

BÖLÜM 2

HÜCRESEL DÜZEYDE GERÇEKLEŞENLER

Tuba ERDOĞAN, Uğur MUŞABAK

İlk defa 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan kentinde ortaya çıkan ve hızla tüm dünyaya yayılan yeni koronavirüs, coronavirus disease 19 (COVID-19)'a neden olarak, takip eden yılın Mart ayından itibaren ülkemizde de ulaşmış ve yıkıcı bir etki meydana getirmiştir. Bu süreçte enfeksiyon etkeni olan severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) ve bu etkene karşı gelişen immün yanıt hakkındaki araştırmalar da doğal olarak hız kazanmış ve önemli miktarda bilgi birikimi sağlanmıştır. Böylelikle gerek tanı gerekse korunma ve tedaviye yönelik belli bir mesafe kat edilmiştir.

SARS-CoV-2'nin bulaştırıcılığı çok yüksek olmasına rağmen maruz kalan herkeste aynı şiddette enfeksiyon gelişmemektedir. Konağın genetik yatkınlığına ilişkin açıklığa kavuşmamış birçok nokta bulunmaktadır. Angiotensin converting enzyme-2 (ACE2) ve human leukocyte antigen (HLA) polimorfizmlerinin etkisi ile ilgili çeşitli spekülasyonlar vardır. Ayrıca yaş, cinsiyet, sigara ve eşlik eden hastalıklar gibi konakçıya bağlı faktörler yanında; viral yük, etkenin virülansı ve maruziyet süresi gibi virüse bağlı faktörler de gelişen immün yanıtın tipini ve şiddetini belirler.

COVID-19 enfeksiyonunda çoğu zaman hafif-orta şiddette hastalık tablosu gelişerek bir haftada iyileşme gerçekleşir. Bazı hastalarda ise ikinci haftada ciddi pnömoni gelişir; üçüncü haftaya girildiğinde acute respiratory distress syndrome (ARDS) ve disseminated intravascular coagulation (DIC) tablosu gelişerek hastalık çoklu organ yetmezliğine ilerler (1).

SARS-CoV-2 Yapısı ve Reseptörleri

Coronaviridae ailesi içinde bulunan koronavirüslerin 400'den fazla çeşidi olup, başlıca dört sınıfa ayrılır: a, b, g ve d. İnsanları enfekte edebilen 7 farklı koronavirüs tanımlanmıştır. Bunlardan ilk 4'ü a veya b koronavirüs ailesindedir ve hafif seyirli bir enfeksiyon tablosu ortaya çıkarır. SARS-CoV-2 ise, önceki yıllarda salgın yapan ve SARS-CoV (2003) ve MERS-CoV (2012) virüslerinin de içinde olduğu b coronavirus ailesi içinde yer alır. İnsanlarda şiddetli ve akut solunum yetmezliği sendromuna yol açan virüslerin yapısal özellikleri ve genomik organizasyonları da birbirine benzer.

Koronavirüsler: helikal kapsidli, pozitif-polariteli, zarflı ve tek sarmallı RNA virüsleridir. RNA virüsleri arasında en büyük genoma (24-34 kb) sahiptir. Genomunda 5' kısmından 3' kısmına doğru öncelikle ORF1a, b replikazlarını kodlayan genler ile pp1a ve pp1b poli-proteinlerini kodlayan genler bulunur; 3' ucuna yakın kısımda ise yapısal

proteinleri kodlayan genler yer alır (2). Her biri farklı görevler üstlenen 4 yapısal protein bulunur: yüzey glikoproteini (S: spike), zarf proteini (E: envelop), membran proteini (M), nükleokapsid proteini (N). Pozitif polariteli oldukları için RNA'ya bağımlı RNA polimeraz içermezler, ancak genomlarında bu enzimi kodlarlar. Hücre içine girdiklerinde RNA'ları doğrudan doğruya mRNA olarak kullanılabilir.

S proteini, trimerik tip 1 glikoproteindir ve virion membranından dışarı doğru çıkarak taç şekli verir. İki alt ünitesi vardır, S1 (ampul: bulb) ünitesi reseptör bağlanma bölgesi (RBB) içerirken, S2 (sap) ünitesi virionun konak hücre membranı ile birleşmesinden sorumludur (3,4). RBB, hem konak hücre membranı için ligand görevi görür, hem de T ve B hücreleri tarafından tanınan epitoplara taşır.

SARS-CoV-2 Virüsünün Hedef Hücreye Girişi ve Çoğalması

SARS-CoV-2, S proteinini kullanarak hedef hücre yüzeyinde ifade edilen ACE2 molekülüne bağlanır (5,6). Ancak bu bağlanmadan hemen önce S proteini, hedef hücre yüzeyinde ifade edilen transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) enzimi yardımıyla aktive olur; S1 ve S2 alt ünitelerine ayrılır. S1 parçacığı RBB ile ACE2 molekülüne bağlanırken, S2 parçacığı virüs membranı ile hedef hücre membranının birleşmesini sağlar (7). Böylece virüs endositoz yolu ile hücre sitoplazmasına girer (8,9) (Tablo 1). ACE2 molekülü ifade eden ve SARS-CoV-2 tarafından enfekte edilen başlıca hücreler; Tip 1-2 pnömositler, intestinal epitel hücreleri (enterosit), böbrek proksimal tüp hücreleri, damar endoteli (arter, ven), arteriyel düz kas hücreleri, nazal goblet hücreleri, olfaktör epitel ve kök hücreleridir.

Virüs hücre içine girdikten sonra yine enzimatik bir dizi reaksiyona maruz kalır ve genetik materyali (RNA) sitoplazmaya geçer. Ribozomlara ulaşan RNA kalıp görevi göerek, bir taraftan viral polimeraz aracılığıyla kendi benzerlerini yapar (replikasyon), diğer taraftan yapısal proteinlerin sentezlenmesini (translasyon) sağlar. Yeni sentezlenen genetik materyal (RNA) ve yapısal proteinler endoplazmik retikulum ve golgi kompleksinde bir araya getirilerek yeni virionlar oluşturulur. Bu virionlar daha sonra veziküllere aktararak ekzositoz yoluyla hücreden atılır (10). Çok fazla sayıda virionun salınımı hem komşu hücrelerin enfekte olmasına hem de viremiye sebep olur.

SARS-CoV-2 Virüsüne Karşı Gelişen İmmün Yanıt

Doğal İmmün Yanıt:

Doğal bağışıklık sistemi virüslere karşı geliştirilen bağışıklık yanıtından birinci derecede sorumludur. Doğal immün yanıtta görev yapan hücrelerin (makrofajlar, monositler, dendritik hücreler, nötrofiller) yüzeyinde ve sitoplazmasında enfeksiyöz ajanları tanıyan ve bağlayan reseptörler bulunur. "Patern tanıma reseptörü (PTR)" olarak adlandırılan bu reseptörler SARS-CoV-2'nin hedefi olan hücrelerde de ifade edilir. Başlıca PTR'ler: toll-benzeri reseptörleridir (TLR), NOD benzeri reseptörler (NLR) ve RIG-I benzeri reseptörlerdir (RLR). PTR'lerin bağlandığı moleküllere de patojen ile ilişkili moleküler patern (PAMP) denir. Bu moleküllerin reseptörlerine bağlanması, hücre içerisinde sinyal ileti

mekanizmasını tetikleyerek inflamatuvar ya da anti-inflamatuvar sitokinlerin sentezi uyarılır.

Virüs genetik materyali TLR3, TLR7/8 ve TLR9 üzerinden nuclear factor kappa B (NF- κ B) yolunu aktive ederek interleukin (IL)-6 ve tumor necrosis factor α (TNF α) gibi proinflamatuvar sitokinlerin sentezlenmesini sağlar. Ayrıca enfeksiyöz ajan tek sarmallı RNA virüsü olduğunda, genetik materyal endozomlarda bulunan TLR'lere (TLR7/8, TLR-9) bağlanarak virüslere karşı savunmada önemli rol oynayan Tip-I interferon sentezi (IFN α , IFN β) uyarılır (11). Bu sitokinler de hücreden salgılandıktan sonra kendi reseptörlerine bağlanarak (IFNAR-I, IFNAR-II) anti-viral proteinlerin sentezini sağlayan yolu aktive eder. Anti-viral proteinlerin görevi hücre içerisinde yeni virionların oluşmasını engellemektir (anti-viral state). Bu nedenle COVID-19'un sınırlandırılabilmesi için erken dönemde yeterli miktarda Tip-I IFN üretilmesi gerekir. Aksi takdirde virüsler çoğalarak tüm dokuya yayılır.

SARS-CoV-2'nin hücrelerde Tip-1 IFN sentezini baskılayan proteinlerin sentezini uyardığı, böylelikle antiviral cevabın geciktiği, virüs replikasyonun arttığı ve virüs ile ilişkili sitopatik etkinin dokuda giderek yayıldığı gösterilmiştir (12-14). Enfeksiyonun erken döneminde Tip-I IFN yanıtın gecikmesi ya da hiç meydana gelmemesi, doğal bağışıklık bileşenlerinin devreye girmesine neden olur. Böylelikle enfeksiyonu kontrol altına almak üzere virüsün çoğaldığı bölgede nötrofiller, monositler, makrofajlar, lenfositler ve NK hücreleri birikmeye başlar; abartılı bir immün yanıt ortaya çıkar. "Hiperinflamasyon" olarak adlandırılan bu süreçte viral proteinler hedef hücrelerde (epitel hücreleri, endotel hücreleri, makrofajlar) NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)-, LRR (leucine-rich repeat)- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflamazom kompleksini uyararak IL-1 β ve IL-18 sentezini sağlar (15). Enfeksiyonun erken döneminde ve ileri aşamalarında artan sitokinler (sitokin fırtınası) bir taraftan lokal ve sistemik inflamasyona katkıda bulunurken, diğer taraftan adaptif immüniteyi uyarırlar (12-14).

Yapılan bir araştırmada COVID-19 nedeniyle kaybedilen hastalarda ölçülen IFN-gamma induced protein-10 (CXCL-10/IP-10), monokine induced by IFN γ (MIG) ve Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) düzeylerinin iyileşen hastalardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (16). Yeni yayınlanan diğer bir çalışmada ise COVID-19'lu hastaların bronkoalveolar lavaj numunelerinde CC kemokine ligand (CCL) 2, CXC kemokine ligand (CXCL) 2, CCL8, CXCL1, CCL3L1 ve IL-33; periferik kanlarında IP-10, tumor necrosis factor superfamily-10 (TNFSF10), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP1), complement (C) 5, IL-18, amphiregulin, nöregulin1 ve IL-10 tespit edilmiş, bu bulguların hiperinflamasyon ve sitokin fırtınası göstergesi olduğu ileri sürülmüştür (17). Ağır seyirli olgularda birçok sitokin ve kemokin salgılanmasına rağmen plazmada IL-6'nın yüksek olması kötü prognoz ve ölüm riski ile ilişkilendirilmiştir (18).

Ağır seyirli COVID-19 enfeksiyonu esnasında gelişen hiperinflamasyonun, endotel hücre aktivasyonu ve disfonksiyonuna neden olarak protrombotik süreci başlattığı tespit edilmiştir (19). Bu süreçte: trombositler, koagülasyon faktörleri ve doğal bağışıklık hücrelerinin birbiri ile sürekli bir etkileşim halinde olması pıhtı oluşumunda rol oynarlar. Bu olaya immünotromboz (tromboinflamasyon) adı verilir. Bu durum patojenin yayılmasını

önlemede ve endotele yapısal destek sağlamada yararlı olsa da kontrolsüz ve yaygın immünötromboz, yaygın mikroanjiyopatiye sebep olarak ARDS gelişimine katkıda bulunur (19).

Adaptif İmmün Yanıt:

T hücre yanıtı:

CD4⁺T hücreleri, virüse özgü antikor üretimi için B hücrelerine yardım ederler. Ayrıca salgıladıkları sitokinlerle immün modülasyon yaparlar. Ancak, CD8⁺ T hücreleri ise sitotoksik etki göstererek virüsle enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Sitotoksik etkiden perforin ve granzimler sorumludur (20). Dolayısı ile SARS-CoV-2'nin neden olduğu enfeksiyonda CD8⁺ T hücreleri kritik bir öneme sahiptir (21). COVID-19'da gelişen lenfopeniden en fazla etkilenen hücrelerin CD8⁺ T hücreleri olduğu gösterilmiş, bunun hastalık şiddeti ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (22). Ancak virüsün T hücrelerine girerek sitopatik etki oluşturması, S proteininin ACE2 yerine CD147 ve CD26 moleküllerine bağlanması ile gerçekleşir (Tablo 1) (23).

Tablo 1. SARS-CoV-2'nin hedef hücrelere girişinde rol oynayan moleküller.

Molekül	Açıklama
ACE2	Hücre içine giriş reseptörüdür (metallopeptidaz). Türler arası bulaştırıcılıkta önemlidir. Başlıca Tip 1, -2 pnömosit, intestinal epitel (enterosit) hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri, arter ve ven endoteli, arteryal düz kas, nazal goblet hücreleri, olfaktor epitel ve kök hücrelerde bulunur.
Spike (S) proteini	Konak hücrede ACE2 reseptörüne bağlanarak hücre içine girişi sağlar. Konakta gelişen nötralizan antikorlarının ana hedefidir.
TMPRSS2	Viral spike proteinini S1 ve S2 parçalarına ayırır. Özellikle intestinal epitel hücrelerinde ifade edilir.
CD147 (Basigin)	Ekstraselüler matris metalloproteinaz uyarıcısıdır. İnsan havayolu, böbrek epitel, doğal bağışıklık hücreleri ve lenfositlerde ifade edilir.
CD26, CD13, CD249	Hücre içine geçişte kullanılan diğer reseptörler.

IL-1 β ve TNF α hem Th17 kutuplaşmasını uyarır hem de vasküler geçirgenliği artırır. Th17 hücreleri IL-17 ve granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) üretir. Bu sitokinler otoimmün ve inflamatuvar hastalıklarla ilişkilidir. IL-17, bazı inflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri uyararak granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), IL-1 β , IL-6, TNF α , macrophage inflammatory protein 2A (MIP2A), IL-8, IP10 ve MIP3A uyararak inflamasyonu artırır. Ancak diğer taraftan da doku iyileşmesinde rol oynayan matrix metalloproteinase (MMP)'lerin açığa çıkmasını sağlar (24). Şiddetli COVID-19 enfeksiyonu geçiren hastaların kanlarında Th17 hücrelerinin gösterilmesi patogeneizde bu hücrelerin rolünü destekleyen önemli bir bulgu olarak dikkat çekmektedir.

B hücre yanıtı:

Antijen sunan hücreler (makrofajlar, dendritik hücreler) tarafından işlenen viral peptidler öncelikle CD4+ T hücrelerine sunulur. Aktive olan T hücreleri salgıladıkları sitokinlerle B hücrelerini çoğalmak üzere uyarır ve bu hücrelerden SARS-CoV-2'ye özgü yüksek afiniteli antikor üreten plazma hücreleri ve hafıza hücrelerinin gelişmesini sağlar. Üretilen antikorlar çoğunlukla virüsün S proteinine karşıdır ve IgG, IgA ve/veya IgM izotipindedir. Virüse karşı nötralizan etki göstererek S proteininin ACE2 molekülüne bağlanmasını önlerler.

Diğer viral enfeksiyonlarda olduğu gibi SARS-CoV-2'de de semptomlar başladıktan sonra erken dönemde (3-6 gün) antikor yanıtı IgM ve/veya IgA izotipinde gelişir; geç dönemde ise (10-18 gün) antikor yanıtı IgG izotipine çevrilir (25). Ancak son zamanlarda SARS-CoV-2'ye spesifik IgG yanıtının daha erken geliştiği ve tepe noktaya IgM antikorundan daha önce ulaştığına dair bazı bilgiler de paylaşılmıştır (26,27). Şu an için virüse karşı oluşan antikorların ne kadar süreyle koruyucu olduğu konusu henüz netlik kazanmamıştır. Ayrıca virus solunum yolundan vücuda girdiği için sekretuar IgA'nın önemli olduğu ileri sürülmüş, ancak bu konuda da henüz kesin bir bilgi elde edilememiştir (25).

Eğitilmiş İmmünite (Trained Immunity)

Doğal immün sistemdeki immünolojik hafıza "eğitilmiş immünite-trained immunity" olarak adlandırılır ve bazı enfeksiyonların yayılmasını ve şiddetini etkileyebilir. COVID-19 pandemisi döneminde de Bacillus Calmette-Guérin (BCG) aşılama politikalarının farklı ülkelerde COVID-19'un yayılma hızını, morbidite ve mortalitesini etkileyebileceği hipotezleri ortaya atılmıştır (28,29). Ancak bu konu aşılamanın BCG aşısının bırakıldığı ya da sadece belirli popülasyonlarda uygulandığı ülkelerde pandemi sonrası yapılacak araştırmalar neticesinde netlik kazanacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med* 2020; 46:846-8.
2. Fung TS, Liu DX. Human coronavirus: Host pathogen interaction. *Annu Rev Microbiol* 2019; 73:529-57.
3. Tai W, He L, Zhang X, Pu J, Voronin D, Jiang S, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* 2020; 17:621-30.
4. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature* 2020; 581:215-20.
5. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579:270-3.
6. Kim YI, Kim SG, Kim SM, Kim EH, Park S, Yu KM, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe* 2020; 27:704-9.
7. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181:271-80.

8. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 2020; 11:1620.
9. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* 2020; 5:562–9.
10. Alanagreh L, Alzoughool F, Atoum M. The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens* 2020; 9:331.
11. Conti P, Ronconi G, Caraffa A, Gallenga CE, Ross R, Frydas I, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by Coronavirus-19 (COVID-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies. *J Biol Regul Homeost Agents* 2020; 34:327-31.
12. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe* 2016; 19:181-93.
13. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 2020; 395:1033-4.
14. Behrens EM, Koretzky GA. Review: cytokine storm syndrome: looking toward the precision medicine Era. *Arthritis Rheumatol* 2017; 69:1135-43.
15. Blanco-Melo D, Nilsson-Payant BE, Liu CW, Uhl S, Hoagland D, Moller R, et al. Imbalanced host response to SARS-CoV-2 drives development of COVID-19. *Cell* 2020; 181:1036-45.
16. Huang KJ, Su IJ, Theron M, Wu YC, Lai SK, Liu CC, et al. An interferon-gamma-related cytokine storm in SARS patients. *J Med Virol* 2005; 75:185-94.
17. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect* 2020; 9:761-70.
18. Wu C, Chen X, Cai Y, Xia J, Zhou X, Xu S, et al. Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China. *JAMA Intern Med* 2020; 180:1-11.
19. Henry BM, Vikse J, Benoit S, Favaloro EJ, Lippi G. Hyperinflammation and derangement of renin-angiotensin-aldosterone system in COVID-19: A novel hypothesis for clinically suspected hypercoagulopathy and microvascular immunothrombosis. *Clin Chim Acta* 2020; 507:167-73.
20. Schmidt ME, Varga SM. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. *Front Immunol* 2018; 9:678.
21. Retamal-Diaz A, Covian C, Pacheco GA, Castiglione-Matamala, AT, Bueno SM, González PA, et al. Contribution of resident memory CD8(+) T cells to protective immunity against respiratory syncytial virus and their impact on vaccine design. *Pathogens* 2019; 8:147.
22. Zheng M, Gao Y, Wang G, Song G, Liu S, Sun D, et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. *Cell Mol Immunol* 2020; 17:533-5.
23. Wang X, Xu W, Hu G, Xia S, Sun Z, Liu Z, et al. SARS-CoV-2 infects T lymphocytes through its spike protein-mediated membrane fusion. *Cell Mol Immunol* 2020; 17:894.
24. Wu D, Yang XO. TH17 responses in cytokine storm of COVID-19: An emerging target of JAK2 inhibitor Fedratinib. *J Microbiol Immunol Infect* 2020; 53:368-70.
25. Guo L, Ren L, Yang S, Xiao M, Chang D, Yang F, et al. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin Infect Dis* 2020; 71:778-85.
26. Long QX, Liu BZ, Deng HJ, Wu GC, Deng K, Chen YK, et al. Antibody responses to SARSCoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med* 2020; 2:845-8.

27. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 2020; 20:565-74.
28. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Tamay Z. Is BCG vaccination effecting the spread and severity of COVID-19. *Allergy* 2020; 75:1824-7.
29. Gursel M, Gursel I. Is global BCG vaccination-induced trained immunity relevant to the progression of the SARS-CoV-2 pandemic? *Allergy* 2020; 75:1815-9.