

# KIRIM KONGO KANAMALI ATEŞİ VİRÜSÜ NÜKLEOPROTEİNİN VE GLİKOPROTEİNLERİNİN BİYOLOJİSİNİN ÇALIŞILMASINDA PLAZMİT TEMELLİ ÖKARYOTİK MODEL OLUŞTURULMASI

## ÖZET

Milyonlarca insanın ölümüne sebep olarak insanlık tarihine yön veren pek çok farklı pandemiye RNA virüsleri sebep olmuştur. İnfluenza A virüsü, çocuk felci virüsü, rotavirüsler, dang virüsü, hepatit C virüsü, Batı Nil humması virüsü, sarı humma virüsü ve kızamık virüsü gibi ciddi insan patojenlerinin çoğu RNA virüsleridir. Küreselleşmeyle birlikte insanların birbirleriyle ve doğadaki diğer canlılarla etkileşimi günden güne artmaktadır. Bu durum, RNA virüslerinin binlerce yıldır dolaşımında kalmalarını sağlayan hızlı uyum yetenekleri sebebiyle yeni konakçılar bulmasını kolaylaştırabilmekte ve yeni pandemilerin önünü açabilecek virüs varyantlarının ortaya çıkmasını tetikleyebilmektedir. Son COVID-19 salgınında da görüldüğü gibi, RNA virüsleri zamanla daha da endişe verici bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. RNA virüslerinin bağışıklık sisteminden kaçma konusundaki mahir yetenekleri bazı durumlarda etkin antiviral ilaçların geliştirilmesini zorlaştırmaktadır. Aşı ve antivirallerin üretimi için de öncelikle virüs yaşam döngüsünün aydınlatılması gerekmektedir. Bu amaca hizmet eden sağlam yöntemlerin oluşturulması, hastalığın altında yatan moleküler mekanizmaların araştırılmasında kritik bir role sahiptir.

Genel terminolojide, ileri genetik, bir fenotipin genetik temelini araştırılmasını ifade ederken, ters genetik, genetik değişikliklerin fenotip üzerindeki etkisinin incelenmesini ifade eder ki, viroloji bağlamında ters genetik, bir virüsün tamamen cDNA'dan üretilmesi anlamına gelir. Ters genetik sistemleri yüksek patojeniteye sahip virüslerin yaşam döngüleri, bağışıklık yanıtlarından kaçış yolları, virüs-konakçı etkileşimleri, aşı geliştirilme veya vektör olarak kullanılabilir olacak özelleştirilmiş virüslerin üretimi gibi çalışmaların BSL-2 koşullarında yapılabilmesine imkan tanıyan etkili ve kullanışlı araçlardır. Bu sistemler, virüslere ait yaşam döngüsünün moleküler temelini tüm yönleriyle belirlenebileceği mutasyon analizlerine imkan tanımaktadır. Pek çok yüksek derecede patojenik RNA virüsünün biyolojisi hakkında muazzam miktarda bilgi, özellikle minigenomların da dahil olduğu VLP sistemlerini içeren araştırmalardan elde edilmiştir. Viral genomların replikasyonu ve transkripsiyonu minigenom sistemleri kullanılarak modellenirken, hedef hücrelerin morfogenezi, tomurcuklanması ve enfeksiyonu, transkripsiyon ve replikasyon açısından yetkin virüs benzeri partiküller kullanılarak simüle edilmektedir. Virüs yaşam döngüsü ve hastalığın patofizyolojisi konusundaki bilinmeyen mekanizmaları aydınlatmak üzere yapılan virüs benzeri parçacık çalışmaları (VLPs), insan hayatını etkileyen bu virüslere karşı etkili antiviral stratejilerin geliştirilmesinde hayati öneme sahiptir. Virüs benzeri parçacıkların, enfeksiyona sebep olabilecek genomik materyalden yoksun olması, dünyadaki birçok araştırmacının kolayca erişebileceği BSL-2 laboratuvarlarında bu tarz virüslerle yapılacak çalışmaları kolaylaştırmaktadır.

Geçtiğimiz yıllarda, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), salgın potansiyelleri ve karşı önlemlerin olmaması veya yetersiz olması nedeniyle en fazla halk sağlığı riski taşıyan ve öncelikli olarak araştırılması gereken enfeksiyon ajanları hakkında bir liste yayınlamıştır. Ülkemiz için de klinik öneme sahip Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) ve COVID-19 hastalıkları bu listede ilk iki sırayı paylaşmaktadır. Buradan hareketle, bu tezde hem KKKA'nın etiyolojik ajanı olan Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü (KKKAV)'nin biyolojisinin ve immunolojisinin çalışılabildiği, hem de COVID-19 pandemisinin müsebbibi Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs 2 (SARS-CoV-2)'ye yönelik aşı adayı geliştirme çalışmalarına temel oluşturacak farklı VLP sistemlerinin geliştirmesi adına çeşitli viral protein ekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

Kırım- Kongo Kanamalı Ateşi, KKKAV'nin neden olduğu kene kaynaklı viral hemorajik bir hastalıktır. KKKA, insanlarda, sağlık sisteminin kalitesine göre %5 ila %80 arasında değişen ölüm oranlarına sahip sporadik salgınlara neden olmaktadır. Şimdiye kadar Afrika, Asya ve Avrasya'yı kapsayan geniş bir coğrafi alanda 30'dan fazla ülkede virüs izolasyonu ve/veya hastalık bildirilmiştir. Virüsün *Hyalomma* keneleri aracılığıyla artan bulaşı nedeniyle üç milyar insan hastalığa yakalanma riski altındadır. Bununla birlikte, dünyada en fazla vaka Türkiye'den bildirilmektedir. 2002 ile 2018 yılları arasında 11.041 vaka bildirildiğinden, KKKA Türkiye'de halk sağlığını tehdit eden ve büyüyen bir endişe haline geldi. Enzootik alanda bulunan enfekte keneler ile temas insanlarda KKKA'ya neden olmaktadır. İnsanlar dışındaki omurgalı konakçılar, enfeksiyondan sonra yalnızca asemptomatik geçici viremiden muzdariptir. Vücut sıvıları veya kontamine tıbbi ekipman ile doğrudan temas, nozokomiyal enfeksiyonların ana nedenleridir ve kesim sırasında viremik bir hayvanın dokuları veya sıvıları ile temas, insana bulaşmanın başka bir yoludur. İnsanlarda KKKA çok farklı klinik tablo ile seyredebilir. Hafif seyreden bir hastalıktan, şiddetli ve ölümcül seviyelere ulaşan bir hastalığa dönüşebilir. Şu anda KKKA için onaylanmış bir aşı veya ilaç bulunmadığından, tedavinin birincil odak noktası hastalara destekleyici bakım sağlamaktır.

Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü negatif tek sarmallı zarflı bir RNA virüsüdür. Viral genom, sırasıyla RNA'ya bağımlı viral RNA polimeraz, glikoproteinler ve nükleoproteinler gibi yapısal proteinleri kodlayan L, M ve S segmentleri olarak adlandırılan üç tek sarmallı negatif RNA moleküllerinden oluşur. Her segmentte tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) ve yüksek düzeyde korunmuş ve birbirine komplementer kodlayıcı olmayan terminal tamamlayıcı diziler bulunmaktadır. Her iki uç arasındaki kovalent olmayan etkileşim, viral polimerazın bağlanması için fonksiyonel bir promotör bölge olma görevini üstlenmektedir. CCHFV M segmentinden iki viral glikoprotein, Gn ve Gc üretilmektedir ve konak hücreye bağlanma ve internalizasyondan sorumludur. S segmentten üretilen nükleoproteinler (Np), viral genomun kapsüllenmesi ve RNA'ya bağımlı RNA polimeraz (RdRp) ile birlikte bir ribonükleoprotein kompleksinin oluşturulması, ardından konakçı hücrede viral replikasyonun ve transkripsiyonun başlatılması için çok önemlidir.

Bulaş riskinin yüksek olması ve BSL-4 tesislerinin gerekliliği canlı virüs ile yapılan çalışmaları kısıtlamaktadır. Bu nedenle, virüs biyolojisi hakkında, özellikle tekil proteinler tarafından sağlanan her bilgi, literatüre değerli katkılar sağlayacaktır. Bu amaçla ilk olarak, KKKAV viral proteinleri Huh-7 hücrelerinde pcDNA 3.1 plazmidi aracılığıyla üretilmiş ve hem post-transkripsiyonel hem de post-translasyonel analizlerle viral proteinlerin ekspresyonları gösterilmiştir. ELISA ile yapılan immünolojik analizlerde, çeşitli viral protein kombinasyonlarının, farklı KKKAV

VLP'lerin üretimini destekleyebileceğine dair bazı veriler elde edilmiştir. Ayrıca, benzersiz bir ambisense minigenom sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemin ileride yapılacak VLP çalışmalarına dahil edilmesi, KKKAV Kelkit 06 suşu için transkripsiyonel ve giriş yetkin bir VLP üretilmesinin yolunu açabileceği düşünülmektedir.

İkinci olarak, bu tezde, insanlık tarihinde dönüm noktası sayılabilecek ölçüde yıkıcı sonuçlarına mağruz kaldığımız COVID-19 pandemisinin müsebbibi SARS-CoV-2'ye yönelik çalışmalar yapılmıştır. 2019' un sonunda, Çin'in Wuhan şehrinde, kaynağı bilinmeyen bir dizi oldukça bulaşıcı şiddetli pnömoni vakası ortaya çıkmıştır. Moleküler biyolojideki modern gelişmeler sayesinde, bu durumun altında yatan viral ajan, ilk vakadan sonraki bir ay içinde tanımlandı ve SARS-CoV ile %79,6 sekans benzerliği nedeniyle SARS-CoV-2 olarak adlandırıldı. Yüksek bulaşma hızı nedeniyle birkaç ay içinde "koronavirüs hastalığı 2019" (COVID-19) olarak bilinen ve insan sağlığı ve kamu güvenliği için ciddi bir küresel tehdit oluşturan bir pandemiye dönüşmüştür. Ocak 2023 itibariyle 215 ülke ve bölgede 661 milyonu aşan vaka ve 6,69 milyondan fazla ölüm belgelenmiştir. İnsanlar arasında viral bulaşmanın, enfekte hastaların öksürmelerinden, hapşirmalarından veya konuşmalarından salınan solunum partikülleri yoluyla doğrudan meydana geldiği bilinmektedir. Bu yüzden, dünyanın birçok ülkesinde, çeşitli aralıklarla evde kalma emirleri, sokağa çıkma yasakları, karantinalar, güvenlik kordonları ve benzeri toplumsal kısıtlamalar gibi ilaç dışı müdahaleler uygulanmak zorunda kalınmıştır. Bu süreçte ek olarak, sporadik mutasyonlar ve rekombinasyonlar sebebiyle, virüsün daha geniş bir alana yayılmasına veya nötralize edici antikorlardan kaçabilmesine imkan tanıyan yeni varyantlar da ortaya çıkmıştır.

COVID-19'un etiyolojik ajanı SARS-CoV-2, zarflı, pozitif tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Virionda S, M, N ve E olarak adlandırılan yapısal proteinleri bulunmaktadır. E proteini iyon kanalı aktivitesine sahiptir ve olgun virüs partikülünün oluşumunda önemli olduğu düşünülmektedir. Nükleoprotein (N), pozitif anlamda viral RNA'ya yüksek afinite ile bağlanır ve onu konakçı nükleazlardan korur. M proteini virionda bol miktarda bulunur ve nükleokapside bağlanarak viral genomun paketlenmesine yardımcı olur. S proteini, virüsün hücre yüzeyindeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörlerine bağlanmasına ve ardından endozomlara alınmasına aracılık eder.

SARS-CoV-2 ile enfekte olan çoğu insan, virüs replikasyonunun esas olarak üst solunum yollarıyla sınırlı olduğu hafif ila orta şiddette bir hastalık geliştirirse de, bazılarında hayatı tehdit eden bir pnömoniye dönüşmektedir ve yüzde %1 oranında fatalite görülmektedir. COVID-19' a yakalan kişilerin yaklaşık %3-20'sinde hastalık ağır seyretmektedir ve bunların yaklaşık %10-30'u için yoğun bakıma ihtiyaç duyulmaktadır. Bu durum sağlık sistemleri üzerinde büyük bir baskı oluşturmuştur. Şu anda, COVID-19' a karşı spesifik bir tedavinin henüz geliştirilmemesi COVID-19'un patogenezeine ilişkin sınırlı anlayışımızı vurgulamaktadır.

COVID-19'a karşı aşı geliştirme çalışmaları, viral genom dizilimi yapılı yapılmaz eşli görülmemiş bir hızla başlatıldı. Spike proteinin virüs giriş mekanizmasındaki önemli rolü nedeniyle, tüm protein veya reseptör bağlanma alanı (RBD) gibi kritik parçalar aşı tasarımında ana hedef antijen olarak kullanılmıştır. Bu kapsamda, yalnızca Spike veya tüm yapısal proteinleri içeren VLP'lerle yapılan mevcut klinik çalışmaların aksine, bu çalışmada, viral proteinlerin değişik kombinasyonları ile farklı VLP'lerin üretimine odaklanılmıştır. SARS-CoV-2 proteinleriyle bir VLP yapısı oluşturmak için minimum protein içeriğinin M ve E proteinleri olduğu öngörüsü ve S ve N

proteinlerinin antijenik özellikleri nedeniyle SEM, SEN, SENM ve ENM olarak adlandırılan dört farklı SARS-CoV-2 VLP plazmidi tasarlanmıştır. amacıyla çeşitli kombinasyonlarda çoklu ekspresyon kasetleri taşıyan dört farklı plazmit oluşturulmuştur. Bu plazmitler, farklı viral ifade kasetleri kombinasyonlarının sıralı olarak klonlanmasıyla inşa edilmiştir. Viral genlerin maya genomuna entegrasyonu sonrası *P. pastoris* GS115 suşu ile yapılan ekspresyon çalışmalarında, viral proteinler çeşitli antikolar kullanılarak tespit edilmiştir. Bu çalışmalar VLP sistemlerinin transkripsiyonel biyoteknolojide kullanımına dair örnek bir çalışmayı temsil etmektedir ve aşı adaylarının immünojenitesini ve güvenliğini inceleyen ileri klinik çalışmalara veri sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu tezde yapılan deneyler, zamanımızın en ciddi insan viral patojenlerinden ikisi olan CCHFV ve SARS CoV-2'nin immünojenik açıdan önemli viral antijenik proteinlerinin ökaryotik hücrelerde ekspresyonunu ve saptanmasını göstermiştir. Bu çalışmalar laboratuvarımızda ilerideki çalışmalar için gerekli olacak kritik bir altyapı oluşturmuştur. Plazmid bazlı ekspresyon sistemlerinden yeterli miktarlarda ve ticari olarak anlamlı VLP'lerin üretilmesi ve gösterilmesi için daha fazla optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır. Bu virüslerin biyolojisi ve immünojenitesi ile ilgili soruları VLP ve minigenom yaklaşımları ile ele almak için, farklı ifade modelleri ile ayrıntılı denemeler, dizilerin optimizasyonu, alternatif transkripsiyon sistemleri ve kararlı ifadeler gibi bu optimizasyonların yapılması gerektiğinin altı çizilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** RNA virüsleri, RNA virüsü enfeksiyonları, Arbovirüsler, Corona virüsü enfeksiyonları, COVID-19 aşılı