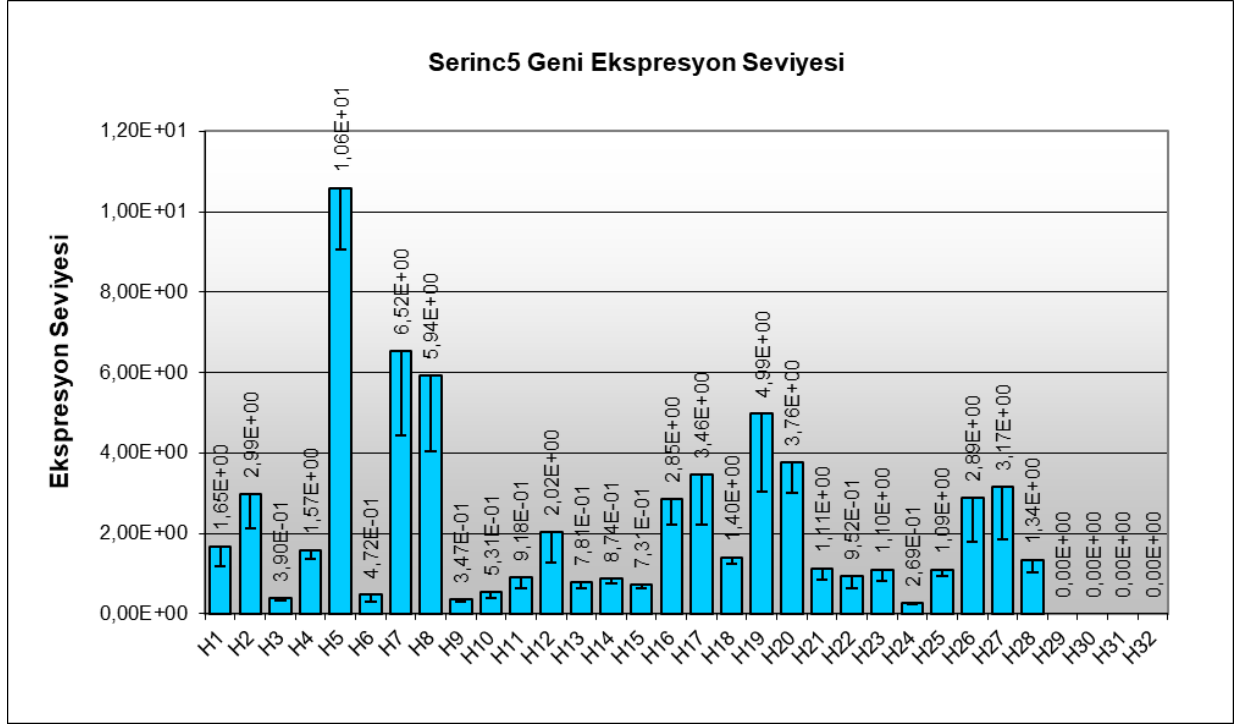
Hastalığın seyri ve immün genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek için, SERINC3 geni ve gapdh referans genlerinin ekspresyonu ile mutasyon yükü arasındaki korelasyona odaklandık. SERINC3 genindeki mutasyon yükü ile önemli ölçüde hastalığa duyarlılıkla ilişkili olduğu bulunmuştur ($\rho = 0.19$). SERINC3 gen ekspresyonu, qRT-PCR analizi ile doğrulandığı üzere, Covid-19 ile enfekte olmuş kişilerde önemli ölçüde yukarı yönlü bir regülasyon görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. SERINC3 gen ekspresyon seviyeleri

4.9. SERINC5 Gen Ekspresyon Analizi

SERINC5, gen ifadesine dayalı olarak viral hastalıklara karşı oluşturulacak immün yanıtı etkileyebileceği öne sürülmüştür. Bu çalışmada, SERINC5'nin diğer bağışıklık genlerinden büyük ölçüde farklı olduğunu ve özellik gen ekspresyonu ile korelasyon, genel korelasyonlardan (örn.,bimodal) farklı olduğunu göstermiştir. SERINC5 gen ekspresyonu, qRT-PCR analizi ile doğrulandığı üzere, Covid-19 ile enfekte olmuş kişilerde önemli ölçüde yukarı yönlü bir regülasyon görüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. SERINC5 gen ekspresyon seviyeleri

Genom genişliğinde ilişkilendirme çalışmaları ile birlikte, COVID-19'un iki duyarlılık lokusu tanımlanmıştır (Ellinghaus ve ark., 2020). Kromozom 3 üzerinde SLC6A20 , LZFTL1 , CCR9 , CXCR6 , XCR1 , FYCO1 gibi çoklu gen bölgelerini içeren lokus ilkinin oluştururken, ABO kan gruplarını tanımlayan kromozom 9 üzerindeki ikincisinin COVID-19'a duyarlılık açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca ekzon dizileme çalışmaları, tip I interferon yolağına ait genlerdeki nadir mutasyonların etkisizleştirilmesinin COVID-19 pnömonisine yatkınlık oluşturduğu gösterilmiştir (van der Made ve ark., 2020). Ek olarak, İtalya'da yapılan bir çalışmada, TMPRSS2 ve PCSK3 gen bölgelerindeki kodlama varyantlarının enfeksiyon duyarlılığı ve şiddetindeki değişkenliğe katkıda bulunabileceği gösterilmiştir (Latini ve ark., 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha önceki çalışmalarda bildirilmiş olan farklı bağışıklık genlerindeki olağandışı özellikler göz önüne alındığında, SERINC proteinlerinin viral hastalıklarda kısıtlama faktörleri olarak görülmesi önemli bir sonuçtur. Bununla birlikte, SERINC3 ve SERINC5 muhtemelen diğer SERINC genlerinden farklı olarak, konakçı ile etkileşimin düzenlenmesinde temel bir rol oynadığı görülmüştür. SARS-CoV-2 geçiren hastalardaki SERINC3 ve SERINC5'deki ekspresyon farklılıkları bu enfeksiyona karşı belirleyici bir marker olduklarının en belirgin göstergesi olduğu düşünülmüştür. Belirlenen genotiplerin hastalığa dirençle bağlantılı olacağı sonucuna varılmıştır. Ancak bu sonucun daha iyi anlaşılması için, SERINC3 ve SERINC5 genleri tarafından ekspresyon seviyelerinin değiştirildiği hücre kültürleri ile yapılacak olan ileri moleküler çalışmalardan olan CRISPR gibi analizlerin yapılması gerekli olduğu önerilebilir. Bu nedenle, SERINC3 ve SERINC5'in pleiotropik (tek bir genin birden fazla fenotipik özelliği etkilemesi durumu) bir işlev olduğunun belirlenmesi için, gelecekteki çalışmalarda enfektivitelerinin inhibisyon aktivitelerinin değerlendirilmesinde hücre kültür çalışmaları kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S.,** 2016. Basic immunology : functions and disorders of the immune system (Fifth edition. ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., Malarkannan, S.,** 2018. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol*, 9, 1869.
- Alberts, B.,** 2002. Molecular biology of the cell (4th ed.). New York: Garland Science.
- Balk R.A.,**2013. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence*, 5:20–26.
- Beitari, S., Ding, S., Pan, Q., Finzi, A., Liang, C.,** 2017. Effect of HIV-1 Env on SERINC5 antagonism. *Journal of virology*, 91(4), e02214-16.
- Bertram, S., Glowacka, I., Müller, M. A., Lavender, H., Gnirss, K., Nehlmeier, I., Niemeyer, D., He, Y., Simmons, G., and Drosten, C.,** 2011. Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *Journal of virology*, 85, 13363–13372.
- Bevan, M. J.,** 2004. Helping the CD8+ T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, 4(8), 595-602.
- Boon, T., Coulie, P. G., & Van den Eynde, B.,** 1997. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunology today*, 18(6), 267-268.
- Bossolasco, M., Lebel, M., Lemieux, N., and Mes-Masson, A.-M.,** 1999. The human TDE Gene Homologue: Localization to 20q13.1-13.3 and Variable Expression in Human Tumor Cell Lines and Tissue. *Mol. Carcinog.* 26 (3), 189–200.
- Brant, A. C., Tian, W., Majerciak, V., Yang, W., & Zheng, Z. M.,** 2021. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell & bioscience*, 11(1), 1-17.
- Brian D. A., Baric R. S.,** 2005. Coronavirus genome structure and replication. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 287, 1–30. doi: 10.1007/3-540-26765-4_1.
- Chan, J. F. W., Yuan, S., Kok, K. H., To, K. K. W., Chu, H., Yang, J., ... & Yuen, K. Y.,** 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), 514-523.
- Chou, F. C., Chen, H. Y., Chen, S. J., Fang, M. C., & Sytwu, H. K.,** (2013). Rodent models for investigating the dysregulation of immune responses in type 1 diabetes. *Journal of Diabetes Research*. doi:10.1155, 138412.

- Chu, E. P. F., Elso, C. M., Pollock, A. H., Alsayb, M. A., Mackin, L., Thomas, H. E., et al.,** 2017. Disruption of Serinc1, Which Facilitates Serine-Derived Lipid Synthesis, Fails to Alter Macrophage Function, Lymphocyte Proliferation or Autoimmune Disease Susceptibility. *Mol. Immunol.* 82, 19–33. doi:10.1016/j.molimm.2016.12.007.
- Connors J.M., Levy JH.,** 2020.COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*, 135(23):0–2040. doi: 10.1182/blood.2020006000.
- Cooper, M. D.,& Alder, M. N.,** 2006. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815-822.
- Davidson AM, Wysocki J, Batlle D.,**2020. Interaction of SARS-CoV-2 and other coronavirus with ACE (angiotensin-converting enzyme)-2 as their main receptor: therapeutic implications. *Hypertension*, 76(5):1339–49.
- De Wit E., van Doremalen N., Falzarano D., Munster V.J.,** 2016. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiology*, 14:523–534.
- Diao, B., Wang, C., Wang, R., Feng, Z., Zhang, J., Yang, H., ... & Chen, Y.,** 2021. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. *Nature communications*, 12(1), 2506.
- D. Yang, J.L. Leibowitz.,**2015.The structure and functions of coronavirus genomic 3' and 5' ends, *Virus Res.* 206, 120–133.
- Firrito, C., Bertelli, C., Vanzo, T., Chande, A., and Pizzato, M.,** 2018. SERINC5 as a New Restriction Factor for Human Immunodeficiency Virus and Murine Leukemia Virus. *Annu. Rev. Virol.* 5 (1), 323–340. doi:10.1146/annurevvirol-092917-043308.
- F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Z.-G. Song, Y. Hu, Z.-W. Tao, J.- H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.- J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, Y.-Z. Zhang.,**2020. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China, *Nature* 579, 265–269.
- F. Wu, S. Zhao, B. Yu, Y.-M. Chen, W. Wang, Y. Hu, Z.-G. Song, Z.-W. Tao, J.- H. Tian, Y.-Y. Pei, M.-L. Yuan, Y.-L. Zhang, F.-H. Dai, Y. Liu, Q.-M. Wang, J.- J. Zheng, L. Xu, E.C. Holmes, Y.-Z. Zhang.,**2020.Complete genome characterisation of a novel coronavirus associated with severe human respiratory disease in Wuhan, China, *bioRxiv* : the preprint server for biology, 2001.2024.919183.
- Gasteiger, G., D'Ousaldo, A., Schubert, D. A., Weber, A., Bruscia, E. M., & Hartl, D.,** 2017. Cellular innate immunity: an old game with new players. *J Innate Immun*, 9(2), 111-125.
- Gonzalez-Enriquez, G. V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., & Torres-Mendoza, B. M.,** 2017. SERINC as a restriction factor to inhibit viral infectivity and the interaction with HIV. *Journal of Immunology Research*.

- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., ... & Ziebuhr, J.,** 2020. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature microbiology*, 5(4), 536-544.
- Grossman TR, Luque JM, Nelson N.,**2000. Identification of a ubiquitous family of membrane proteins and their expression in mouse brain, 203:447–457.
- Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA.,**2020. The molecular virology of coronaviruses, 295(37):12910–34.
- Hedera, P.,** 2021. Hereditary spastic paraplegia overview. *GeneReviews*.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., Muller M.A., Drosten C., Pohlmann S.,** 2020. SARS- CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 181(2):271–280. doi: 10.1016/j.cell, 052.
- Inuzuka, M., Hayakawa, M., and Ingi, T.,** 2005. Serinc, an Activity-Regulated Protein Family, Incorporates Serine into Membrane Lipid Synthesis. *J. Biol. Chem.* 280 (42), 35776–35783. doi:10.1074/jbc.m505712200.
- Klein S, Cortese M, Winter SL, Wachsmuth-Melm M, Neufeldt CJ, Cerikan B, Stanifer ML, Boulant S, Bartenschlager R, Chlanda P.,**2020. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo-electron tomography. *Nat Commun*, 11(1):5885.
- Kosti, I., Jain, N., Aran, D., Butte, A. J., & Sirota, M.,** 2016. Cross-tissue analysis of gene and protein expression in normal and cancer tissues. *Scientific reports*, 6(1), 24799.
- Krueger WH, Gonye GE, Madison DL, Murray KE, Kumar M, Spoerel N, et al.,**1997. TPO1, a member of a novel protein family, is developmentally regulated in cultured oligodendrocytes, 69:1343–1355.
- LeBien, T. W., Tedder, T. F.,** 2008. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570-1580. doi:10.1182/blood, 078071.
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... & Feng, Z.,** 2020. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus–infected pneumonia. *New England journal of medicine*.
- Liu, J., Huang, Y., Li, T., Jiang, Z., Zeng, L., & Hu, Z.,** 2021. The role of the Golgi apparatus in disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 47(4), 1-1.

- Liu, Y., Wang, H., Zhang, J., Yang, J., Bai, L., Zheng, B., ... & Zhang, W., 2020.** SERINC5 inhibits the secretion of complete and genome-free hepatitis B virions through interfering with the glycosylation of the HBV envelope. *Frontiers in Microbiology*, 11, 697.
- Li, W., Zhang, Z., Zhang, L., Li, H., Fan, S., Zhu, E., ... & Zhao, M., 2020.** Antiviral role of serine incorporator 5 (SERINC5) proteins in classical swine fever virus infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 580233.
- Lubke G, Laurin C, Amin N, Hottenga J, Willemsen G, van Grootheest G, et al., 2014.** Genome-wide analyses of borderline personality features. *Mol Psychiatry*, 19:923–929.
- Lukassen S, Chua RL, Trefzer T, Kahn NC, Schneider MA, Muley T, Winter H, Meister M, Veith C, Boots AW, et al., 2020.** SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells, 39(10):e105114.
- Male, D., Brostoff, J., Roth, D., & Roitt, I., 2012.** *Immunology : With STUDENT CONSULT Online Access*. Edinburgh, UNITED KINGDOM: Elsevier.
- Market, E., Papavasiliou, F. N., 2003.** V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol*, 1(1), E16. doi:10.1371/journal.pbio.0000016.
- Matsuyama, S., Nagata, N., Shirato, K., Kawase, M., Takeda, M., and Taguchi, F., 2010.** Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J. Virol.* 84, 12658–12664.
- Meng, B., Abdullahi, A., Ferreira, I. A., Goonawardane, N., Saito, A., Kimura, I., ... & Gupta, R. K., 2022.** Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature*, 603(7902), 706-714.
- Millet, J. K., and Whittaker, G. R., 2015.** Host cell proteases: Critical determinants of coronavirus tropism and pathogenesis. *Virus Res.* 202, 120–134.
- Naqvi A. A. T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I. K., Singh A., et al., 2020.** Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 1866, 165878. doi: 10.1016/j.bbadis. 165878
- Nimmrich, I., Erdmann, S., Melchers, U., Finke, U., Hentsch, S., Moyer, M. P., et al., 2000.** Seven Genes that Are Differentially Transcribed in Colorectal Tumor Cell Lines. *Cancer Lett.* 160 (1), 37–43.
- N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, X. Li, B. Yang, J. Song, X. Zhao, B. Huang, W. Shi, R. Lu, P. Niu, F. Zhan, X. Ma, D. Wang, W. Xu, G. Wu, G.F. Gao, W. Tan., 2020.** A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019, *N. Engl. J. Med.* 382, 727–733.

- Oostra, M., de Haan, C.A., Rottier, P.J.,** 2007. The 29-nucleotide deletion present in human but not in animal severe acute respiratory syndrome coronaviruses disrupts the functional expression of open reading frame 8. *J. Virol.* 81, 13876–13888.
- Palm, N. W., & Medzhitov, R.,** 2007. Not so fast: adaptive suppression of innate immunity. *Nature medicine*, 13(10), 1142-1144.
- P.C.Y. Woo, Y. Huang, S.K.P. Lau, K.-Y. Yuen.,** 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis, *Viruses* 2, 1804–1820.
- Prager, I., & Watzl, C.,** 2019. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of leukocyte biology*, 105(6), 1319-1329.
- P. Zhou, X.L. Yang, X.G. Wang, B. Hu, L. Zhang, W. Zhang, H.R. Si, Y. Zhu, B. Li, C.L. Huang, H.D. Chen, J. Chen, Y. Luo, H. Guo, R.D. Jiang, M.Q. Liu, Y. Chen, X.R. Shen, X. Wang, X.S. Zheng, K. Zhao, Q.J. Chen, F. Deng, L.L. Liu, B. Yan, F.X. Zhan, Y.Y. Wang, G.F. Xiao, Z.L. Shi.,** 2020. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, *Nature* 579, 270–273.
- Qi, C., Lei, L., Hu, J., Wang, G., Liu, J., and Ou, S.,** 2020. Serine Incorporator 2 (SERINC2) Expression Predicts an Unfavorable Prognosis of Low-Grade Glioma (LGG): *Evidence from Bioinformatics Analysis. J. Mol. Neurosci.* 70 (10), 1521–1532. doi:10.1007/s12031-020-01620-w
- R. Lu, X. Zhao, J. Li, P. Niu, B. Yang, H. Wu, W. Wang, H. Song, B. Huang, N. Zhu, Y. Bi, X. Ma, F. Zhan, L. Wang, T. Hu, H. Zhou, Z. Hu, W. Zhou, L. Zhao, J. Chen, Y. Meng, J. Wang, Y. Lin, J. Yuan, Z. Xie, J. Ma, W.J. Liu, D. Wang, W. Xu, E.C. Holmes, G.F. Gao, G. Wu, W. Chen, W. Shi, W. Tan.,** 2020. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding, *Lancet* 395, 565–574.
- Rosa, A., Chande, A., Ziglio, S., De Sanctis, V., Bertorelli, R., Goh, S. L., ... & Pizzato, M.,** 2015. HIV-1 Nef promotes infection by excluding SERINC5 from virion incorporation. *Nature*, 526(7572), 212-217.
- Samaržija, I., Trošelj, K. G., & Konjevoda, P.,** 2023. Prognostic Significance of Amino Acid Metabolism-Related Genes in Prostate Cancer Retrieved by Machine Learning. *Cancers*, 15(4), 1309.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F.,** 2020. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(21), 11727-11734.
- Sharma, S., Lewinski, M. K., & Guatelli, J.,** 2018. An N-glycosylated form of SERINC5 is specifically incorporated into HIV-1 virions. *Journal of Virology*, 92(22), e00753-18.

- Sigrist, C. J., Bridge, A., & Le Mercier, P.,** 2020. A potential role for integrins in host cell entry by SARS-CoV-2. *Antiviral research*, 177, 104759.
- Simmons, G., Gosalia, D. N., Rennekamp, A. J., Reeves, J. D., Diamond, S. L., and Bates, P.,** 2005. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 11876–11881.
- Sood, C., Marin, M., Chande, A., Pizzato, M., & Melikyan, G. B.,** 2017. SERINC5 protein inhibits HIV-1 fusion pore formation by promoting functional inactivation of envelope glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 292(14), 6014-6026
- Stadler, K., Masignani, V., Eickmann, M., Becker, S., Abrignani, S., Klenk, H. D., & Rappuoli, R.,** 2003. SARS—beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 209-218.
- Timilsina, U., Umthong, S., Lynch, B., Stablewski, A., & Stavrou, S.,** 2020. SERINC5 potently restricts retrovirus infection in vivo. *MBio*, 11(4), e00588-20.
- Timilsina, U., Umthong, S., Ivey, E. B., Waxman, B., & Stavrou, S.,** 2022. SARS-CoV-2 ORF7a potently inhibits the antiviral effect of the host factor SERINC5. *Nature Communications*, 13(1), 2935.
- Tortorici MA, Walls AC, Lang Y, Wang C, Li Z, Koerhuis D, et al.,** 2015. Siyalik asit reseptörlerine insan koronavirüsünün bağlanması için yapısal temel. *Nat Yapı Mol Biol.* 2019; 26 :481–9.
- Trautz, B., Wiedemann, H., Lüchtenborg, C., Pierini, V., Kranich, J., Glass, B., et al.,** 2017. The Host-Cell Restriction Factor SERINC5 Restricts HIV-1 Infectivity without Altering the Lipid Composition and Organization of Viral Particles. *J. Biol. Chem.* 292 (33), 13702–13713. doi:10.1074/jbc.m117.797332.
- Trautz, B., Pierini, V., Wombacher, R., Stolp, B., Chase, A. J., Pizzato, M., & Fackler, O. T.,** 2016. The antagonism of HIV-1 Nef to SERINC5 particle infectivity restriction involves the counteraction of virion-associated pools of the restriction factor. *Journal of virology*, 90(23), 10915-10927.
- Trougakos, I. P., Stamatelopoulos, K., Terpos, E., Tsitsilonis, O. E., Aivalioti, E., Paraskevis, D., ... & Dimopoulos, M. A.,** 2021. Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of Biomedical Science*, 28, 1-18.
- Tyrrell, D. A. J., & Bynoe, M. L.,** 1966. Cultivation of viruses from a high proportion of patients with colds. *Lancet*, 76-7.
- Usami, Y., Wu, Y., & Göttlinger, H. G.,** 2015. SERINC3 and SERINC5 restrict HIV-1 infectivity and are counteracted by Nef. *Nature*, 526(7572), 218-223.

- Vermeire, J., Vanbillemont, G., Witkowski, W., & Verhasselt, B., 2011.** The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection. *Current HIV research*, 9(7), 474-489.
- Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D., 2020.** Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2):281–292.
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M., 2020.** SARS-CoV-2: structure, biology, and structure-based therapeutics development. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 587269.
- Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K.Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., Qi J., 2020.** Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 181(4):894–904.
- Wan, S., Yi, Q., Fan, S., Lv, J., Zhang, X., Guo, L., ... & Gao, C., 2020.** Relationships among lymphocyte subsets, cytokines, and the pulmonary inflammation index in coronavirus (COVID-19) infected patients. *British journal of haematology*, 189(3), 428-437.
- WHO, W., 2020.** Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. WHO.
- Wielgat, P., Rogowski, K., Godlewska, K., & Car, H., 2020.** Coronaviruses: is sialic acid a gate to the eye of cytokine storm? From the entry to the effects. *Cells*, 9(9), 1963.
- Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J., & Kaufman, R. J., 1990.** Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(23), 9378-9382.
- Wong, S. C. Y., Kwong, R. S., Wu, T. C., Chan, J. W. M., Chu, M. Y., Lee, S. Y., ... & Lung, D. C., 2020.** Risk of nosocomial transmission of coronavirus disease 2019: an experience in a general ward setting in Hong Kong. *Journal of Hospital Infection*, 105(2), 119-127.
- Wu C., Chen X., Cai Y., Xia J., Zhou X., Xu S., Huang H., Zhang L., Zhou X., Du C., Zhang Y., Song J., Wang S., Chao Y., Yang Z., Xu J., Zhou X., Chen D., Xiong W., Xu L., Zhou F., Jiang J., Bai C., Zheng J., Song Y., 2020.** Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern. Med*, doi: 10.1001/jamainternmed.2020.0994.
- Xu J, Ji C, Wang L, Cao Y, Dai J, Ye X, et al., 2003.** Cloning and expression of a novel human C5orf12 gene, a member of the TMS_TDE family. *Mol Biol Rep*, 30:47–52.

- Xu, S., Zheng, Z., Pathak, J. L., Cheng, H., Zhou, Z., Chen, Y., ... & Wu, L., 2022.** The Emerging Role of the Serine Incorporator Protein Family in Regulating Viral Infection. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10.
- Zhang X, Zhou T, Yang J, Lin Y, Shi J, Zhang X, et al., 2017.** Identification of SERINC5-001 as the Predominant Spliced Isoform for HIV-1 Restriction. *J Virology*, 91:e00137–e00117.
- Zhao, F., Xu, F., Liu, X., Hu, Y., Wei, L., Fan, Z., ... & Guo, F., 2022.** SERINC5 restricts influenza virus infectivity. *PLoS pathogens*, 18(10), e1010907.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W., 2020.** A novel coronavirus from patients with pneumonia in China. *New England journal of medicine*.
- Zutz, A., Schölz, C., Schneider, S., Pierini, V., Münchhoff, M., Sutter, K., ... & Keppler, O. T., 2020.** SERINC5 is an unconventional HIV restriction factor that is upregulated during myeloid cell differentiation. *Journal of Innate Immunity*, 12(5), 399-409.