



SARS-CoV-2 Kökeni

The Origin of SARS-CoV-2

 Bahadır Feyzioglu

Necmettin Erbakan University, Meram Medical Faculty Department of Medical Microbiology, Division of Medical Virology, Konya, Turkey

ORCID ID: Bahadır Feyzioglu: 0000-0002-0991-2132

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Doç. Dr. Bahadır Feyzioglu, e-posta / e-mail: gsirin@live.com

Geliş Tarihi / Received : 31-03-2020

Kabul Tarihi / Accepted: 07-04-2020

Yayın Tarihi / Online Published: 10-04-2020

Atf Gösterimi/How to Cite: Feyzioglu B., SARS-CoV-2 Kökeni, J Biotechnol and Strategic Health Res. 2020;1(Özel Sayı):1-9

Öz

Yeni tip bir insan koronavirüsü olan SARS-CoV-2'nin neden olduğu küresel salgın, tüm insanlık için endişe oluşturmaktadır. SARS-CoV-2, insan patojeni olarak tanımlanan yedinci koronavirüsdür. Bu virüslerden, HKU1, NL63, OC43 ve 229E hafif belirtilere neden olabilirken, SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 ciddi hastalıklarla ilişkilidir. SARS-CoV-2 hücre içine giriş için tıpkı SARS-CoV gibi, anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörünü kullanır ve SARS-CoV-2 S proteininde bulunan reseptör bağlanma alanı (RBA) bu reseptörlere güçlü bir şekilde bağlanabilir. Öte yandan, bir hayvan virüsünün insanları enfekte etmek için tür sınırlarını nasıl aştığına yönelik soruların yanıtlanması, gelecekteki zoonotik olayların nasıl önlenmesine dair değerli bilgiler verecektir. Salgının başlangıcından bu yana virüsün kökeni hakkında pek çok iddia ortaya atıldı. Bu derleme makalesinde, şimdiye kadar elde edilen veriler ışığında, virüsün kökeni hakkındaki ipuçlarını derledik. SARS-CoV-2 bazı yarasa virüslerine (RaTG-13) ve SARS-CoV'ye çok benzese de, daha önce tanımlanmayan benzersiz diziler içermektedir. RBD'deki amino asit dizileri açısından Pangolin CoV ile uyumlu olmasına rağmen, polibazik bölünme alanı benzersiz bir değişimin ürünüdür. Ayrıca, bu alandaki o-bağlı glikan kalıntıları, ancak bağışıklık tepkisi koşullarında elde edilebilecek bir kazanımdır. Her ne kadar kanıtlar SARS-CoV-2'nin manipüle edilmiş bir virüs olmadığını düşündürse de şu anda bu köken teorilerini tam olarak kanıtlamak veya reddetmek mümkün değildir. Bir hayvan virüsünün tür sınırlarını aşarak insanları nasıl etkili bir şekilde enfekte edebileceğini anlamak gelecekteki zoonotik olayların önlenmesine yardımcı olacaktır. Doğal rezervuarlarının yaygınlığı nedeniyle, gelecekteki araştırmalar, bu virüslerin daha geniş coğrafi alanları kapsayan aktif gözetimine odaklanmalıdır.

Anahtar Kelimeler Köken, polibazik yarıma alanı, reseptör bağlanma alanı, SARS-CoV-2,

Abstract

The ongoing pandemic of a new human coronavirus, SARS-CoV-2, has generated concern for all humanity. SARS-CoV-2 is the seventh coronavirus defined to human pathogens; HKU1, NL63, OC43, and 229E can cause mild symptoms, whereas SARS-CoV, MERS CoV, and SARS-CoV-2 are associated with severe disease. It has been shown that, similar to SARS-CoV, SARS-CoV-2 exploits the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor to gain entry inside the cells, and the receptor-binding domain (RBD) in SARS-CoV-2 S protein bound strongly to human and bat ACE2 receptors. On the other hand, answering how an animal virus has crossed species boundaries to infect humans will provide valuable information on how to prevent future zoonotic events. Many allegations have been raised about the origin of the virus since the outbreak began. In this review article, we have compiled clues about the origin of the virus, in the light of the data obtained so far. Although SARS-CoV-2 is very similar to some bat viruses (RaTG-13) and SARS-CoV, it contains unique sequences not previously defined. Although it is compatible with Pangolin CoV in terms of amino acid sequences in RBD, the polybasic cleavage area is the product of a unique change. Moreover, the o-linked glycan residues in this area are a unique that can be acquired in immune response conditions. Although evidence suggests that SARS-CoV-2 is not a manipulated virus, it is not currently possible to fully prove or refute these origin theories. Understanding how an animal virus can infect humans efficiently by crossing species limits will help prevent future zoonotic events. Natural reservoirs of coronaviruses have a widespread, that's why, future research should focus on active surveillance of these viruses, covering wider geographic areas.

Keywords Origin, polybasic cleavage area, receptor binding domain, SARS-CoV-2

GİRİŞ

2019 yılı sonu 2020 yılı başlangıcında Çin Hubei eyaleti Wuhan bölgesindeki yeni bir etkenin yol açtığı ilk pnömoni raporlarının bildirilmesinden bu yana, oldukça dinamik gelişmeler yaşandı. İlk raporlarda gizemini koruyan ve pek çok etiyojik faktörün olasılıklar arasında yer alabileceğine yönelik tahminler¹ kısa sürede yerini daha net bilgilere bıraktı. Çinli bilim adamları, 7 Ocak 2020'de bir hastadan yeni tip bir koronavirüs'ün izole edildiğini duyurdular. 2019-nCoV olarak adlandırdıkları virüsün genom dizilimini de ortaya koydular. SARS-CoV ile en az %70 benzerliğe sahip bu dizilim, 12 Ocak 2020'de WHO tarafından da kayda alındı ve farklı ülkelerdeki laboratuvarların yeni enfeksiyonu tespit etmek için spesifik tanıma kullanılacak PCR testlerini üretmesine klavuzluk yaptı. Virüs, Betakoronavirüs 2B grubuna ait bir virüs olarak WHO tarafından 2019-nCoV olarak adlandırıldı.² Çinli bilim insanları tarafından şubat başında yayımlanan eş zamanlı birden fazla çalışmada virüsün yarasa kaynaklı bir virüs olduğu vurgulanırken, SARS-CoV ile %80-90 arasında benzerliğini ortaya koyan veriler paylaşıldı.³ Bu veriler salgının erken evresinde birden fazla hastadan elde edilen tam uzunlukta genom dizilerini içeriyordu. Araştırmacılar, kritik bir hastanın bronkoalveoler lavaj sıvısından izole ettikleri 2019-nCoV virüsün, diğer birkaç hastadan aldıkları serum örnekleriyle nötralize edilebildiğini kaydederken, yeni virüsün bir yarasa koronavirüsüyle (RaTG-13) %96 benzer dizilime sahip olması gibi spekülasyon bir bilgiyi de paylaşmış oldular. Öte yandan yine bu araştırmaların sonucu, 2019-nCoV'nin SARS-CoV ile aynı hücrel giriş reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim reseptörü-2'yi (ACE2R) kullandığına dair iddiaları da teyit ediyordu.^{4,5} İlk genomik verilerin elde edildiği bu çalışmalarda hastalar yerel bir kapalı deniz ürünleri pazarıyla ilişkili bireyler olarak raporlandı. Araştırmacılar, o dönemde, balık ve kabuklu deniz hayvanlarına ek olarak, kirpi, porsuk, yılan, kuş ve kaplumbağalar dahil olmak üzere çeşitli canlı vahşi hayvanların, salgın başlamadan önce piyasada satışa sunulduğunu ancak, yarasa satışının olmadığı bilgisini paylaştılar. Bu bilgiler özellikle potansiyel bir ara konağı tar-

tışmaya açtı. Zira pek çok bulgu virüsün yarasa kökenine atıfta bulunurken, diğer olası hayvanlarda bulunan virüs türleriyle kıyaslamalı yapılan homoloji çalışmalarında da yarasa koronavirüs türleriyle (RaTG13 gibi) yakın ilişkisi ortaya kondu.⁶

Şu anda, "yeni tip bir pnömoni" COVID-19 hastalığının etkeni olarak SARS-CoV-2 (HCov-19), DSÖ'nün 11 Mart itibarıyla ilan ettiği pandemiyi ürkütücü etkeni olarak dolaşmaktadır ve hızla yeni bölgelere yayılımı devam etmektedir. Bu konuda bir yandan dünya genelinde alınan halk sağlığı tedbirleri, tedavi ve aşı arayışları sürerken, diğer yandan virüsün kaynağıyla ilgili spekülasyonlar artarak devam etmektedir. İlk vakanın ortaya çıkışındaki belirsizlik (zaman, konak hayvan vb) ile beraber, virüsün daha önce tanımlanmış bazı yarasa koronavirüslerine benzerliği ve SARS-CoV ile olan ilişkisi komplo teorileri için ilham kaynağıdır. Aslında SARS-CoV-2 koronavirüs ailesinin insanda hastalığa yol açan yedinci türüdür. Ciddi hastalık tablolarına yol açan SARS-CoV, MERS-CoV ve hafif semptomlarla ilişkili, HKU1, NL63, OC43 ve 229E gibi türler tür bariyerini aşarak insan patojenine dönüşen koronavirüslerdir. Bugün, "Tür bariyerini aşma olgusunun bir yenisiyle mi karşı karşıyayız?" Yoksa laboratuvarda üretilmiş bir virüs fikri daha olası bir durum mu?" sorularının yanıtları güncel bilimin en önemli merak konusudur. koronavirüslerin zarfı, virüs partiküllerinin hücreye girmesi için gerekli olan bir trimerik transmembran Spike (S) glikoproteini barındırır. Bu yapı, biri reseptöre bağlanmayı sağlayan diğeri ise virüsün hücre zarlarının füzyonuna aracılık eden iki fonksiyonel alan içerir. Birinci alanın reseptöre bağlanmasının ardından füzyonun gerçekleşmesi için füzyona aracılık eden alanın hücre proteazları ile ortaya çıkartılması gerekir. Bu S glikoproteininin hücre proteazları ile bölünmesi sayesinde gerçekleşir ve hücreye giriş için hayati öneme sahiptir.^{7,8} S glikoproteinini bölen bu hücre proteazının doğası, koronavirüs türüne göre değişir. Örneğin: MERS-CoV S glikoproteini, bir furin klevaj yeri içerir ve muhtemelen hücreden çıkış sırasında hücre içi proteazlar tarafından işlenir. Böylece, virüs parçacıkları

bir sonraki hücreye girmeye hazırdır. Aksine, SARS-CoV S glikoproteini hücrelerden virüs salımı sırasında primitiftir ve muhtemelen virüsün bir hücreye girişi sırasında parçalanır. Dolayısıyla, S glikoproteininin proteolitik bölünmesi virüsün türler arası geçişi için belirleyici bir faktör olarak nitelendirilebilir. Örneğin, Uganda da bulunan bazı yarasalardan elde edilen MERS benzeri bir koronavirüs S glikoproteininin insan hücrelerine bağlanabildiği, ancak hücre içine giremediği belirlenmiştir. Ortama tripsin proteaz dahil edildiğinde, S glikoproteininin yarılanması ve virüsün hücreye girişi gösterilmiştir. Bu gözlem, S glikoprotein yarılanmasının zoonotik koronavirüs bulaşması için aşılması gereken bir engel olduğunu ve aynı zamanda da muhtemel mutasyonlar üzerinden bir insan patojenine dönüşmesinin temel mekanizmalarından biri olacağını ortaya koymaktadır.

SARS-CoV-2 için şu zaman kadar yapılan yapısal ve fonksiyonel çalışmalar, virüsün insan ACE2R'ne bağlanma özelliğini vurgularken, spike glikoproteininin yapısına dair önemli bilgilerde kayda alınmıştır. Bu yeni virüsün ACE2R'ne olan affinitesi SARS-CoV ile olan yüksek yapısal benzerliğinin bir sonucu olarak gözükmektedir. Bu benzerlik değerli bir araştırma raporunda; farelerde poliklonal antikolar ile çapraz nötralizasyonun gösterilmesiyle pekiştirilmiştir. Bu durum aşı çalışmaları ve koruyucu antikolar üzerinden önemli bir perspektif olarak sunulmuştur.⁹ Öte yandan SARS-CoV için tanımlanmış monoklonal antikolar ile yapılan nötralizasyon testleri sonucu, iki virüs arasındaki çapraz immünitinin sınırlı olduğu yönünde bilgiler içeren çalışmalar da vardır.¹⁰ Bu araştırmaların başka bir çarpıcı sonucu ise, iki virüs arasındaki bariz bir farkı ortaya çıkarmıştır. SARS-CoV-2'de, ilgili gen bölgesine 12 nükleotidin sokulmasıyla S glikoproteini S1-S2 alanında oluşan değişim, fonksiyonel bir polibazik bölünme bölgesi ortaya çıkmıştır.¹ Yeni ortaya çıkan bu glikoprotein, furin proteazları için potansiyel bir yarıma yeri içerir. Bu proteaz normalde, hücreler olarak sentezlenen proteinlerin aktifleştirilmesinde rol alan ve bazik amino asitleri hedefleyerek ilgili proteinleri dönüştüren bir enzim olarak

işlev görmektedir. Bu gözlem, virüsün zoonotik kökeni ve Çin'deki salgının yayılımı üzerinde etkilere sahiptir. SARS-CoV-2'nin S glikoproteini üzerinde kazandığı yeni fonksiyonel polibazik bölünme bölgesi, Bat-CoV RaTG-13 (2013 yılında Yünnan'da bir yarasadan izole edilen ve SARS-CoV-2'ye yüksek nükleotit sekans homolojisi gösteren) ve SARS-CoV de bulunmayan özgün bir bölgedir.² Furin bölünme bölgesinin elde edilmesi, bir yarasa koronavirüsünün insanlara sıçraması ve yayılmasını sağlayan bir 'işlev kazancı' olarak görülebilir.

SARS-CoV-2 konak hücre reseptör etkileşiminden ve hücreye giriş fonksiyonundan sorumlu olan S glikoproteininin ayrıntılı amino asit incelemesi, virüsün orijini ve fenotipik analizi açısından net fikirler sunmaktadır. SARS-CoV, Bat-CoV RaTG-13, PangolinCoV ve iki Bat-SARS-CoV-related virüsün dahil edildiği yakın zamanda yayımlanmış bir araştırmada, ilgili protein amino asit dizimleri kıyaslanmıştır.¹¹ S1 alt ünitesinde bulunan ve koronavirüs genomunun en değişken kısmı olarak bilinen "reseptör bağlanma alanı (RBA)" ile viral enfektivite ve konak tropizminde kritik rolü olduğu düşünülen S1-S2 birleşme kısmındaki "polibazik bölünme bölgesi" bu kıyaslamaların odak noktası olmuştur. Araştırmacılar; Pangolin koronavirüs dizimleri için, SRR10168377 ve SRR10168378'de (NCBI BioProject PRJNA573298) belirtilen ve diğer virüsler için NCBI GenBank, MN908947, MN996532, AY278741, KY417146 ve MK211376 erişim kodları ile sunulan dizimleri kıyaslamışlardır.¹²

Reseptör bağlanma alanında yer alan altı amino asit, ACE2R'ne bağlanan ana dizilimin kritik kısmını oluşturmaktadır. Bu pozisyonlarda türler arası farklılıklar söz konusudur. İlgili çekici sonuç ise SARS-CoV-2 ve SARS-CoV arasında bu altı amino asidin beşinin farklı olmasıdır. SARS-CoV için ilgili pozisyonlarda bulunan Y442, L472, N479, D480, T487'ye, SARS-CoV-2'de L455, F486, Q493, S494, N501 karşılık gelmektedir. Reseptör bağlanma bölgesinde ki bu farklılığa rağmen aynı reseptöre (ACE2) ilgi- nin devam etmesi ve SARS-CoV-2 Spike proteininin insan

ACE2R'ne yüksek affiniteyle bağlanması, büyük olasılıkla insan ACE2R veya insan benzeri bir ACE2R'nün başka bir optimal alanına bağlanabilme özelliği kazandıran, doğal bir seçilimin sonucu olarak yorumlanmıştır (ara konak varlığı ve rolü bu bağlamda yanıt bekleyen önemli sorulardandır).¹³ Nitekim, yarasalarda bulunan ortak β -koronavirüs kökeninden, 2003 yılında insana ve misk kedisine tropizm gösteren iki ayrı seçilimin olduğu bilinmektedir.¹³ Bu doğal seçim, SARS-CoV-2 için bağlanma affinitesi açısından bir kapasite artışına yol açmış olabilir. Araştırmacılar tarafından bu durum, SARS-CoV-2'nin bir manipülasyon ürünü olmadığı yönünde güçlü bir delil olarak sunulmuştur.¹¹

Furin ve diğer proteazlar tarafından etkili biçimde bölünen ve viral enfektivite ve konak tropizminde belirleyici olduğu düşünülen polibazik bölünme bölgesi, SARS-CoV-2 S1 ve S2 birleşiminde yer alan RRARR (Prolin-Arginin-Alanin-Arginin-Arginin) dizilimini içeren özgün bir değişimdir. Bazik amino asitler furin proteazlar için uygun bir hedefe dönüşürken, Prolin dönüşü ile glikanların optimum bağlanması mümkün olmuştur. Bu yeni varyasyona benzer durum HKU-1 koronavirüste de gösterilmiştir⁸ ve varyasyon seviyesine bakıldığında keşfedilmeyi bekleyen başka muhtemel türler de bulunabilir. O-bağlı glikanların fonksiyonuna ilişkin henüz deneysel çalışma sonuçları yoktur, ancak Spike proteinindeki epitoplara veya önemli kalıntıları koruyan 'müsin benzeri bir alan' olabileceği ve immün-kaçış mekanizmasının bir parçası olabileceği öngörülmektedir.¹⁴

SARS-CoV-2 için ortaya atılan; "manipüle edilmiş, laboratuvar ortamında üretilmiş, melez, hibrid bir virüstür" iddiaları, virüsün belirlendiği ilk günden itibaren sıkça dile getirilmektedir. Üstelik bunu başarabilecek metodolojik yaklaşımlar günümüz için yeterli görülmektedir. Bakteriyel yapay kromozomlar (BAC'ler) kullanılarak, cDNA fragmanlarının in vitro ligasyonu ile veya aşı virüsü ile yapılan ters genetik dizayn çalışmaları viral manipülasyonlar için kullanılabilecek başlıca yöntemlerdir.^{15,16,17} Bu yöntemler Korona-

virüs ailesi için de uygulanmıştır.¹⁵ Hatta SARS benzeri virüslerden kimerik potansiyel insan virüsü geliştirmeye kadar uzanan ve bugünkü tartışmaların merkezine oturtulan uygulamalar da raporlanmıştır.¹⁸ Ancak, yukarıda dile getirilen SARS-CoV-2 Spike proteini özgün alanları, daha önce bilinen herhangi bir virüs yapısında gösterilmemiştir. Bu durum laboratuvar ortamında üretilmiş virüs iddiasını zora sokmaktadır. Öyleyse akıldaki ikinci soru şudur: "Bildiğimiz bazı Koronavirüslere çok benzeyen, bazılarıyla aynı reseptör, konak ve hastalık profilini gösteren, ancak aynı zamanda özgün genotipik-fenotipik özelliklere de sahip bir kompozisyon, doğal olarak nasıl ortaya çıkmış olabilir?" Andersen ve arkadaşlarının bu soruya karşı sundukları iki alternatifli bir yanıt var.¹¹ Daha önce var olmayan (tanımlanmamış), yeni ortaya çıkmış ve enfeksiyonu optimum şekilde sağlayabilecek amino asit dizilimlerinin varlığı, ancak "doğal seçilim" ile açıklanabilir. Zoonotik kaynağın neredeyse kesin olduğu bu seçim; zoonotik transferden önce bir hayvan konakta ya da zoonotik transferin ardından insanlarda gerçekleşmiş olabilir.

Başlangıçtaki birçok COVID-19 vakası Wuhan'daki Huanan pazarıyla ilişkilendirilmiştir ve kaynak bir hayvanın bulunması yüksek olasılıklıdır. SARS-CoV-2'nin yarasalarla SARS-CoV benzeri koronavirüslere yüksek benzerliği göz önüne alındığında, yarasaların bu virüsün başlangıç konağı olması kuvvetle muhtemeldir. Bir yarasalar koronavirüsü olan RaTG13, SARS-CoV-2 ile toplamda ~%96 özdeş olmasına rağmen, RBA'nın yukarıda bahsi geçen altı kritik amino asit açısından uyumsuz olması bu virüsün ACE2R optimizasyonunun önünde bir engel olarak görülmektedir. Oysa Guangdong eyaletine yasadışı yollarla ithal edilen Malay pangolinlerinde (Manis javanica) bulunan bazı koronavirüsler, bu altı amino asit açısından tam benzerlik içermektedir. Bu durum birden fazla araştırmayla gösterilmiştir.^{19,20} Bunlar, metagenomik çalışmalardır ve kıyaslama yapılabilecek ilk/orijinal örneğin olmaması en önemli eksiklik olarak göze çarpmaktadır. Salgın başlangıcında Wuhan pazarının temizlenmesi ve başlangıçta mevcut olan hayvanlardan elde edilmiş sağlıklı izolasyon verile-

rinin olmayışı meseleyi bulanıklaştıran bir diğer önemli durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Tam da insan salgınına yakın bir zaman diliminde, Çin'in Guangdong Vahşi Yaşamı Kurtarma Merkezi'nden Liu ve arkadaşlarının 24 Ekim 2019'da yayımladıkları raporları, pangolin tartışmaları için ilk değerli ipuçlarını içermektedir.²¹ Araştırmacılar bu raporda, akciğerlerinde köpüklü bir sıvı belirledikleri ve pulmoner fibrozis tespit ettikleri iki ölü malay pangolininin akciğer örneklerinden SARS benzeri koronavirüs tespit etmişlerdir. RaTG13, Pangolin CoV ve SARS-Cov-2 nin yakın ilişkili olduğunu ortaya koyan ilk metagenomik rapor ise Zhang ve arkadaşlarınca Şubat 2020 de yayımlanmıştır.¹⁹ Sonrasında, yasa dışı yollarla transferi yapılırken gümrük güvenlik ekiplerince 2018 yılı içerisinde el konulan pangolinlere ait ölü dokulardan yüksek verimlilikle elde edilen dizilimler, başka araştırmacılar tarafından yayımlanmıştır.²⁰ Bu çalışmalarda ifade edilen, Pangolin CoV ve SARS-Cov-2 RBA amino asit homolojisi, "insana adapte olmuş bu virüsün pangolinlerde gerçekleşen bir ön seçim sürecini gösteriyor olabilir mi?" sorusuna neden olmuştur.

Spike proteinin polibazik bölünme bölgesi ise, ne şimdiye kadar örneklenen yarasalar betakoronavirüslerinde ne de pangolin betakoronavirüslerinde tanımlanmamıştır. Şimdiye kadar yarasalar ve diğer hayvan türlerindeki koronavirüslerin çeşitliliğinin tam ortaya konulamamış olması polibazik bölünme bölgesinin şu an için SARS-CoV-2'ye özgün kalmasının en önemli nedenlerinden biri olabilir. Öte yandan koronavirüsler ile ilgili ekleme-silme şeklindeki mutasyonlar ağırlıklı olarak S1-S2 alanında tanımlanmıştır. Bu alan, koronavirüsler için doğal değişim-dönüşüm dinamiklerinin merkezinde yer almaktadır. Bir prekürsör virüsün hem polibazik bölünme bölgesi hem de RBA için uygun mutasyonları elde etmesi, doğal seleksiyonun verimli bir şekilde ilerlemesine izin veren ve insan ACE2R'ne benzer kodlama yapabilen bir hayvan konakçının varlığıyla mümkün olabilir. Şu anki bilgiler ışığında en kuvvetli aday pangolindir. Zira, insanlar ve pangolinler arasında (%84,8) ACE2R dizisi benzerliği, insanlar ve

yarasalar arasındaki (%80,8-81,4; *Rhinolophus* sp.) daha yüksektir ve pangolinler, SARS-CoV-2 ile ilişkili bir koronavirüs tarafından enfekte olduğu belgelenen, yarasalar dışındaki tek memelidir.²⁰ Koronavirüslerin ortaya çıkışındaki rollerini ve gelecekteki zoonotik bulaşma riskini anlamak için Çin ve Güneydoğu Asya'daki doğal ortamda pangolinler üzerinde daha fazla gözlem gereklidir.

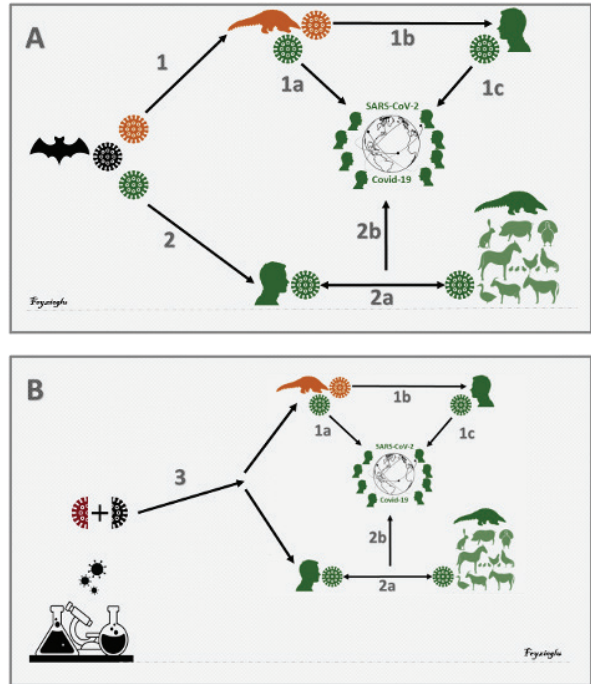
Güncel sekans verileri ile yapılan SARS-CoV-2'nin en son ortak atasına dair zamanlama tahminleri, retrospektif olarak doğrulanmış vakalarla uyumlu olarak virüsün 2019 Kasım sonu Aralık başında ortaya çıktığını işaret etmektedir.²² Öte yandan mevcut genom dizisi verilerine dayanarak, salgının en azından Aralık ayından beri tamamen insandan insana bulaştığı sonucuna varılabilir. Bu virüs hala bir veya daha fazla insan dışı hayvan türünde mevcut olsa bile, mevcut insan salgını kontrol altına alınana kadar pratik bir anlamı olmayacaktır. Öte yandan, gelecek zaman diliminde yeni bir saçılımın da kaynağı olabilecektir. Elimizdeki kronolojik veriler, insanlarda ilk zoonotik enfeksiyonun ortay çıkmasıyla, polibazik bölünme bölgesinin kazanılması arasında henüz aydınlatılmamış bir geçiş dönemi olduğunu düşündürmektedir. İnsanlar arasında oldukça hızlı yayılan bu virüs için bildiğimiz vakaların çok öncesinde bir yayılım öyküsü olması çok muhtemel değildir. Oysa bu durum, tek hörgüçlü deve kaynaklı tekrarlayan sıçramalarının sonucu olarak tekli enfeksiyonlar veya kısa bulaş zincirleri oluşturan MERS-CoV için bildik bir durumdur. Çünkü MERS-CoV hızlı ve yaygın enfeksiyon yapacak adaptasyona sahip değildir.²³

Hücre kültürü ve/veya hayvan modellerinde yarasalar SARS-CoV benzeri koronavirüsler ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. SARS-CoV ile ilişkili olarak 2013 yılında yapılan bir çalışmada, insan hücrelerinde ACE2R'ni kullanarak düşük seviyede replike olabilen, Rs3306 kümesinden, WIV1-CoV'ü raporlanmıştır. Araştırmacılar, WIV1-CoV'ün ACE2R kullanma kapasitesinin SARS benzeri bir salgın için risk taşıdığını ifade etmişlerdir.²⁴ Benzer bir çalışma WIV1'le çok yakın ilişkili SHC014 Bat-CoV ile

de yapılmıştır.¹⁸ Kritik tanı reaktifleri üretme, yeni suşların ortaya çıkma potansiyelini tanımlama ve mevcut terapötiklerin etkinliğini belirleme gibi hedefleri olan bu vb araştırmalarda; dolaşımda olan koronavirüslerden ters genetik sistemler kullanılarak tam uzunlukta ve kimerik virüsler elde edilmiştir. WIV1-CoV gibi insan ACE2R uyumlu Spike proteinine sahip virüslerin, insan solunum yolu epitel hücre kültürlerindeki replikasyon yeteneği, insan enfeksiyonu potansiyelini ortaya koymaktadır. Ancak etkili ve bulaşıcı bir enfeksiyon oluşturabilme potansiyeli için, spike proteini reseptör bağlanma alanında oluşan değişimlere ek olarak, başka bağımsız adaptasyonların da gerekliliği vurgulanmıştır. Diğer taraftan, yeni ve kimerik reaktifler oluşturmayı hedefleyen bu tür manipülasyonlar sırasında, zayıf da olsa virulans artışı veya immünolojik değişiklik olasılığının, ciddi çekinceler oluşturduğu bizzat bu araştırmaları yapan bilim insanları tarafından ifade edilmiştir.²⁵ Üstelik SARS-CoV'un laboratuvar kaynaklı saçılımlarının belgelenmiş örnekleri vardır. Bu, laboratuvar kaynaklı virüs spekülasyonları için iştah kabartıcı bir bilgidir. Ancak şu an ki bilgilerimiz ışığında, zıt olasılıkların aynı anda olması gibi bir çıkmaza girmiş bir iddiadan fazlası değildir. Teorik olarak SARS-CoV-2'nin SARS-CoV çalışmalarında gözlemlendiği gibi hücre kültüründeki pasajları sırasında RBA mutasyonları edinmiş olması mümkün gözükse de pangolinlerde benzer RBA diziliminin mevcut olması SARS-CoV-2 RBA ilişkisini daha net vurgulamaktadır. Üstelik bu iddia, daha önce tanımlananlardan farklı ve özgün bir dizilime sahip RBA içeren ve insan ACE2R adaptasyonu sergileyen bir virüsün önceden bilinmesi, elde edilmesi ve manipüle edilmesi koşuluna bağlıdır. Bununla kalmayıp, elde edilen virüsün polibazik bölünme noktası ve o-glikan dizilim açısından da yeni ve özgün kazanımlar elde etmesi gerekecektir. Virüsün insan tropizmi ve enfeksiyon kabiliyeti açısından optimizasyonunu sağlayan bu değişikliklerin ters genetik dizayn çalışmaları ile kurgulanabilmesi de mevcut bilgilerimiz ışığında mümkün gözükmemektedir. O-glikan dizilimlerinin virüslere immun kaçış yeteneği kazandırdığı daha önce tanımlanmıştır¹⁴. Dolayısıyla, genelde ve bu virüs özelinde, bu dizilimlerin hücre kültürü

kaynaklı bir seçimle elde edilmesi de mümkün gözükmemektedir.

Hayvan kaynaklarından ilgili viral sekansların elde edilmesi, viral kökeni ortaya çıkarmanın en kesin yoludur. Ancak ne yazık ki, salgın başladıktan kısa bir süre sonra pazar temizlendiğinden, hayvan popülasyonundaki olası kaynak virüsün buradaki hayvanlarla ilişkilendirilmesi zorlaşmıştır. Tabii eğer Çinli yetkililer ve bilim insanları gerekli numuneler alınmadıysa? Buna yönelik bilgilendirici bir rapora ulaşamadık. Her ne kadar kanıtlar SARS-CoV-2'nin manipüle edilmiş bir virüs olmadığını gösterse de diğer köken teorilerini tam olarak kanıtlamak veya çürütmek şu an için mümkün değildir. SARS-CoV-2 için tüm teoriler ve olasılıklar Çizim-1 ve Tablo-1 de özetlenmiştir.



Çizim-1. SARS-CoV-2 kökeni için teoriler

Tablo 1.SARS-CoV-2 kökeni için teoriler

Teori		SARS-CoV-2 için olasılık	
A-Geleneksel Teori Rastgele mutasyon sonucu konak profil değişimi	1	Ara konak teorisi. Rezervuar konaktaki virüs oluşan rastgele mutasyonlarla önce başka bir hayvanda adaptasyon kazanır	Ara konak için pangolinler en güçlü aday olarak gözükmektedir. SARS-CoV-2 ve pangolin CoV RBA amino asit dizilim benzerliği ACE2R için eş-adaptasyon ihtimalini güçlü kılmaktadır.
	1a	Yüksek benzer ortolog reseptör varlığında, virüsün ara konak adaptasyonu eş zamanlı olarak yüksek verimlilikte insan adaptasyonunu da içerir ve insanlar arasında yayılım potansiyeli kazanır	İnsan salgınının başladığı döneme yakın bir zaman diliminde pangolinlerde gösterilen benzer enfeksiyon bulguları (3), bu olasılığı desteklemektedir.
	1b	Ara konak adaptasyonunu başaran virüs insanlarda kısıtlı enfeksiyon kabiliyeti kazanır.	Pangolin ACE2R adaptasyonu, insan için hazır bir adaptasyon sunabilse de, patojenite ve yayılım için başka adaptasyonların varlığı ortaya çıkmıştır
	1c	Patojenite ve yayılım kabiliyeti virüsün insan hücrelerinde çoğalması sırasında oluşan mutasyonlarla artmıştır ve insanlar arasında yayılım potansiyeli kazanır.	Polibazik bölünme noktası ve o-glikan dizilimi açısından devam eden mutasyonlarla insanda son halini kazanmış bir virüs olma ihtimali göz ardı edilemez
	2	Rezervuar konaktaki virüste oluşan rastgele mutasyonlar ara konağa gerek kalmadan direkt insan patojeni olabilecek konfigürasyonları sağlar.	Geniş kapsamlı hayvan çalışmaları gerekir
	2a	İnsanların dışında ikincil bir konakçıda replike olan ve her ikisinde de sürekli viral saçılım ve adaptasyona izin veren değişimler olur.	Geniş kapsamlı hayvan çalışmaları gerekir. İnsan ACE2R benzerliği bulunabilecek hayvanların varlığı. Kedi, inek, manda, domuz, keçi, koyun ve güvercin için ACE2R homolojisi gösterilmiştir. ²⁷
	2b	Sadece insan patojeni olarak veya insan ve ikincil bir konakçının ortak virüsü olarak insanlar arasında yayılım potansiyeli kazanır.	Salgının başlangıcıyla ilgili bilgilerimizin sınırlı olması, vahşi hayvan pazarının temizlenmesi ve ilişkili hayvanların itlaf edilmesi, buradaki olası saçılım ve devamında olabilecek saçılım açısından hayvanların rolünü anlamamızı güçleştirmektedir. Bu döneme ait bilgilerin berraklaşması, özellikle Çin’li bilim insanlarının paylaşacağı samimi ve çarpıtılmamış bilgiler ile mümkün olacaktır.
B-Kimerik teori Virüs havuzlarından seçilmiş uygun virüslerle kimerik yeni virüslerin oluşturulabildiği ters genetik tasarım çalışmaları	3	Birinci ihtimal: Ciddi insan enfeksiyonlarının nedeni olan bir insan virüsüne antijenik-yapısal benzerlik sağlanarak; tanı reaktifleri üretme, yeni suşların ortaya çıkma potansiyelini tanımlama ve mevcut terapötiklerin etkinliğini belirleme amacı ile oluşturulan kimerik virüsün kontrolden çıkması (kaza, sabotaj, yayılım öngörüsündeki yanlış hesaplamalar gibi nedenler).	SARS-CoV için bu yönde geçmişte yapılmış uygulamalar var ^{4,5} , ancak bu uygulamalardaki kimerik yapılar SARS-CoV-2’nin özgün değişim alanlarıyla uyumlu değildir.
		İkinci ihtimal: İnsan ya da ikincil bir konağa yüksek verimlilikte adaptasyon gösteren kimerik bir virüsü kötü amaçla tasarlama.	Şu ana kadar bilinen/kayda alınan hiçbir virüs dizilimi SARS-CoV-2 özgün değişim alanlarıyla uyumlu değildir. Bilinmeyen/kayıt altına alınmamış virüslerle yapılabilecek kimerik çalışmaları reddedebilecek bilgiye sahip değiliz. Ancak o-glikan dizilimlerinin kazanılması için bağışık yanıt markajına ihtiyaç duyulması, kötü niyetli böyle bir proje için çok sayıda insan ve zamanın harcandığı sofistike bir gayret gerektirir.

Bir hayvan virüsünün insanları bu kadar verimli bir şekilde enfekte etmek için tür sınırlarını nasıl atladığının ayrıntılı olarak anlaşılması, gelecekteki zoonotik olayların önlenmesine yardımcı olacaktır. Koronavirüslerin doğal rezervuarlarındaki geniş yayılım göz önüne alındığında, gelecekteki araştırmalar, daha geniş coğrafi bölgeler için bu virüslerin aktif gözetimi üzerine odaklanmalıdır.

Yazar olarak; makalenin bir bölümünün veya tamamının başka bir yerde yayımlanmadığını, aynı anda bir diğer dergide değerlendirilme sürecinde olmadığını ve herhangi bir "Maddi Destek ve Çıkar İlişkisi" bulunmadığını beyan ederim.

Kaynaklar

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, et al. Pneumonia of unknown aetiology in Wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J Travel Med.* 2020 Mar 13;27(2).
2. <https://www.who.int/csr/don/12-january-2020-novel-coronavirus-china/en/>.
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020 Mar;579(7798):270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
4. Zhou, Peng, Yang, Xing-Lou, Wang, Xian-Guang, et al. -. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. <https://doi.org/10.1101/2020.01.22.914952>
5. Wu, F, Zhao, S, Yu, B. et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 579, 265–269 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
6. Li C, Yang Y, Ren L. Genetic evolution analysis of 2019 novel coronavirus and coronavirus from other species. *Infect Genet Evol.* 2020 Mar 10;82:104285. doi: 10.1016/j.mee-gid.2020.104285.
7. Follis KE, York J, Nunberg JH. Furin cleavage of the SARS coronavirus spike glycoprotein enhances cell-cell fusion but does not affect virion entry. *Virology.* 2006 Jul 5;350(2):358-69.
8. Chan, CM, Woo PC, Lau SK, et al. Spike Protein, S, of Human Coronavirus HKU1: Role in Viral Life Cycle and Application in Antibody Detection. *Experimental Biology and Medicine.* 2008. 233(12), 1527–15.
9. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell.* 2020 Mar 6. pii: S0092-8674(20)30262-2. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
10. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
11. Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I. et al. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>.
12. Liu P, Chen W, Chen JP. Viral Metagenomics Revealed Sendai Virus and Coronavirus Infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). *Viruses.* 2019 Oct 24;11(11). pii: E979. doi: 10.3390/v11110979.
13. Wan Y, Shang J, Graham R, et al. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J Virol.* 2020 Mar 17;94(7). pii: e00127-20. doi: 10.1128/JVI.00127-20.
14. Bagdonaitė I, Wandall HH. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology.* 2018 Jul 1;28(7):443-467. doi: 10.1093/glycob/cwy021.
15. F. Almazan, J.M. Gonzalez, Z. Penzes, et al. Engineering the largest RNA virus genome as an infectious bacterial artificial chromosome *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97 (2000), pp. 5516-5521.
16. B. Yount, K.M. Curtis, R.S. Baric Strategy for systematic assembly of large RNA and DNA genomes: the transmissible gastroenteritis virus model *J. Virol.*, 74 (2000), pp. 10600-10611.
17. V. Thiel, J. Herold, B. Schelle, et al. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus *J. Gen. Virol.*, 82 (2001), pp. 1273-1281.
18. Vineet D. Menachery, Boyd L. Yount Jr., Amy C. Sims, et al. *PNAS* March 15, 2016 113 (11) 3048-3053; first published March 14, 2016 <https://doi.org/10.1073/pnas.1517719113>
19. Tao Zhang, Qunfu Wu, Zhigang Zhang. Pangolin homology associated with 2019-nCoV. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.950253>.
20. Lam, T.T., Shum, M.H., Zhu, H. et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0>.
21. P. Liu, W. Chen, J.-P. Chen. Viral metagenomics revealed sendai virus and coronavirus infection of Malayan Pangolins (*Manis javanica*). *Viruses* 11, 979 (2019).
22. Rambaut, A. Preliminary Phylogenetic Analysis of 11 nCoV2019 Genomes, 2020-01-19. Available online: <http://virological.org/t/preliminary-phylogenetic-analysis-of-11-n-cov2019-genomes-2020-01-19/329> (accessed on 30 January 2020).
23. Dudas G, Carvalho LM, Rambaut A, et al. Correction: MERS-CoV spillover at the camel-human interface. *Elife.* 2018 Apr 19;7. pii: e37324. doi: 10.7554/eLife.37324.
24. Ge XY, Li JL, Yang XL, et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2. *Nature.* 2013 Nov 28;503(7477):535-8. doi: 10.1038/nature12711. Epub 2013 Oct 30.
25. Menachery VD, Yount BL Jr, Sims AC, et al. SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Mar 15;113(11):3048-53. doi: 10.1073/pnas.1517719113.
26. Ieva Bagdonaitė, Hans H Wandall, Global aspects of viral glycosylation, *Glycobiology*, Volume 28, Issue 7, July 2018, Pages 443–467.
27. Qiu Y, Zhao YB, Wang Q, et al. Predicting the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) utilizing capability as the receptor of SARS-CoV-2. *Microbes Infect.* 2020 Mar 18. pii: S1286-4579(20)30049-6. doi: 10.1016/j.micinf.2020.03.003.