GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Gazi
1926

İNSAN RİNOVİRÜSLERİNDEN HRV-14 SUŞUNDA CIM212240 ($C_{25}H_{32}N_6O$) BİLEŞİĞİNİN ANTİVİRAL ETKİSİNİN HeLa Rh HÜCRELERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

Aytuğ MERİÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Aytuğ MERİÇ
03/01/2023

İNSAN RİNOVİRÜSLERİNDEN HRV-14 SUŞUNDA CIM212240 ($C_{25}H_{32}N_6O$) BİLEŞİĞİNİN ANTİVİRAL ETKİSİNİN HeLa Rh HÜCRELERİ KULLANILARAK İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Aytuğ MERİÇ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

İnsan rinovirüsleri (HRV), *Picornaviridae* ailesinin *Enterovirus* cinsine ait soğuk algınlığı ve solunum yolu enfeksiyonlarına sebebiyet veren RNA virüsleridir. Bu çalışmada, insan rinovirüslerinden HRV-14 suşunda İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi **(**CD3, Leuven, Belçika) Laboratuvarında geliştirilen CIM212240 (moleküler formül: $C_{25}H_{32}N_6O$) bileşiğinin antiviral etkisi HeLa Rh hücreleri kullanılarak incelenmiştir. İlk olarak, potansiyel ilaç özelliği taşıyan bu antiviral bileşiğin farklı derişimleri ve HRV-14 suşu MOI [Multiplicity of infection; Enfeksiyon oranı (virüs sayısı: hücre sayısı)] 1:10000, 1:1000, 1:100 oranlarında kokültüre edilmiş; hücre canlılıkları kolorimetrik 5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) tetrazolyum (MTS) sitotoksisite testi ile ölçülmüştür. Optik yoğunluk değerleri kullanılarak %50 etkili derişim (EC_{50}) hesaplanmış; hücrelerin %50'sini virüs kaynaklı sitopatik etkiden koruyan bileşik derişimleri belirlenmiştir. İkinci olarak, beş aşamalı bir klonal seçim prosedürü ile CIM212240'a fenotipik olarak dirençli HRV-14 varyantlarının varlığı gözlenmiş; viral RNA'lar, Nucleospin© RNA virüsü (Macherey-Nagel) kullanılarak izole edilmiştir. Tüm HRV-14 kodlama dizisini kapsayan cDNA fragmanları, tek adımlı bir RT-PCR kiti ve HRV-14'e özgü primerler tasarlanarak sentezlenmiştir. Elde edilen cDNA fragmanlarını saflaştırmak için Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kullanılarak DNA dizileri Sanger dizileme yöntemiyle analiz edilmiştir. Fenotipik olarak gözlemlenen dirençli varyantlar virüs kontrolü, stok suşu ve Protein Blast ile karşılaştırılarak CIM212240 bileşiğine bağlı mutasyonlar gözlenmiştir. Özellikle, VP1 kapsid proteininde C199W amino asit yer değiştirmesi taşıyan fenotipik ilaca dirençli virüs varyantların varlığı mutant genotip ile ilaca dirençli fenotip arasındaki bağlantıyı doğrulamıştır. Sonuç olarak, CIM212240 bileşiğinin HRV-14 replikasyonunun seçici bir inhibitörü olduğu kanıtlanmış ve rinovirüse karşı antiviral etkinliği ortaya koyulmuştur.

Bilim Kodu	:	20309
Anahtar Kelimeler	:	İnsan rinovirüs, HRV-14, antiviral etki
Sayfa Adedi	:	76
Danışman	:	Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

INVESTIGATION OF THE ANTIVIRAL EFFECT USING HeLa Rh CELLS of CIM212240 ($C_{25}H_{32}N_6O$) COMPOUND IN STRAIN HRV-14 of HUMAN RHINOVIRUSES

(M. Sc. Thesis)

Aytuğ MERİÇ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

January 2022

ABSTRACT

Human rhinoviruses (HRVs) are RNA viruses that cause common cold and respiratory tract infections belonging to the *Enterovirus* genus of the *Picornaviridae* family. In this study, the antiviral effect of the compound CIM212240 (molecular formula: $C_{25}H_{32}N_6O$) developed in the Centre for Drug Design and Discovery (CD3, Leuven, Belgium) Laboratory, in the HRV-14 strain of human rhinoviruses were performed using HeLa Rh cells. Firstly, different concentrations of this antiviral compound of the potential drug and HRV-14 strain MOI [Multiplicity of infection; Infection multiplier (number of viruses: number of cells)] cocultured at 10000:1, 1000:1, 100:1 ratio; cell viability was measured by the colorimetric MTS cytotoxicity test. 50% effective concentration (EC_{50}) was calculated using optical density values (OD); compound concentrations that protect 50% of cells from virus-induced cytopathic effect were determined. Second, the presence of HRV-14 variants phenotypically resistant to CIM212240 was observed by a five-step clonal selection procedure; viral RNAs were isolated using Nucleospin© RNA virus (Macherey-Nagel). The cDNA fragments covering the entire HRV-14 coding sequence were synthesized by using a one-step RT-PCR kit and designing specific primers for HRV-14. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System were used to purify the resulting cDNA fragments; DNA sequences were analysed using Sanger sequencing. The phenotypically observed resistant variants were compared with the virus control, stock strain and Protein Blast, and mutations due to compound CIM212240 were observed. In particular, the presence of phenotypic drug-resistant virus variants carrying the C199W amino acid substitution in the VP1 capsid protein confirmed the link between the mutant genotype and the drug-resistant phenotype. In conclusion, the compound CIM212240 proved to be a selective inhibitor of HRV-14 replication and its antiviral activity against rhinovirus was demonstrated.

Science Code : 20309
Key Words : Human rhinovirus, HRV-14, antiviral effect
Page Number : 76
Supervisor : Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilimsel katkıları, görüş ve önerileri, deneyimleri ile yol gösterici olan, eğitimim süresince desteklerini asla esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım sevgili Prof. Dr. Zehranur YÜKSEKDAĞ'a saygılarımı sunar ve teşekkürü bir borç bilirim. Bana laboratuvarının kapılarını açan, bilimsel deneyimlerini ve imkanlarını çekinmeden paylaşan saygı değer hocam Prof. Dr. Johan NEYTS'e şükranlarımı sunar, teşekkür ederim. Mesleki tecrübelerini her fırsatta aktaran, sabırla her soruma yanıt veren, laboratuvardaki acemiliklerime tahammül gösteren bilim insanı Kim DONCKER'a saygı ve minnetlerimi sunarım. Beni bugünlere kadar büyük emek ve özveriyle yetiştiren ilk öğretmenim, canım annem Halime KAZANCI'ya sevgi ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Belçika'da bile yalnız bırakmayan, her zorlukta yanımda olan canım dostum Nevra YALÇIN'a, her anlaşılmazlığımın kurtarıcısı canım dostum Ceren ERZİN'e ve uzaklardan yıllar sonra bile dostluğunu esirgemeden yardımıma koşan canım arkadaşım Dr. Simge YÜZ'e hayatıma kattıkları değer için teşekkür ederim. Bu çalışmanın yapılmasına vesile olan ve Erasmus kapsamında bana bu güzel imkânı sağlayan Gazi Üniversitesi Rektörlüğü ve Fen Bilimleri Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR vi

İÇİNDEKİLER vii

ÇİZELGELERİN LİSTESİ x

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xi

RESİMLERİN LİSTESİ xii

SİMGELER VE KISALTMALAR xiii

1. GİRİŞ 1

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 3

2.1. Rinovirüsler ve Tarihçesi 3

2.2. Rinovirüs Taksonomisi 4

2.3. Viryon Yapısı ve Genomik Özellikleri 5

2.4. Rinovirüs Reseptörleri 7

2.5. Rinovirüs Replikasyonu ve Yaşam Döngüsü 8

2.6. Rinovirüsün Filogenetik Çeşitliliği 9

2.7. Rinovirüslere Karşı Kullanılan Antiviral İlaçlar 11

2.7.1. Viral kapsidi hedefleyen bileşikler 11

2.7.2. Yapısal olmayan viral proteinleri hedefleyen bileşikler 13

2.7.3. Viral RNA sentezini hedefleyen bileşikler 14

3. MATERYAL VE METOT 17

3.1. Materyal 17

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar 17

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücreler ve virüsler 17

Sayfa

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal bileşikler 17

3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerler ve çözeltiler 18

3.2. Metot 19

3.2.1. HeLa Rh hücrelerinin aktifleştirilmesi ve sürdürülmesi 19

3.2.2. Hücre kültürü plaklarının oluşturulması 20

3.2.3. Antiviral SPE redüksiyon testi 21

3.2.4. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) analizi 22

3.2.5. Beş aşamalı klonal seçim prosedürü 23

3.2.6. Çapraz direnç testi 24

3.2.7. Viral RNA izolasyonu 25

3.2.8. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu 25

3.2.9. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme 30

3.2.10. DNA'nın saflaştırılması 30

3.2.11. DNA dizi analizi 31

3.2.12. DNA dizi analizi değerlendirilmesi 33

4. BULGULAR 35

4.1. Antiviral SPE redüksiyon testi 35

4.2. Beş Aşamalı Klonal Seçim Prosedürü ile Varyantların Eldesi 36

4.2.2. Adım 2 37

4.2.3. Adım 3 38

4.2.4. Adım 4 39

4.2.5. Adım 5 40

4.3. Çapraz Direnç Testi 42

4.4. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu 45

4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları 46

Sayfa

5. TARTIŞMA 49

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 59

KAYNAKLAR 63

EKLER 73

Ek-1. Mektup 74

ÖZGEÇMİŞ 75

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. RT-PCR için tasarlanan primer isimlendirmesi. 26

Çizelge 3.2. PCR Kimyasal Protokolü. 30

Çizelge 3.3. Dizileme Kimyasal Protokolü 31

Çizelge 3.4. DNA Dizileme için tasarlanan primerler 31

Çizelge 3.5. Termal döngü cihazı protokolü 32

Çizelge 4.1. Antiviral SPE redüksiyon testi sonrası MTS okumaları, kontrol yüzde ifadesi ve EC_{50} değerleri. 35

Çizelge 4.2. 1. adım MTS sonuçları 36

Çizelge 4.3. 1.adım sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 5 = VC). 37

Çizelge 4.4. 2. adım MTS sonuçları 37

Çizelge 4.5. 2. adım MTS sonuçları 37

Çizelge 4.6. 0,2 µM CIM212240 bileşik varlığında virus titrasyonu sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 1= VC). 38

Çizelge 4.7. 1 µM CIM212240 bileşik varlığında virus titrasyonu sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 1= VC). 38

Çizelge 4.8. Enfeksiyondan (MOI: 0,0001) 3 gün sonra SPE değerlenmesi. 39

Çizelge 4.9. 5.adım sonrası MTS okumaları, kontrol yüzde ifadesi ve EC_{50} değerleri .. 41

Çizelge 4.10. Çapraz direnç testi MTS sonuçları 43

Çizelge 4.11. Çapraz direnç testinin kontrol yüzdelik ifadesi ve EC_{50} değerleri. 44

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. *Picornaviridae* virüs ailesinin sınıflandırılması. Klinik olarak önem arz eden cins, tür ve bazı genotip/serotip örnekleri verilmiştir 5

Şekil 2.2. (A) İnsan rinovirüs genomik organizasyonu gösteren HRV-14'ün 7,21 kb +ssRNA genomu (B) HRV'nin ikosahedral viryon yapısı 6

Şekil 2.3. HRV-A, HRV-B ve HRV-C'nin hücre reseptörleri 8

Şekil 2.4. Rinovirüs yaşam döngüsü 9

Şekil 2.5. Pleconaril, pirodavir ve vapendavir' in kimyasal yapısı 13

Şekil 2.6. Rupintrivir'in kimyasal yapısı 14

Şekil 2.7. Ribavirin'in kimyasal yapısı 15

Şekil 3.1. Antiviral deneyler için 96 kuyucuklu plaka tasarımı 20

Şekil 3.2. İş akışının tek kuyucuk ifadesi 21

Şekil 3.3. HRV- 14 tüm genomu ve primer bölgeleri 27

Şekil 4.1. P1 ve P4 izolatlarına ait hedef bölge amplikonlarının agaroz jel görüntüsü .. 45

Şekil 4.2. VC ait hedef bölge amplikonlarının agaroz jel görüntüsü 46

Şekil 4.3. Rinovirus P1 izolatı direnç kromotogramı. 47

Şekil 4.4. Rinovirus P4 izolatında direnç kromotogramı. 47

Şekil 4.5. Virüs kontrolü (VC) direnç kromotogramı. 48

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 3.1. Hücre kontrol kuyucuklarındaki (CC) (soldaki resim) ve virüs kontrol kuyucuklarındaki (VC) (sağdaki resim) HeLa Rh hücreleri..... 22

Resim 4.1. Enfeksiyondan (MOI: 0,0001) birinci gün sonrası inverted mikroskop görüntüsü. 39

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
(-)	Negatif
(+)	Pozitif
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
g	Gram
kb	Kilobaz 1000 nükleotitten oluşan baz dizilimi
L	Litre
M	Molar
m	Metre
mg	Miligram
mL	Mililitre
pH	Asitlik bazlık birimi
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ARTI	Akut solunum yolu hastalığı
bç	Baz çifti
CC	Hücre kontrolü
CD3	İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi
CDC	ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri
CDHR3	Kaderinle ilişkili aile üyesi 3
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CO_2	Karbondioksit

Kısaltmalar	Açıklamalar
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfat
dH_20	Distile su
dk.	Dakika
DMEM	Dulbecco tarafından modifiye edilen MEM
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EC_{50}	%50 etkili derişim
EDTA	Etilen-diamin-tetra asetik asit
EV	Enterovirus cinsi
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	ABD Gıda ve İlaç Dairesi
FP	İleri primer
HRV	İnsan rinovirüs
ICAM-1	İntrasellüler adezyon molekül 1
LDLR	Düşük dansiteli lipoprotein reseptörü
MEM	Minimum temel besiyeri
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
MOI	Enfeksiyon oranı
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
OD	Optik yoğunluk
ORF	Açık okuma bölgesi
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RdRp	Ribonükleik asit bağımlı ribonükleik asit polimeraz
RNA	Ribonükleik asit
RP	Geri primer
rpm	Dakikada devir sayısı
RT-PCR	Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
siRNA	Susturucu ribonükleik asit
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
SPE	Sitopatik etki
ssRNA	Tek sarmallı ribonükleik asit
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
UTR	Translasyona uğramayan bölge
UV	Ultraviyole
ÜRT	Üst solunum yolu
VC	Virüs kontrülü
VP	Viral protein
VPg	Viral priming protein g

1. GİRİŞ

İnsan rinovirüsleri (HRV), insanlarda en sık karşılaşılan viral enfeksiyon nedenlerindendir. Halk arasında 'soğuk algınlığı' olarak tanımlanan akut solunum yolu hastalığı (ARTI) ve üst solunum yolu (ÜRT) enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Ayrıca, ARTI, 5 yaşın altındaki çocuklarda önde gelen morbidite sebebidir (Bryce, Boschi-Pinto, Shibuya ve Black, 2005; Triantafilou, Ramanjulu, Booty, Jimenez-Duran, Keles, Saunders, Nevins, Koppe, Modis, Pesiridis, Bertin ve Triantafilou, 2022). Bu enfeksiyon lokasyonu ve etkinliğinden ötürü literatürde "solunum virüsleri" olarak da adlandırılırlar (Andrewes, 1964; Stobart, Nosek ve Moore, 2017). HRV'ler üst solunum yolu enfeksiyonlarının %50'den fazlasının nedenini oluşturur. Burun akıntısı, boğaz ağrısı, öksürme, hapşırma, burun tıkanıklığı ve genel halsizlik gibi soğuk algınlığı benzeri semptomlarla ilişkilidir (Arruda, Pitkaranta, Witek, Doyle ve Hayden, 1997; Jacobs, Lamson, St George ve Walsh, 2013). Soğuk algınlığına ek olarak, rinovirüs enfeksiyonları akut otitis media ve rinosinüzit ile de bağlantılı olup bunlar sıklıkla bakteriyel koenfeksiyonla da örtüşür (Pitkaranta, Arruda, Malmberg, Hayden, 1997; Alper, Winther, Mandel ve Doyle, 2007; Jackson, Gangnon, Evans, Roberg, Anderson ve Pappas, 2008; Jacobs ve diğerleri, 2013). Tüm astım alevlenme olaylarının yarısından fazlasının HRV enfeksiyonlarından kaynaklandığı ve hırıltı ile sonuçlanan HRV enfeksiyonlarının yaşamın sonraki dönemlerinde astım gelişimi riskini artırdığı bilinmektedir (Gern ve Busse, 1999; Gern ve diğerleri, 1999; Hayden, 2004; Jackson ve diğerleri, 2008; Dougherty ve Fahy, 2009; Ortega, Nickle ve Carter, 2021). Akut astım atakları ile hastaneye yatırılan çocukların yaklaşık %90'nında HRV saptanmıştır (Bizzintino, Lee, Laing, Vang, Pappas ve Zhang, 2011; Jackson ve Gern, 2022). HRV yüksek mortaliteye sahip bir mikrobiyolojik ajan olarak kabul edilmemesine rağmen, akut solunum yolu hastalığı için yüksek bir potansiyele ve kronik solunum sağlığı koşullarını geliştirme veya şiddetlendirme potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Stobart ve diğerleri, 2017).

İlk olarak 1950'li yıllarda izole edilen insan rinovirüsleri (HRV'ler), *Picornaviridae* ailesinin *Enterovirus* cinsine ait solunum yolu virüsleridir (Price, 1956; Nirwan ve Kakkar, 2019). Yüz altmıştan fazla farklı suşa sahip rinovirüsler, zarfsız, tek sarmallı, pozitif polariteli RNA virüsleridir. Genetik olarak sınıflandırıldığında üç gruba ayrılır: İnsan rinovirüs-A (HRV-A), insan rinovirüs-B (HRV-14'ün ait olduğu HRV-B) ve daha yakın zamanda keşfedilen insan rhinovirüs-C (HRV-C) (Arden ve Mackay, 2010; Palmenberg, Spiro, Kuzmickas, Wang, Djikeng, Rathe, Fraser-Liggett ve Liggett, 2009).

Son 70 yılda yapılan önemli araştırmalara rağmen, HRV'ye karşı etkili bir ilaç geliştirilmesi, doğada dolaşan HRV'lerin çeşitliliği nedeniyle geniş spektrumlu olmasının önüne geçmektedir. 1980'lerden beri rinovirüs inhibitörlerinin süregelen gelişimine rağmen, insanlarda klinik kullanım için şimdiye kadar hiçbir spesifik antiviral tedavi onaylanmamıştır (Rollinger ve Schmidtke, 2011). Bu da yine bir antirinoviral ilaca yönelik klinik araştırmaların önemini arttırmaktadır (Thibaut, De Palma ve Neyts, 2012). Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi (CD3, Belçika) Laboratuvarında geliştirilen ve CIM212240 olarak isimlendirilen bileşiğin antirinoviral etkisi incelenecektir. Bu amaçla, KU Leuven Üniversitesi, Neyts-Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Laboratuvarı, kültür koleksiyonunda bulunan insan rinovirüs B14 (HRV-14) suşu kullanılmıştır. Moleküler formülü $C_{25}H_{32}N_6O$ olan bu bileşiğin insan rinovirüsü üzerindeki antiviral etkisi sitopatik etkiye duyarlı olan HeLa Rh hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Potansiyel ilaç özelliği taşıyan bu bileşiğin virüsün tek tabanlı hücre kültüründe oluşturduğu sitopatik etki (SPE) mikroskobik olarak gözlemlenerek skorlanmıştır. Ek olarak, hücre canlılıkları kolorimetrik MTS 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) okumaları ile değerlendirmiştir. Elde edilen optik yoğunluk değerleri kullanılarak maksimum etkinin %50'sini oluşturan ilaç derişimleri (EC_{50}) hesaplanmıştır. Ayrıca, rinovirüs inhibitör adayı olan bu bileşiğin virüs üzerindeki potansiyel direnç mekanizmaları fenotipik olarak değerlendirilmiş ve ilaç-virüs ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Gözlemlenen ilaca bağlı virüs etkinliğini ters gen mühendisliği kullanılarak dizilenerek ve genomik verilerle elde edilmiştir. Elde edilen moleküler veriler neticesinde hem virüs replikasyonu hem de ilacın genom üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Soğuk algınlığına karşı etkin bir tedavi bulamayan bilim dünyasında bu çalışma rinovirüs temelinde biyoteknolojik potansiyel ilaç adayı olabileceği düşünülmektedir. Gelecekte, farklı virüs suşları ile *in vitro* ve *in vivo* olarak CIM212240 bileşiğinin etkinliğinin araştırılıp geliştirilmesi klinikte kullanımının önünü açabilecektir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

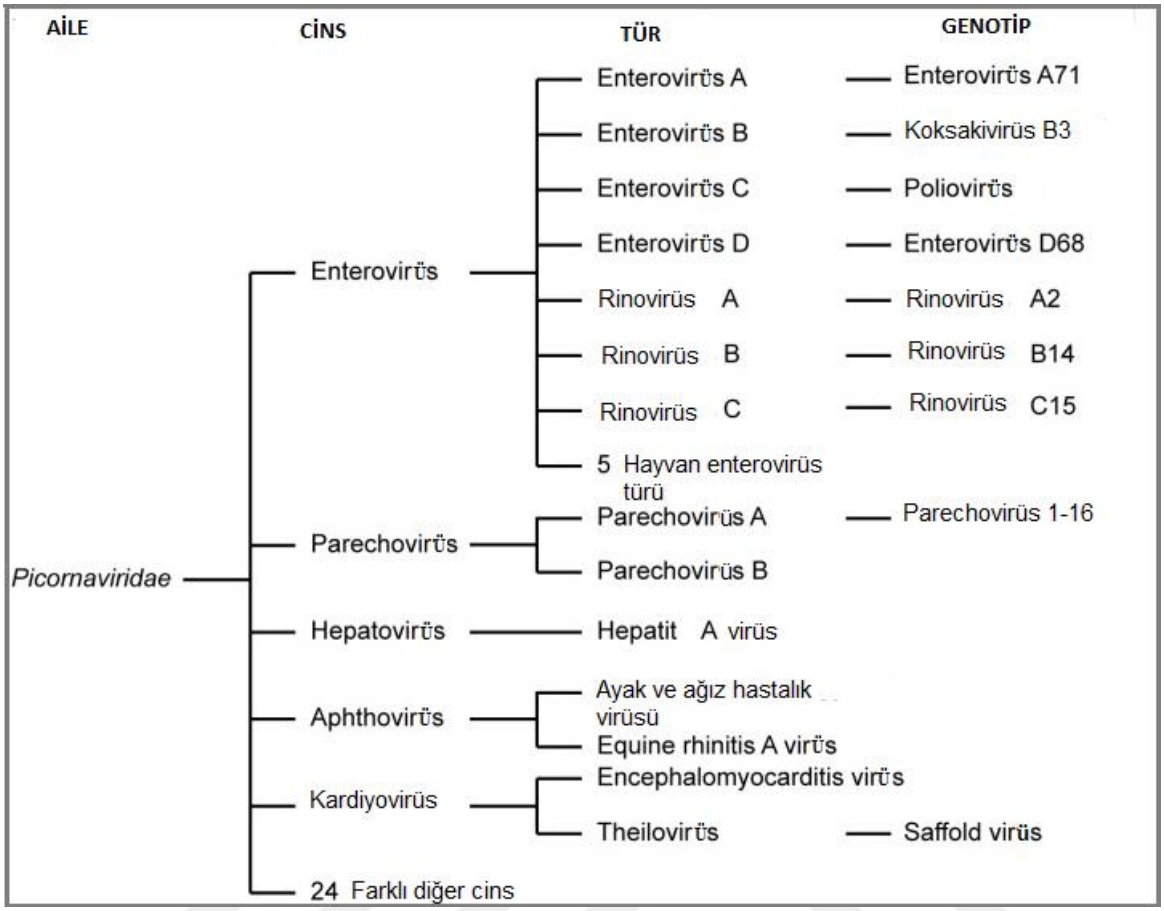
2.1. Rinovirüsler ve Tarihçesi

1890'larda araştırmacılar, soğuk algınlığına sebebiyet veren bulaşıcı ajanları bulmaya yönelik gözlenebilir bilimsel kanıt araştırmaya başlamışlardır. Daha önce keşfedilen kolera ve dizanteri gibi hastalıkların bakterileri kökenli olması da araştırmacıları bu yönde analize itmiştir. İlk olarak, 1914'te dizanteri basilini keşfeden Alman Walter Kruse kritik bir deney yapmıştır. Soğuk algınlığına yakalanmış bir hastadan burun salgılarını toplayıp filtre etmiş; böylece bakteri ve büyük mikrobiyolojik ajanları ayrıştırmıştır. 12 gönüllünün enfekte edildiği bu örneklemde üç gün içerisinde üçte bir oranında soğuk algınlığı gelişmiştir (Ellis, 2003; Nature, 2004). 1920'lerde Columbia Üniversitesi Tıp Fakültesi bu araştırmayı bir sonraki aşamaya taşıyarak sonuçları insanlar ve şempanzeler üzerinde yapılan bir dizi deneyde doğrulamıştır (Ellis, 2003). Böylece, dünya genelinde virüslerin aslında soğuk algınlığına neden olduğu kabul görmüştür. Bir sonraki adım ise, soğuk algınlığına sebebiyet veren virüslerin kültürde yeniden üretilebilmesi olmuştur. Bu süreçte 1954'te, ilk olarak insan rinovirüsü (HRV) (tip 1A), Pelon ve arkadaşları tarafından nazofaringeal örneklerden Rhesus maymun böbrek hücre kültüründe izole edilmiştir (Jans ve Ghildyal, 2015). 1950'lerin sonlarına gelindiğinde Salisbury'deki Tyrrell ve Parsons, insan embriyonik böbrek hücrelerini nazofaringeal örneklerle hücre kültürleri kuluçka sıcaklığını 33°C'ye düşürerek, doku kültürü ortamının pH'sını yaklaşık 7,0'e sabitleyerek ve kuluçka sırasında kültürleri nazikçe bir silindir tambur yardımıyla döndürerek aşılamıştır. Sonuç olarak altı farklı HRV tipi (tip 1B-6B) sitopatik etkiler gözlemlenerek izole edilmiştir (Atmar, 2009; Jans ve Ghildyal, 2015). Kısa bir süre sonra, Hamparian ve arkadaşları, Hayflick ve Moorhead tarafından insan fetal akciğer kültürlerinden elde edilen bir diploid hücre suşunu kullanılarak 18 HRV (tip 7-12 ve 18-29) daha belirlenmiştir (Atmar, 2009). Hayflick hücre hatlarının kullanımı ve Salisbury grubunun tariflediği koşulların rutin kullanımı yeni HRV'lerin izolasyonunu ve karakterizasyonunu büyük ölçüde hızlandırmıştır (Atmar, 2009; Jans ve Ghildyal, 2015). Böylece, 1967'de ortak bir program ile bilinen HRV tiplerine 1A'dan 55'e kadar sayılar atanmıştır. 1971'de, ikincil bir kararla, 56'dan 89'a kadar olan türler eklenmiş ve üçüncü bir çalışma sonucu bu sayı 100 serotipe çıkmıştır (HRV-1A, HRV-1B ve HRV-2 ile HRV-100), (Atmar, 2009; Bartlett ve Johnston, 2014). 1980'lerden önce, serotipler hücre kültürleri oluşturarak virüs enfeksiyonunun antikor nötralizasyonu gözlenerek oluşturulmuş, poliklonal anti-serumların tanımlanmış serotiplerle çapraz

reaktivite vermemiş, farklı bir serotipin tanımlanmasını sağlanmış; fakat gelişen moleküler dizileme teknolojisi serotipi tayinini kolaylaştırmıştır. İlk olarak, 1984-85 yıllarında virion kristal yapısı belirlenen HRV (B14) dizilenerek tüm genom yapısı ortaya konulmuştur (Erickson, Frankenberger, Rossmann, Fout, Medappa ve Rueckert, 1983; Stanway, Hughes, Mountford, Minor ve Almond, 1984). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve dizileme teknolojisi kullanılarak, 2006'da yeni bir HRV türü ortaya konulmuş; bu tür A ve B türlerinin üyelerinden farklı olarak, geleneksel hücre kültürü teknikleri kullanılarak üretilemediğinden uzun bir süre dolaşımda olsa da keşfi bu tarihe rastlamaktadır (Cox ve Le Souëf, 2014). 2009 yılında Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi bu türü HRV-C türü olarak tanımlamıştır ve böylece 2014 yılı sonlarında 55 HRV-C virüs tipi literatürde yerini almıştır (HRV-C1 ile C-55) (Bartlett ve Johnston, 2014). Genetik, immünojenik ve reseptör kullanım özellikleri temel alınarak geliştirilen son sınıflandırma sisteminden sonra ise, RV-A87 olarak isimlendirilen virüsün *Enterovirüs* D türüne ait EV-D68 ile en yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (Palmenberg ve Gern, 2015; Bartlett ve Johnston, 2014).

2.2. Rinovirüs Taksonomisi

Picornaviridae virüs ailesi, en büyük virüs ailelerinden biridir ve literatürde 29 cinse ayrılmıştır (Şekil 2.1) (Adams, King ve Carstens, 2013). Picornaviridae ailesinin ve *Enterovirus* (EV) cinsi ise, insanlık tarihinde en sık enfeksiyon maruziyeti doğuran birçok önemli insan patojenini barındırır. ABD Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) verilerine göre, yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 10-15 milyon semptomatik EV enfeksiyonunun meydana geldiği tahmin edilmektedir (Wells ve Coyne, 2019). Ayrıca, hırıltı ile kliniğe başvuran 3 ile 18 yaş aralığındaki hastaları değerlendiren bir çalışmada hastaların yarısının HRV pozitif olduğunu belirlenmiştir (Heymann, Carper, Murphy, Platts-Mills, Patrie ve McLaughlin, 2004; Price ve Kennedy, 2022). Bu nedenle, taksonomik olarak birçok araştırmaya konu olmuş ve son olarak *Enterovirus* (EV) cinsi, Enterovirüs A, B, C, D, Rinovirüsler A, B, C ve sadece hayvanları enfekte eden beş EV türü (EV-E, EV-F, EV-G EV-H ve EV-J) dâhil olmak üzere 12 türe sınıflandırılmıştır (Şekil 2.1) (Adams ve diğerleri, 2013; Lefkowitz, Dempsey, Hendrickson, Orton, Siddell ve Smith, 2018; Triantafilou ve diğerleri, 2022).

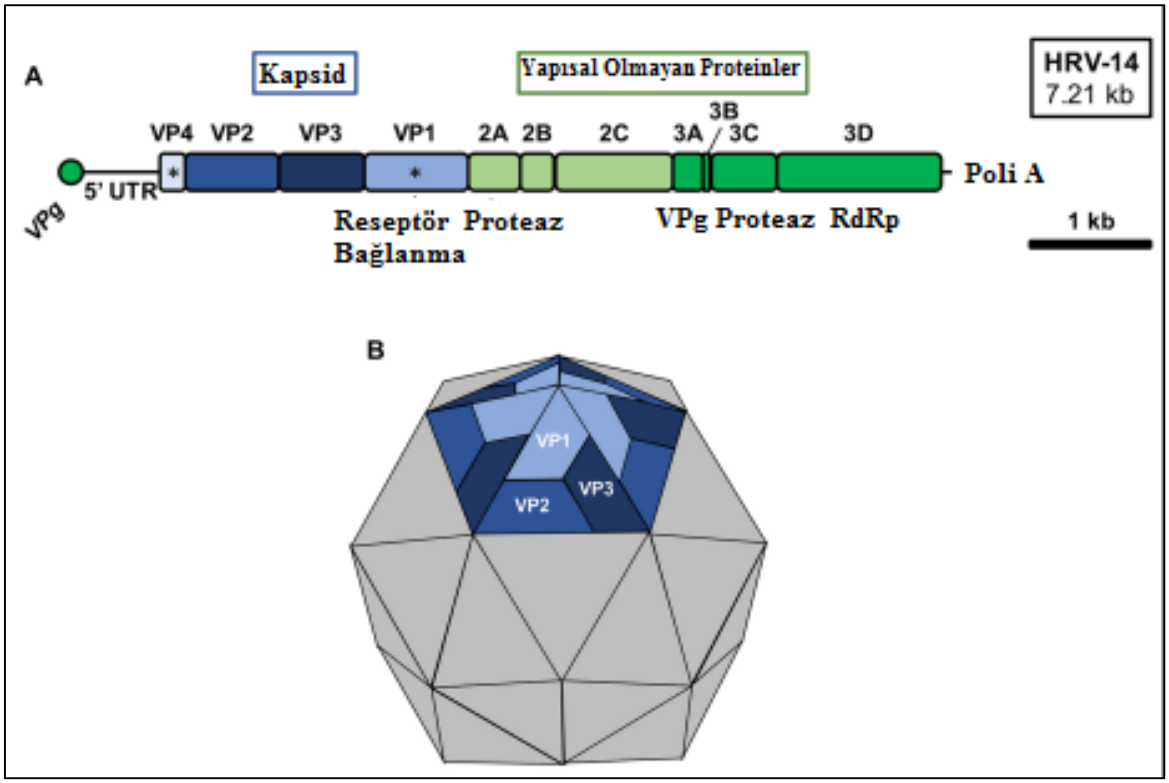


Şekil 2.1. *Picornaviridae* virüs ailesinin sınıflandırılması. Klinik olarak önem arz eden cins, tür ve bazı genotip/serotip örnekleri verilmiştir (Van der Linden, Wolthers ve van Kuppeveld, 2015)

2.3. Viryon Yapısı ve Genomik Özellikleri

Picornaviridae ailesinin ve *Enterovirus* cinsinin üyeleri olan HRV'ler, yaklaşık 30 nm çapında, zarfsız virüslerdir. Virüsün ikosahedral kapsidi 7200 bazlı pozitif anlamda tek sarmallı RNA (+ssRNA) viral genomunu çevreler (Jacobs ve diğerleri, 2013). Viral genom, proteazlar ile parçalandığında 11 protein oluşturma kapasitesi bulunan tek bir genden oluşur (Şekil 2.2). Bu gen, 5' ucu hizasından başlayarak bir 5' viral protein (VPg), 5' çevrilmeyen bölge (UTR), bir poliprotein kodlayan uzun bir açık okuma çerçevesi (ORF), bir 3'UTR ve son kısımda bir 3' poli-A kuyruğundan meydana gelmektedir. 5′UTR yaklaşık olarak 650 bazdır, açık okuma çerçevesi ise 6500 bazdır ve yaklaşık olarak 2100 amino asit kodlayabilmektedir, son olarak ise 3′UTR tahmini 50 bazdan oluşur. 5′terminal U pozisyonunda genom replikasyonu için primer görevi gören küçük bir viral protein (VPg) kovalent olarak bağlanır. 5′UTR, gen translasyonu ve diğer işlevler için gerekli birçok yapısal eleman içerir. ORF'nin tek bir polipeptit ürünü bölünerek çeşitli proteinler kapsidi

oluşturmak için bir araya gelirler veya replikasyonla ilgili diğer özellikli işlevleri yerine getirirler (Paul, vanBoom, Filippov ve Wimmer, 1998; Palmenberg, Rathe ve Liggett, 2010; Jiang, Yang, Yang, Lu, Yi, Zhang ve Wang, 2022).



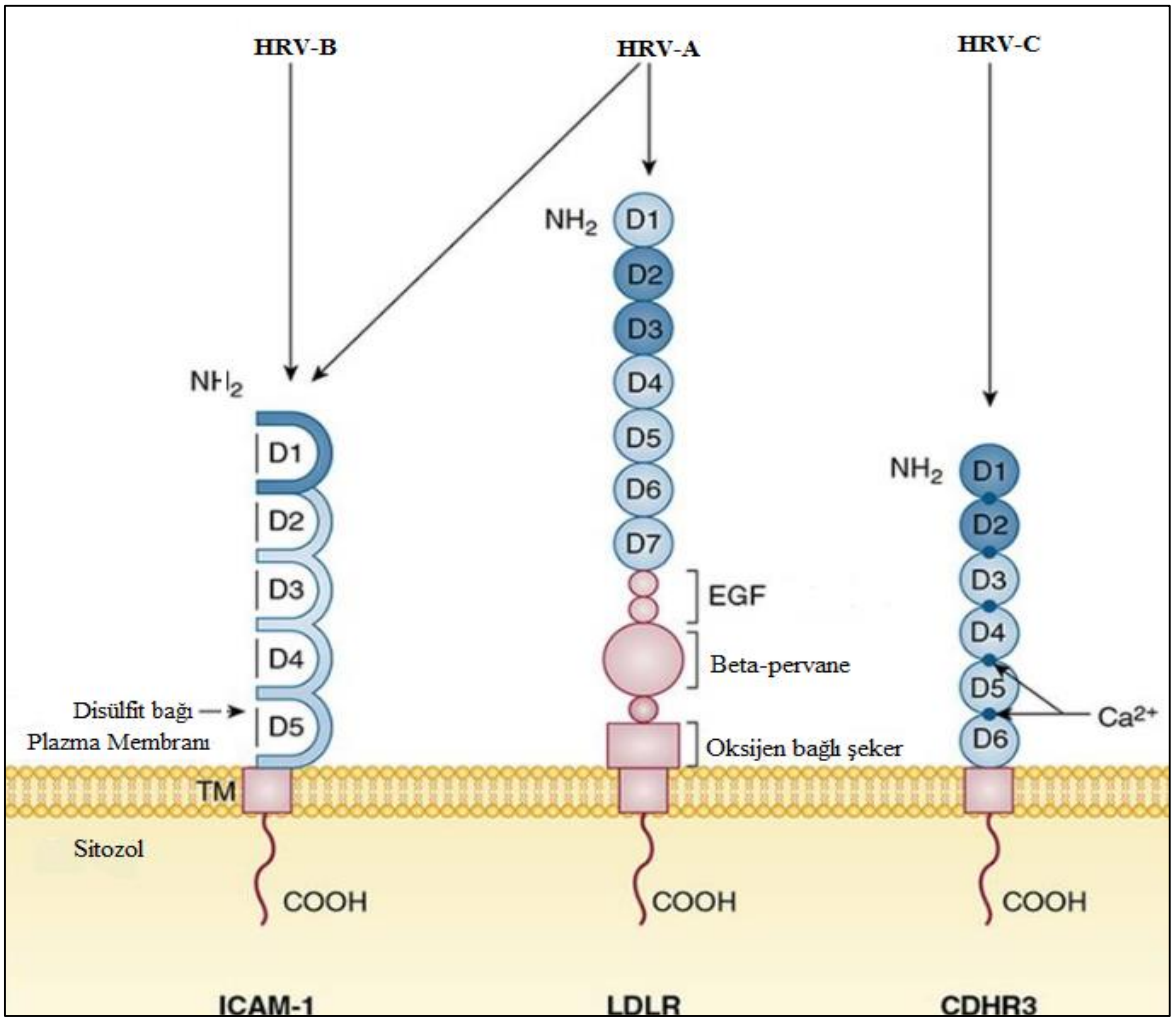
Şekil 2.2. (A) İnsan rinovirüs genomik organizasyonu gösteren HRV-14'ün 7,21 kb +ssRNA genomu (B) HRV'nin ikosahedral viryon yapısı (Stobart, Christopher, Nosek, Jenna, Moore ve Martin, 2017)

X-ışını kristalografisi ve/veya kriyo-elektron mikroskobu teknikleri kullanılarak atomik düzeyde çözünürlükle HRV'nin viryon yapısına ve işlevine netlik kazandırılmıştır. VP1, VP2, VP3 ve VP4 olarak adlandrılan ve her birinin 60 kopyası bulunan dört protein, RNA genomunu saran viral kapsidi oluştururken diğer yapısal olmayan proteinler de viral genom replikasyonunda görev alır (Touabi, Aflatouni ve McLean, 2021). VP1, VP2 ve VP3 proteinleri virüsün antijen çeşitliliği ile ilişkili, virüs yüzeyinde bulunurken VP4 kapsidin altında konumlanarak RNA çekirdeğinin kapside tutunmasını sağlar (Palmenberg ve diğerler, 2010; To, Yip ve Yuen, 2017), (Şekil 2.1). VP1 içinde, küçük moleküllü antiviral bileşiklerin bağlandığı ve virüs kapsidi ile bağlantılı fonksiyonların engellendiği hidrofobik bir cep de bulunur (Ledford, Patel, Demenczuk, Watanyar, Herbertz, Collett ve Pevear, 2004). Ayrıca 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C ve 3D olmak üzere yapısal olmayan proteinler de

genom üzerinde yer alır. Bu yapısal olmayan proteinlerden 2A ve 3C, viral poliproteinin parçalanmasında görevli proteazlardır; aynı zamanda 3C, antiviral bağışıklığı antagonize etmek için de gereklidir (Tam, Bidgood, McEwan ve James, 2014). 3D ise, RNA'ya bağımlı RNA polimerazdır (RdRp) ve konaktan bağımsız virüs çoğalmasını sağlamaktadır (Elfiky, 2021). Protein 2C, 2B ve 3A, replikasyon komplekslerini konak hücrenin membranına sabitlemektedir. Protein 2B ise, hücre zarı geçirgenliği ve endoplazmik retikulum aracılığıyla kalsiyum akışını hızlandırarak virüs partiküllerinin hücrelerden salınmasını sağlamaktadır (Jensen, Walker, Jans ve Ghildyal, 2015; Jiang ve diğerleri, 2022).

2.4. Rinovirüs Reseptörleri

HRV'ler, konak epitel hücrelerine bağlanmak ve girmek için plazma membranda bulunan üç tip glikoproteinden birini kullanır. HRV-A ve HRV-B serotipleri, reseptör özgüllüklerine bağlı olarak majör ve minör enfektivite gruplarına ayrılır (Greve, Davis, Meyer, Forte, Yost, Marlor, Kamarck ve McClelland, 1989). Tüm HRV-B'yi ve birçok HRV-A tipini oluşturan majör grup virüsler, reseptör olarak hücreler arası adezyon molekülü 1'i (ICAM-1) kullanır. Bazı majör grup HRV'ler, özellikle hücre kültürüne adapte olduklarında, alternatif bir reseptör olarak heparan sülfat proteoglikanlarını da kullanabilirler (Vlasak, Goesler&Blaas, 2005). Minör grupta ise, ICAM-1 yerine düşük dansiteli lipoprotein reseptörüne (LDLR) bağlanan 12 HRV-A alt tipi bulunur. Tüm HRV-C'ler ise *in vivo* olarak silli hava yolu epitel hücreleri tarafından sentezlenen bir transmembran proteini olan CDHR3 ile etkileşime girerler (Bochkov, Watters, Ashraf, Griggs, Devries, Jackson, Palmenberg ve Gern, 2015; Griggs, Bochkov, Basnet, Pasic, Brockman-Schneider, Palmenberg ve Gern, 2017). Bazı HRV-C'ler de *in vitro* tekrarlanan pasajlardan sonra, HeLa hücrelerinin yüzeyinde bulunan proteoglikanlara bağlanabilirler (Bochkov, Watters, Basnet, Sijapati, Hill, Palmenberg ve Gern, 2016). HRV-A, HRV-B ve HRV-C'ler kendine özgü olan ICAM-1, LDLR ve/veya CDHR3 hücre reseptörlerine tutunarak endositozu başlatır ve konak hücreye girerek genomun açılmasını sağlar (Fuchs ve Blaas, 2010), (Şekil 2.3).

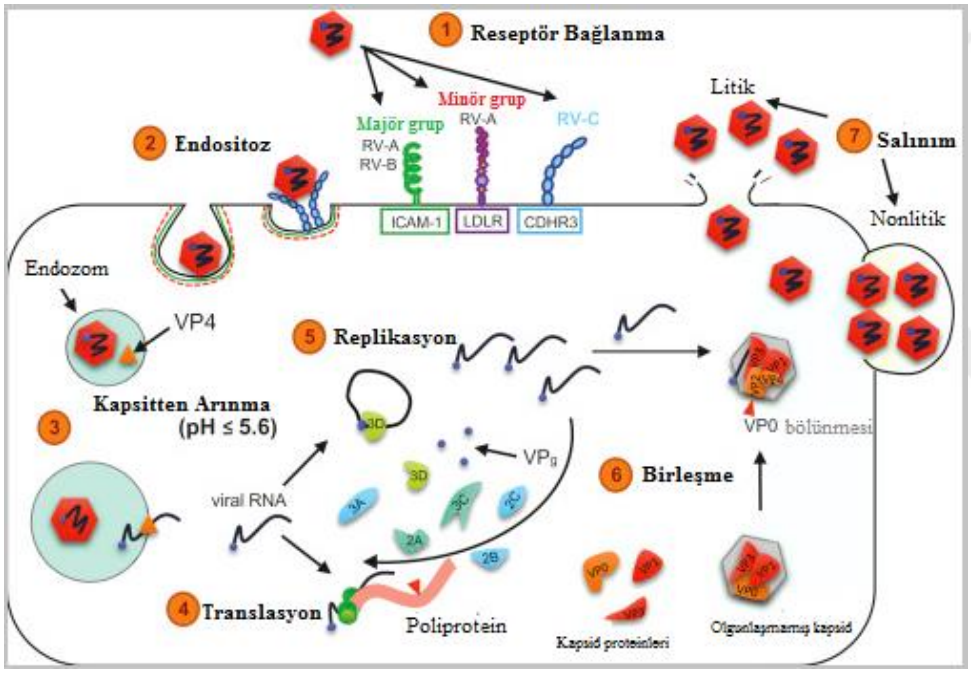


Şekil 2.3. HRV-A, HRV-B ve HRV-C'nin hücre reseptörleri (D = hücre dışı ligand bağlayıcı immünoglobulin domaini, EGF=epidermal büyüme faktörü, TM=transmembran) (Basnet, Palmenberg ve Gern, 2019)

2.5. Rinovirüs Replikasyonu ve Yaşam Döngüsü

Tür spesifik reseptörler aracılığıyla plazma zarına bağlanan HRV suşları ilk olarak viral VP1 ile konak hücre yüzeyine tutunur. Virionun hücre içine alınması, reseptör çeşitliliğine bağlı olarak farklı endositik yolaklar aracılığıyla gerçekleşir. Virüs, hidrofobik subviral partiküller oluşturmak için endozom için dekonformasyonel bir değişime uğrar (Kerr, Mathew ve Ghildyal, 2021). Tam salınım mekanizması bilinmemekle birlikte, viral proteinlerin, genomun sitoplâzma içine salınımına aracılık ederek endozomu parçaladığı düşünülmektedir (Jacobs ve diğerleri, 2013; Stobart ve diğerleri, 2017). Viral genom ve VP4 sitozole girdiğinde, konak hücre ribozomları (+)ssRNA'dan bir poliprotein sentezler. Bu poliprotein, viral proteazlar *(2A proteaz, 2Apro ve 3C proteaz, 3Cpro)* tarafından daha küçük proteinlere bölünür ve yapısal proteinler olan VP1, VP0, VP3 ile virüs replikasyonu için

önem arz eden RNA'ya bağımlı RNA polymeraz $3D^{pol}$, 3CD, 2AB gibi yapısal olmayan proteinleri oluşturur (Fuchs ve Baas, 2012). Rinovirüsün replikasyonu, sitoplâzmada bulunan virüsün indüklediği membranöz replikasyon organellerinde RNA'ya bağımlı RNA polimeraz $3D^{pol}$ enzimini kullanarak (-)ssRNA ve daha sonra (+)ssRNA üreterek kendini kopyalar. Yeni viral proteinler ve RNA daha sonra paketlenerek hücreden salınır. Bu paketlenme işlemi sırasında ise bilinmeyen bir proteaz VP0'ın VP2 ve VP4'e bölünmesini sağlar (Lee, Monroe ve Rueckert, 1993). Enfeksiyöz viryonların hücreden salınımı ise, hücre lizizi ve zarla çevrili yapılarda salınım da dâhil olmak üzere çeşitli yollar ile farklı suşlarda değişkenlik göstermektedir (To ve diğerleri, 2017; Kerr ve diğerleri, 2021), (Şekil 2.4).

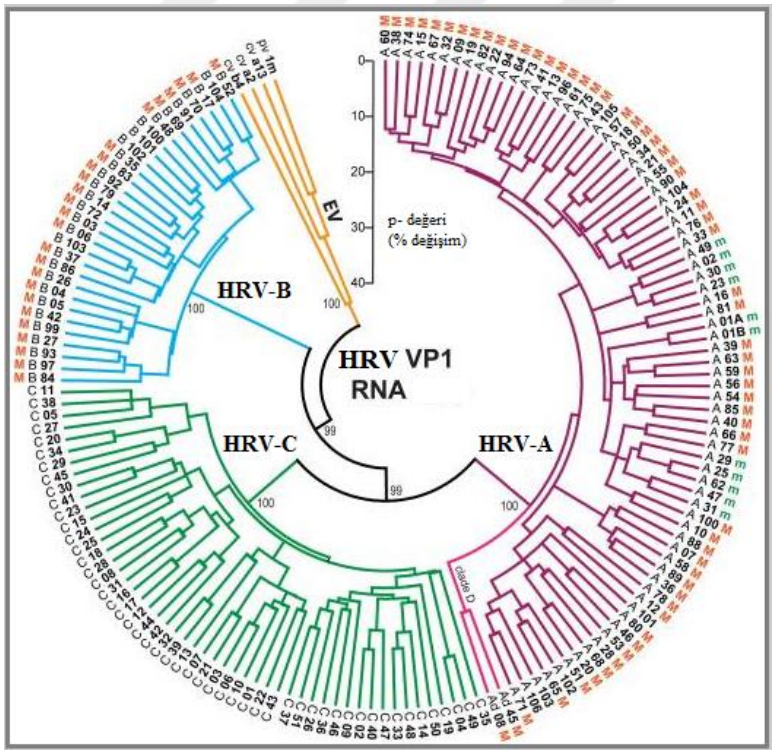


Şekil 2.4. Rinovirüs yaşam döngüsü (Esneau, Bartlett ve Bochkov, 2019)

2.6. Rinovirüsün Filogenetik Çeşitliliği

HRV'ler genomik ve antijenik özellikleri bakımından değişkenlik göstermektedir. İmmünolojenik yanıta bağlı olarak, erken dönemlerde serolojik nötralizasyon aktivitesi ile ilişkili 99 referans serotipte sınıflandırılmışlardır ve bunların 74'ü HRV-A türüne, 25'i ise HRV-B türüne aittir (Ledford ve diğerleri, 2004). Ayrıca, reseptör özgüllüğü (ICAM-1 ve LDLR) ve antiviral ilaç duyarlılığı gibi parametreler de göz önüne alınmaktadır. Ancak, gelişen tersine genetik uygulamalarla, evrimsel ilişkiler ve tür tayini 5'UTR veya kapsid genlerinin kısmi dizi örtüşmesine bağlı olarak biyoinformatik yöntemlerle

değerlendirilmektedir. Genellikle incelenen kapsid genleri, viral nötralizasyon antijenik yanıtın bir parçası olan ve sentetik antiviral bileşiklerin bağlanma bölgesi olan VP1 bölgesini, VP4 veya VP4/VP2 gen bölgelerini içerir. Bu bağlamda bilinen bir genotipe yeni bir suşun atanması kapsid bölgelerinden birinde veya her ikisinde>%86-87 hizalanmış nükleik asit uyumluluğu gerektirir (Şekil 2.5), (McIntyre, Knowlesve Simmonds, 2013). Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi (ICTV) tarafından onaylanan veya incelenmekte olan son taksonomi önerileri ise komitenin ilgili web sitesinde gözden geçirilebilir. Ayrıca, yeni bir izolat keşfi için araştırmacı tarafından Picornavirus Çalışma Grubu (SG)'nin web sitesindeki (https://www.picornastudygroup.com/) bağlantılar kullanılarak elde edilen karşılaştırmalı diziler komitenin değerlendirmesine sunulmalıdır. Yeni tür tanımlamaları ICTV'nin onayına tabidir (Palmenberg ve diğerleri, 2015). Mevcut moleküler gelişmelerle, tüm referans serotipler önceden tanımlanmış 2 serotipe ilaveten VP1 genine göre 33 tip yeni HRV-C türüne atanmıştır (Linsuwanon, Payungporn, Suwannakarn, Chieochansin, Theamboonlers ve Poovorawan, 2011). İlerleyen dönemlerde ise bu sayı yaklaşık olarak 83 HRV-A, 32 HRV-B ve 56 HRV-C olmak üzere toplam 171 serotip ile güncellenmiştir (Stobart ve diğerleri, 2017; Triantafilou ve diğerleri, 2022).



Şekil 2.5. HRV-A, HRV-B ve HRV-C genotiplerinin VP1 RNA dizileri ve komşu birleştirme yöntemi kullanılarak oluşturulan dairesel filogenetik ağacı. Majör ("M", ICAM-1) ve minör ("m", LDLR) reseptör gruplarını belirtilir (McIntyre ve diğerleri, 2013)

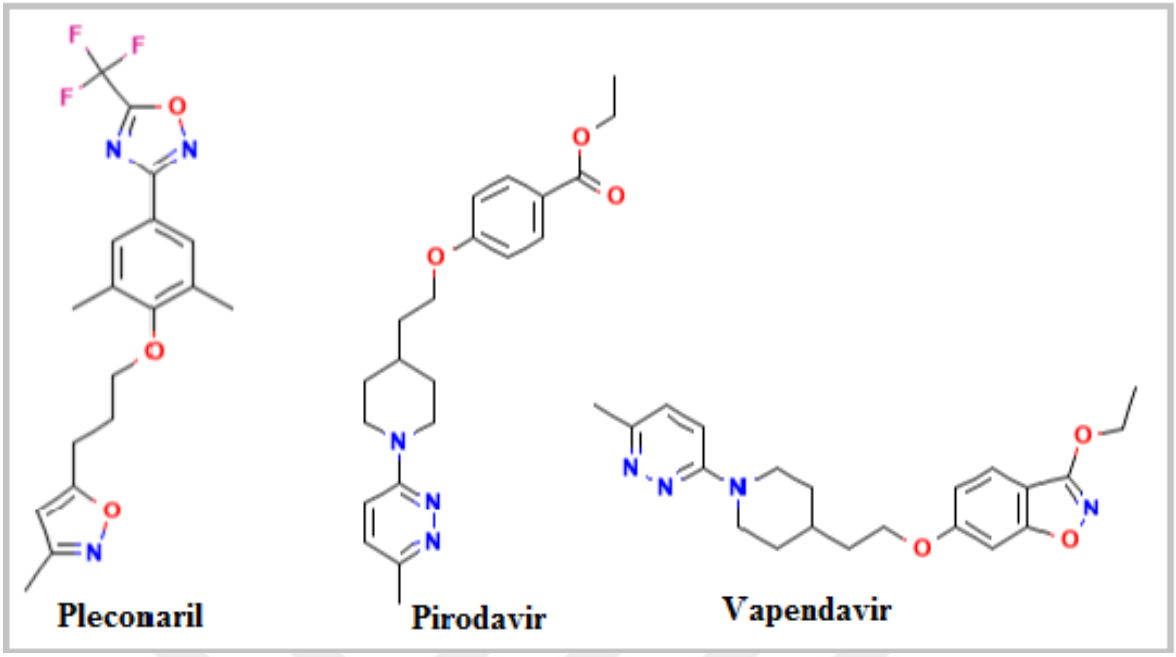
2.7. Rinovirüslere Karşı Kullanılan Antiviral İlaçlar

Rinoviral enfeksiyonlarda dolaşımda olan filogenetik çeşitlilik, özelleşmiş antiviral ilaçlarla tedavinin aşılamadan daha etkili ve sürdürülebilir olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, etkinliği yüksek yeni doğal veya sentetik antirinoviral bileşiklerin araştırılmasına ağırlık verilmiş olup bu bağlamda ilaçlar tasarlanmaktadır. Böyle bir anti-HRV ilacının (i) çok sayıda HRV serotipi nedeniyle geniş antiviral özgüllüğe sahip olması, (ii) hızlı enfeksiyon kinetiği sebebiyle etkin bir antiviral etki göstermesi için enfeksiyon süresince çok erken uygulanması, (iii) milyonlarca insan tarafından geniş çapta uygulanması için güvenilir ve (iv) direnç geliştirme riski düşük, yüksek oranda korunmuş bir hedefe yönelik olması gerekmektedir (Rollinger ve Schmidtke, 2011). Viral enfeksiyonlar için hâli hazırda kullanılan kemoterapötik birçok seçenek olmasına rağmen yukarıda sıralanan gereksinimler nedeniyle bu ilaçların hiçbiri HRV enfeksiyonunda kullanım için lisanslanamamıştır. Ancak, yapılan çalışmalarda birçok etken maddenin mevcut HRV serotiplerine karşı antiviral aktiviteye sahip olduğu ve dolayısıyla bu enfeksiyonda terapötik kullanım için heyecan verici beklentiler sunduğu gösterilmektedir (Casanova, Sousa, Stevens ve Barlow, 2018). Literatürde yer alan bu rinoviral inhibitörler, virüs hedef bölgesi ve etki mekanizması bakımından farklılıklar barındırmakta ve potansiyel ilaç olması açısından ileri dönem araştırmalara ışık tutmaktadır. Yalnız, tüm RNA virüsleri gibi HRV'lerinde bölge başına mutasyon oranlarının yüksek olması ve Picornavirüslerin RNA polimerazlarındaki hata okuma yeteneğinin bulunmaması virüs popülâsyonlarında doğal olarak ilaca dirençli varyantları doğurabilir veya tedavi süresince dirençli virüsler ortaya çıkabilir (Racaniello, 2007; Rollinger ve Schmidtke, 2011).

2.7.1. Viral kapsidi hedefleyen bileşikler

HRV inhibitörleri arasında başı çeken viral kapsidi hedefleyen izoksazol türevli çok halkalı organik bileşiklerdir. Bu kimyasallar, çoğunlukla dört kapsid proteininin en büyüğü olan VP1'in hidrofobik cebine bağlanarak viral genomun salınması için gerekli yapısal değişikliklere karşı ikosahedral kapsidi stabilize ederek virüs-reseptör bağlanmasını bloke ederler (Reisdorph, Thomas, Katpally, Chase, Harris, Siuzdak ve Smith, 2003; Real-Hohn ve Blaas, 2021). Literatürde araştırmalara konu olan birçok kapsid bağlayıcı inhibitör bulunmasına rağmen en iyi bilinenleri pleconaril, pirodavir ve vapendavirdir (Şekil 2.6). Pleconaril (Schering-Plough), ağız yoluyla alınan düşük moleküler ağırlıklı bir bileşiktir.

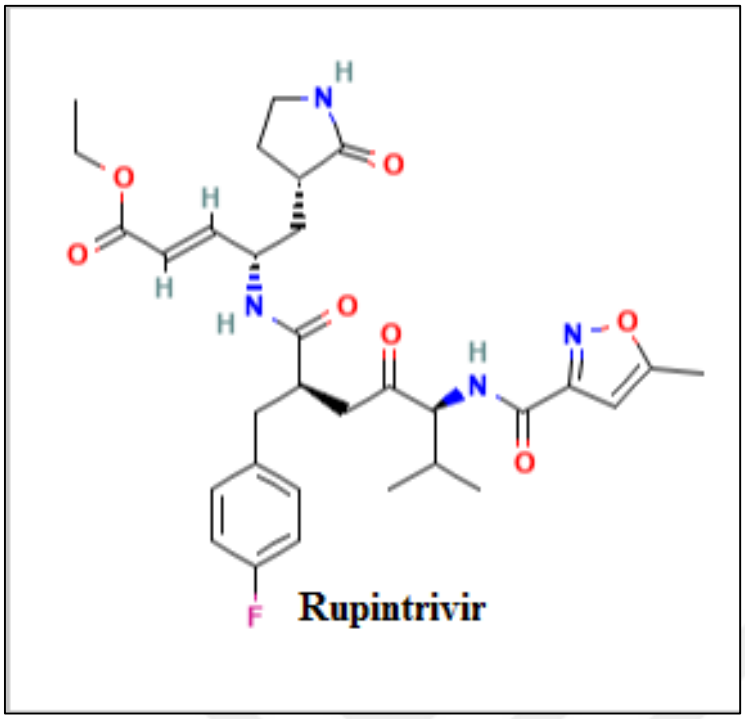
Birçok *Enterovirüs* ve *Rinovirüs* alt türünü kapsayıcı ve geniş spekturumlu olmasına rağmen özellikle VP1 kanyonunda ve amino asit dizilerindeki farklılıklar nedeniyle HRV-C'ye karşı etkinliği zayıftır (Coultas, Cafferkey, Mallia ve Johnston, 2021). Ancak, kapsamlı bir çalışma, beş HRV serotipi (HRV-2, HRV-14, HRV-16, HRV-39 ve HRV-A21) ve 46 klinik izolata karşı pleconarilin etkinliğini *in vitro* sitopatik etki (SPE) inhibisyon deneyleri yaparak incelemiştir. Çalışma, bu bileşiğin beş serotipe ve tiplendirilmemiş klinik izolatların çoğuna karşı etkili antirinoviral aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Kaiser, Crump ve Hayden, 2000). Farklı çalışmalarla da desteklenen Pleconaril verilerine rağmen faz II denemelerinden elde edilen sonuçlar ve gözlemlenen yan etkiler sebebiyle, 2002 yılında ABD Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) soğuk algınlığı tedavisi için yapılan başvuru onayı reddedilmiştir. Pirodavir (Janssen Pharmaceutica), hem HRV-A, HRV-B'nin hem de daha az oranda olsa da diğer enterovirüslerin replikasyonunu *in vitro* olarak etkinliği gösterilen ilk bileşiktir (Andries, Dewindt, Snoeks, Willebrords, van Eemeren, Stokbroekx ve Janssen, 1992). 1990'larda HRV'nin önlenmesi ve tedavisi için faz III klinik deneylere ulaşan bir intranazal kapsid bağlayıcıdır. Ancak bileşik, viral replikasyonu ve salınımı azaltmasına rağmen, semptomatik etkinlik süresi veya şiddetinde önemli bir azalma gösteremediği için çalışmalar ileriki aşamaya taşınamamıştır (Patick, 2006). Vapendavir (Aviragen Therapeutics) ise virüs izolatlarına karşı Pleconaril'den daha geniş spektruma sahiptir ve astımlı hastalarda faz IIb sürecinde değerlendirilmişitir. Bu faz IIb çalışması, rinovirüs mevsimi boyunca orta-şiddetli astımlıları ve enfekte olduklarında ilaç veya plasebo ile çeşitli dozlardaki süreci izlemiştir (Powell, Thomas ve Cockerill, 2017). Klinik deneyler sonucunda HRV ile enfekte olmuş kişilerde viral yükün kanıtlanmış düşüşü gözlenirken astım alevlenmelerinin azaltılması üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır. Bu sebeple Vapendavir'in anti-rinovirüs bileşiği olarak klinik potansiyeli halen araştırılmaktadır (Lanko, Sun, Froeyen, Leyssen, Delang, Mirabelli ve Neyts, 2021).



Şekil 2.5. Pleconaril, pirodavir ve vapendavir' in kimyasal yapısı (www. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.7.2. Yapısal olmayan viral proteinleri hedefleyen bileşikler

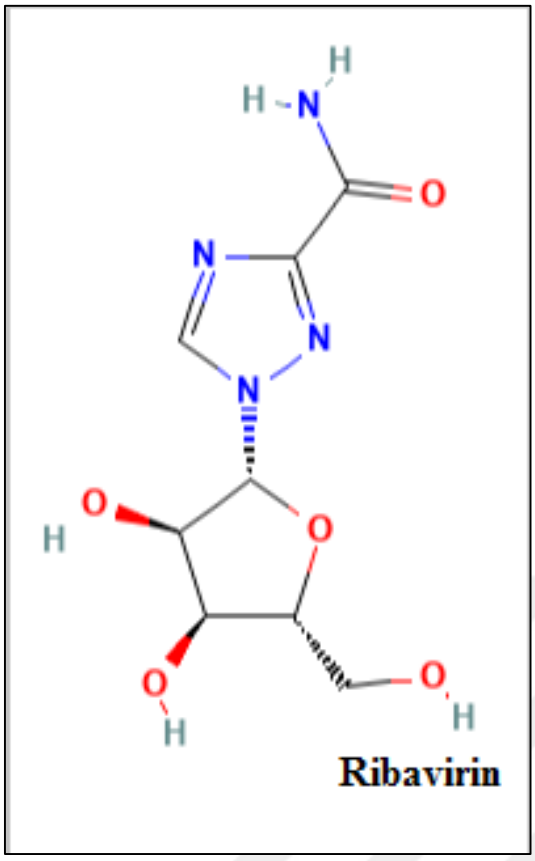
İlk olarak rinoviral ss(+)RNA konak hücrenin sitozolüne girdikten sonra, viral proteazlar tarafından $2A^{pro}$ ve $3C(D)^{pro}$ eş zamanlı translasyon ve enzimatik aktivite ile ~230 kDa'luk bir poliproteine çevrilir. $2A^{Pro}$ ve $3C(D)^{Pro}$'nun bu katalitik işlevi potansiyel inhibitörler için ideal hedef olmasını sağlamıştır (Jensen ve diğerleri, 2015). Literatürde, bu proteazlara odaklanan birçok bileşik çalışması mevcuttur; ama *in vitro* olarak $3C^{Pro}$ inhibe eden en güçlü ajan Rupintrivir olup geniş rinoviral-enteroviral panele karşı aktifliği ortaya koyulmuştur (Binford, Maldonado, Brothers, Weady, Zalman, Meador, 3rd, Matthews ve Patick, 2005). İntranazal olarak uygulanan Rupintrivir'in *in vivo* çalışmaları ise güvenilir bir profil çizmektedir. Ayrıca, plasebo grubuyla kıyaslandığında semptomlarda ve viral titrelerde orta düzeyde azalma göstermiştir. Klinik yararlarının yeterli olmayışı, rupintrivir ile ilgili daha fazla çalışma yapılmamasına neden olmuştur. Ek olarak, RNA'ya bağımlı RNA-polimeraz (RdRp) $3D^{pol}$'de konak hücrede bulunmamasından ötürü, ideal bir kemoterapik hedeftir ve bu enzimatik inhibasyon için nükleosit ve nükleotid analogları geliştirilmiştir (Coultas ve diğerleri, 2021).



Şekil 2.6. Rupintrivir'in kimyasal yapısı (www. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

2.7.3. Viral RNA sentezini hedefleyen bileşikler

Replikasyon sırasında viral RNA sentezinin bloke edilmesine yönelik kemoterapötik çok sayıda ajan tasarlanmıştır. Bunlardan deoksiribozimler (DNAzim), morfolino oligomerler ve susturucu RNA (siRNA) gibi rinoviral RNA dizisine özgü şekilde dizayn edilen bileşikler üzerinde çalışmalar yapılmış ve bu son iki yaklaşımın etkinliği hücre kültüründe doğrulanmıştır (Rollinger ve Schmidtke, 2011). Ayrıca, viral mRNA sentezine müdahale edebilen sentetik bir guanozin nükleozidi olan Ribavirin ve birçok modifiye edilmiş analoğun HRV-14'e karşı orta düzeyde antiviral aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Allen, Boswell, Khwaja, MeyerJr, Sidwell, Witkowski, Christensen ve Robins, 1978; Casanova ve diğerleri, 2018). HRV-14 suşu ile *in vitro* yapılan bir çalışmada ise Ribavirin'in etkinliği saptanamamış olsa da HRV-87 ile enfeksiyonda tedaviye orta derecede duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (Smee, Evans, Nicolaou, TarbetveDay, 2016; Thibaut, Leyssen, Puerstinger, Muigg, Neyts ve De Palma, 2011).



Şekil 2.7. Ribavirin'in kimyasal yapısı (www. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar

Çalışma süresince KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı'nda bulunan cihazlar kullanılmıştır. Bunlar: Manyetik Karıştırıcı (IKA), Gerçek Zamanlı PCR Cihazı (Roche LightCycler 96), Otomatik Pipetler (Eppendorf), Pipet Kontrolörü (Eppendorf), Distile Su Cihazı (Milli-Q®), Mini Santrifüj (Eppendorf), Hassas Terazi (Sartorius), Soğutmalı Santrifüj (Thermo Fisher Scientific), -80°C ve -20°C Derin Dondurucu (Thermo Fisher Scientific), CO_2'li inkübatör (Thermo Fisher Scientific), Biyogüvenlik Kabini (Labculture®), Biyogüvenlik Kabini (Biobase), Vorteks (Combi-Spin), Su Banyosu (Thermo Fisher Scientific), pH Metre (FiveEasy™), Buzdolabı (Biobase), Inverted Mikroskop (ZEISS), Otomatik Hücre Sayacı (LUNA-II), Mikroplate Okuyucu (Tecan Safire²), Termal Döngü Cihazı (Biometra TOne), Agaroz Jel Elektroforezi (Biometra), Jel Görüntüleme Sistemi (Nippon Genetics), DNA Dizi Analiz Cihazı (Thermo Fisher Scientific)'dır.

3.1.2. Çalışmada kullanılan hücreler ve virüsler

Bu çalışmada KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı'nda bulunan ve Rinovirüs'ün neden olduğu SPE'lere karşı oldukça duyarlı bir HeLa alt klonu olan HeLa Rh hücreleri kullanılmıştır. Bu hücreler ise Janssen Pharmaceutica bünyesinde görev alan Koen Andries tarafından sağlanmıştır. Ayrıca, KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı Kültür Koleksiyonundan majör grup rinovirüslerden HRV-B serotipine ait HRV-14 suşu kullanılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan kimyasal bileşikler

Araştırmaya konu olan CIM212240 bileşiği İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi **(**CD3, Leuven, Belçika) Laboratuvarında geliştirilmiştir. Moleküler formülü $C_{25}H_{32}N_6O$ olan bu bileşiğin moleküler ağırlığı ise 432,56 g/mol'dür. Aynı farmasötik firmasına ait olan CIM119143

bileşiğinin ise moleküler formülü $C_{25}H_{32}N_6O_3$ ve moleküler ağırlığı 406,482 g/mol'dür. Ek olarak, KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı'nda bulunan Rupintrivir antirinoviral etkinliği kanıtlanmış bir bileşik olması sebebiyle referans olarak kullanılmıştır. Bu bileşik ise Axon Medchem (Hollanda) tarafından sağlanmıştır.

3.1.4. Çalışmada kullanılan besiyerler ve çözeltiler

HeLa Rh hücreleri geliştirilmesinde kullanılan besiyeri

Hücre gelişimi için gerekli aminoasit kombinasyonu, vitamin ve glikoza sahip 500 mL'lik Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; Gibco) hazır besiyerine önceden 56°C'de 30 dakika ısıyla inaktive edilmiş %10 derişimde fötal sığır serum (FBS; Integro) ilave edilmiştir. Tampon işlevi gören %1'lik sodyum bikarbonat ile karıştırılarak HeLa Rh hücreleri için uygun ortam hazırlanmış ve hazırlanan besiyerleri +4°C'de muhafaza edilmiştir.

HRV -14 suşu geliştirilmesinde kullanılan besiyeri

Viral etkinlik gözlemlemek için gerekli aminoasit kombinasyonu, vitamin ve glikoza sahip 500 mL'lik Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM; Gibco) hazır besiyerine önceden 56°C'de 30 dakika ısıyla inaktive edilmiş %2 derişimde fötal sığır serum (FBS; Integro) ilave edilmiştir. Tampon işlevi gören %1'lik sodyum bikarbonat ve önceden hazırlanmış 10 mL 30 mM derişimli $MgCl_2$ ise karıştırılarak besiyeri +4°C'de muhafaza edilmiştir.

30 mM $MgCl_2$ çözeltisinin hazırlanması

500 mL steril saf su ve otoklavlanmış mıknatıs eklenen behere 71,41 gram $MgCl_2$ tozu (Sigma M4880, BioReagent) hassas tartı ile ölçülüp ekzotermik reaksiyonun etksini azaltmak için yavaş yavaş ilave edilerek çözdürülmüştür. Elde edilen çözelti filtreli vakum sisteminden geçirilerek şişelenmiş ve +4°C'de saklanmıştır.

CIM212240 ve CIM119143 bileşiğinin hazırlanması

Liyofilize halde İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi (CD3, Leuven, Belçika) şirketinden araştırma amaçlı temin edilen bileşikler moleküler ağırlıkları göz önüne alınarak 10 mM olacak şekilde Dimetil sülfoksit (DMSO) ile hazırlanmıştır ve +4°C'de stoklanmıştır.

5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4,5-dimetil-tiyazolil)-3- (4-sülfofenil) tetrazolyum (MTS) çözeltisinin hazırlanması

Toz haline bulunan 1 gram MTS 500 mL PBS içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözülmüştür. 1 M HCl solüsyonu ile çözeltinin pH'ı 6,0-6,5 arasında olacak şekilde ayarlanmıştır. Ardından, 23 mg fenazin metosülfat (PMS) tozu karıştırılarak çözelti elde edilmiştir. Çözelti 0,22 µm filtre ile süzdürülerek 2 mL tüplerde -20°C'de saklanmıştır. Tüm işlemler MTS'in ışığa duyarlı olması sebebiyle alüminyum folyoya sarılmış tüplerle ve mümkün olduğunca karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. HeLa Rh hücrelerinin aktifleştirilmesi ve sürdürülmesi

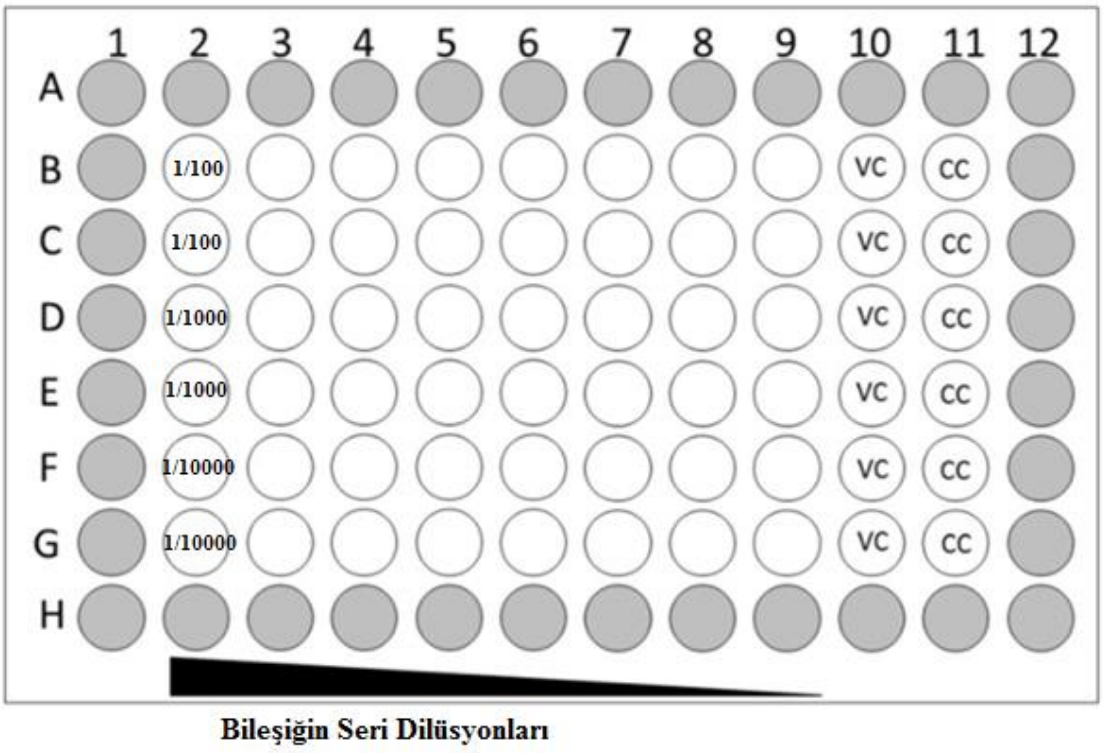
Hücreler sıvı nitrojen tankından çıkarılarak, önceden hazırlanmış 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde eritilmiştir ve HeLa Rh hücre kültürü için taze hazırlanan oda sıcaklığındaki besiyer ile 1:10 oranında muamele edilmiştir. Hücre süspansiyonu 5 dakika yaklaşık 1000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Sonrasında, hücre peleti korunarak süpernatant nazikçe boşaltılmış ve dipte kalan pellete 4 mL kadar tekrar besiyeri eklenip pipetaj yardımıyla yeni bir süspansiyon elde edilmiştir. Bu süspansiyondan 1:10 oranında 20 mL 75 cm^2 kültür flasklarına eklenmiştir. Flasklar 37°C sıcaklık, %95 nem ve %5 CO_2 inkübasyon şartlarında tutulmuştur (Sun, Delang, Mirabelli ve Neyts, 2017).

Hücre pasajlarının devamlılığı için hücreler ekim derişimleri (1:10 veya 1:20) baz alınarak 3 ila 4 günlük inkübasyon süreleriyle gözlemlenmiş ve etkin hücre yoğunluğu olan flasklar tekrar alt kültüre edilmiştir. Bu aşamada ilk olarak aspire edilen flasklar 10 mL PBS ile yıkanmış ardından 2 mL tripsin ile 37°C sıcaklıkta inkübe edilmişir. Protein-yüzey etkileşimini sonlandırmak için 2-5 dakika beklenmiş ve ardından hücrelerin flask tabanından serbestleşmesi gözlenmiştir. Ortamdan tripsin aspire edilmiş ardından 10 mL'ye kadar hücre

besiyeriyle tamamlanmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu 15 mL'lik bir tüpe aktrarılarak oda sıcaklığında 5-6 dakika, 1200 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant dökülerek kalan hücre peleti istenen ortam hacim oranına ve ekim konstrasyonuna göre yeniden süspanse edilmiştir. 75 cm^2'lik yeni flasklar 20 mL toplam hacimde, 150 cm^2'lik flasklar ise 35-40 mL toplam hacimde %10 hücre süspansiyonu olacak şekilde hazırlanmıştır (Sun ve diğerleri, 2017).

3.2.2. Hücre kültürü plaklarının oluşturulması

İlk olarak, 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarının en dışında bulunan, Şekil 3.1'de gri ile gösterilen kuyucuklara sadece 100 µL ortam besiyeri çok kanallı mikropipet yardımıyla koyulmuştur. 2 µL Tripan mavi boyası ile 18 µL HeLa Rh hücre süspansiyonu karıştırılmış, ardından otomatik hücre sayıcı kullanılarak canlı hücre sayısı saptanmıştır. 96 kuyucuklu hücre kültürü plakalarında kuyucuk başına 100 µL ve $1{,}5x10^4$ hücre yoğunluğunda olacak şekilde hücre süspansiyonu HRV-14 suşu için hazırlanan besiyeri ile seyreltilmiş ve ekilmiştir. Hücreler gece boyunca plaka yüzeyine tutunması için 35°C, %5 CO_2'li inkübatöre kaldırılmıştır (Sun ve diğerleri, 2017).

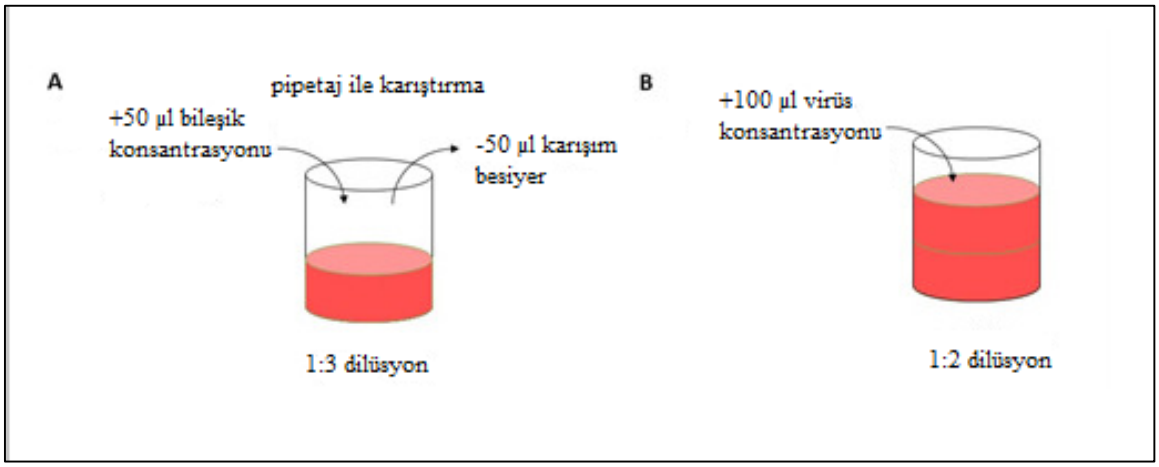


Şekil 3.1. Antiviral deneyler için 96 kuyucuklu plaka tasarımı (Sun ve diğerleri, 2017). VC: virüs kontrolü, CC: hücre kontrolü

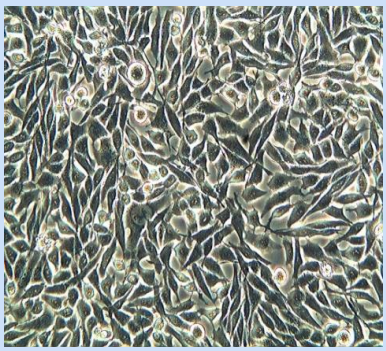
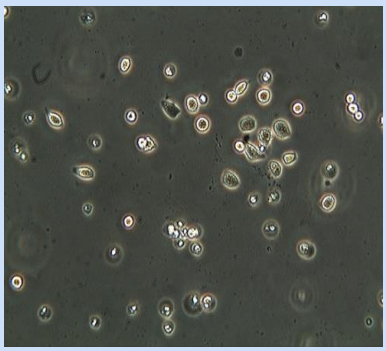
3.2.3. Antiviral SPE redüksiyon testi

24 saat beklenerek elde edilen plaklar daha sonra, bileşikler 50 µM olacak şekilde başlangıç derişimine seyreltilmiştir. Bu başlangıç derişimi, 1:3 seri dilüsyonlar için son miktarın yaklaşık 6 katı olacak şekilde tasarlanmıştır. Öncelikle, ikinci kolonda B2-G2 kuyucuklarındaki 100 µL deney ortamına 50 µL başlangıç derişimi eklenmiş ve ardından yavaşça pipetaj ile karıştırılmıştır. Bu kolondan 50 µL ortam bir sonraki 3. kolona (B3-G3) aktarılmıştır. Bu işlem 9. kolon (B9-G9) dahil olmak üzere her bir aşamada pipet ucu değiştirilerek tekrarlanmıştır. 9. kolondan sonra ise 50 µL'lik ortam dışarı atılmıştır (Şekil 3.2, A). Kolon 10 (B10-G10) virüs kontrolü (VC) olması için boş bırakılmıştır, 11. kolon (B11-G11) ise hücre kontrolü (CC) olarak 100 µL daha ortam besiyeri eklenmiştir. İlk olarak besiyeri ile buluşturulan plak kenarları ise test sonuçlarının kesinliğini etkileyebileceğinden kullanılmamıştır (Şekil 3.1) (Sun ve diğerleri, 2017).

Hazırlanan MOI [Multiplicity of infection; Enfeksiyon çarpanı (virüs sayısı: hücre sayısı)] 1:100, 1:1000, 1:10000 HRV- 14 suşları ile aşağıda gösterilen şekilde enfekte edilmiştir (Şekil 3.2, B). Elde edilen plakalar 35°C'de 3-4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre boyunca VC kuyucuklarında virüs kaynaklı kesin bir sitopatik etki (SPE)'nin Resim 3.1'de olduğu gibi mikroskopla gözlemlenmesi ile inkübasyon süresi sonlandırılmıştır (Lacroix, Querol-Audí, Roche, Franco, Froeyen, Guerra, Terme, Vanelle, Verdaguer, Neyts ve Leyssen, 2014).



Şekil 3.2. İş akışının tek kuyucuk ifadesi (Sun ve diğerleri, 2017)

Hücre kontrolü (CC)	Virüs kontrolü (VC)
	

Resim 3.1. Hücre kontrol kuyucuklarındaki (CC) (soldaki resim) ve virüs kontrol kuyucuklarındaki (VC) (sağdaki resim) HeLa Rh hücreleri

3.2.4. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) analizi

Potansiyel antiviral bileşikleri değerlendirmek için MTS tabanlı SPE redüksiyon testi tekrarlanabilirliği yüksek ve yaygın olarak tercih edilen bir metottur. Çalışmada kullanılan bileşik CIM212240, HRV- 14 replikasyonunu önlediğinde, virüs kaynaklı SPE azaltılmış ya da sonlanmıştır. Böylelikle viral etkiden korunan ve canlılığını devam ettiren HeLa Rh hücreleri metabolik aktiviteleri ile sarı tetrazolyum tuzunu (MTS) kahverengi renkli bir formazan ürününe dönüştürür (Sun ve diğerleri, 2017). Bu tez çalışmasında da, inkübasyonu sonlandırılan plakların MTS analizi yapılarak hücre canlılıkları tespit edilmiş ve renk değişiminin sağlandığı kolorimetrik veri, antiviral etkinliğin değerlendirmesini sağlamıştır. Bu amaçla, öncelikle Şekil 3.1'de tasarlanan plakaların kolon 2-11'deki tüm kuyucuklarından ortam besiyeri aspire edilmiştir. Ardından, önceden hazırlanan MTS çözeltisi %5 oranında fenol kırmızısı içermeyen (Minimum Eagle's Medium) MEM ile karıştırılmış ve içte yer alan 60 kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. 35°C'de 40-60 dakikalık bir inkübasyon sonrası, her kuyucuğun optik yoğunluğu (OD) 498 nm'de mikroplaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca, her bir bileşik konsatrasyonun oluşturduğu hücre morfolojisi, bileşik maruziyetine bağlı olarak mikroskobik olarak skorlanmıştır (Van Dycke, Rymenants, Neyts ve Rocha-Pereira, 2021).

Antiviral aktivite ve EC_{50} hesaplaması

MTS analizi sonucu elde edilen optik yoğunluk değerleri, kontrol yüzdelerine dönüştürülmüş ve SPE azalma yüzdeleri hesaplanmıştır. Her bir bileşik derişimi için virüs kaynaklı SPE'ye karşı %50 koruyucu etkiliği ifade eden %50 etkinlik derişimi (EC_{50}) aşağıda gösterildiği şekilde logaritmik interpolasyon yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Sun ve diğerleri, 2017). Ayrıca, her bir bileşik konsatrasyonun oluşturduğu hücre morfolojisi, bileşik maruziyetine bağlı olarak mikroskobik olarak da değerlendirilmiştir.

% Antiviral aktivite = $(OD_{HRV14+Bileşik} – OD_{VC})/(OD_{CC} - OD_{VC}) \times 100$

$OD_{VC:}$ Virüs kontrolünün (kolon 10) optik yoğunluğunun ortalama değeri

OD_{CC}: Hücre kontrolünün (kolon 11) optik yoğunluğunun ortalama değeri

$OD_{HRV14+Bileşik}$: Virüs ile enfekte ve bileşikle tedavi edilen her kuyunun optik yoğunluk değeri

$EC_{50}=10^{((Log(A) – Log(B)) \times ((C - 50)/(C - D)) + Log(B))}$

A: Yüzdelik antiviral aktivitenin < %50 olduğu bileşik derişimi

B: Yüzdelik antiviral aktivitenin > %50 olduğu bileşik derişimi

C: Antiviral aktivite yüzdesi değeri > %50

D: Antiviral aktivite yüzdesi değeri < %50

3.2.5. Beş aşamalı klonal seçim prosedürü

CIM212240 bileşiğine dirençli HRV-14 varyantlarını elde etmek için beş aşamalı bir klonal seçim prosedürü gerçekleştirilmiştir. İlk adımda, 0,023–50 μM aralığında değişen bileşik derişimleri viral yükü $1x10^{-2}$, $1x10^{-3}$ ve 1×10^{-4} MOI [Multiplicity of infection; Enfeksiyon oranı (virüs sayısı: hücre sayısı)] olan bir SPE redüksiyon testi kullanılarak en düşük CIM212240 bileşik derişiminde ve virüs kaynaklı sitopatik etkinin (SPE) %100

gözlemlenebildiği virüs derişimleri saptanmıştır. İkinci adımda, saptanmış viral miktar (1:10000 MOI) benzer şekilde bileşik derişimi 0,2 ve 1 µM olacak şekilde iki farklı 96 kuyucuklu plaka üzerinde kokültüre edilmiştir. 35°C'de 3 gün sonra, yalnızca tam SPE'ye sahip kuyucuklardan ve VC'lerinden süpernatant toplanmıştır. 3. adımda ise, bileşiğe dirençli olduğu düşünülen ve toplanan virüs izolatları, 0,2 µM ve 1 µM CIM212240 bileşiği varlığında benzer üreme şartları sağlanarak titre edilmiştir. İnokülasyondan sonra her gün gözlenen plaklarda önemli SPE gösteren en yüksek virüs titresi seçilerek süpernatant ayrıştırılmıştır. Böylece, saflaştırılmış/zenginleştirilmiş bileşiğe dirençli olduğu varsayılan virüs popülasyonu elde edilmiştir. Adım 3'de her bir derişimden seçilen 2 virüs izolatı, yeterli miktarda referans stoğunun üretilmesi için tekrar 0,2 µM ve 1 µM CIM212240 bileşiği varlığında 25 cm^2 flasklarda çoğaltılmıştır. Son adımda, izolatlar bir gün önce $1x10^4$ hücre yoğunluğunda hazırlanan plaklar kullanılarak virüs kontrolüne paralel 1/10 oranında titre edilmiştir ve inokülasyon sonrası 3. günde mikroskobik olarak gözlemlenmiştir. Skorlandırmada, 1; yoğun SPE, 0 ise SPE'nin gözlenmediği durum olarak ölçeklendirilmiştir (Delang, Segura Guerrero, Tas, Quérat, Pastorino, Froeyen, Dallmeier, Jochmans, Herdewijn, Bello, Snijder, de Lamballerie, Martina, Neyts, van Hemert ve Leyssen, 2014). Sonuç olarak, fenotipik olarak direnç gözlendiği kesin olarak belirlenen iki farklı izolat (P1, P4) ve virüs kültürü (VC) elde edilmişitr.

3.2.6. Çapraz direnç testi

Beş aşamalı klonal seçim prosedürü sonucu elde edilen P1, P4 ve VC izolatları, antiviral SPE redüksiyon test protokolüne benzer şekilde farklı bileşiklerin referans olarak kullanılmasıyla değerlendirilmiştir. Bu amaçla, aynı şirkete ait antirinoviral etkinliği gözlenen ve benzer moleküler yapıya sahip CIM119143 bileşiği 50 µM ve literatürde viral aktifliği kanıtlanmış Rupintrivir (Binford ve diğerleri, 2005) ise 10 µM olacak şekilde seyreltilmiştir. Bu bileşikler, bir gece önceden hazırlanan $1,5x10^4$ HeLa Rh hücresi barındıran 96 kuyucuklu plakaya yukarıda açıklanan 1:3 seri dilüsyon yöntemiyle eklenmiştir. Daha sonra plaka, 1:500 MOI P1, P4 izolatı ve 1:250 VC ile enfekte edilmiştir. Oluşturulan plaka 35°C'de 3-4 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. VC kuyucuklarında virüs kaynaklı kesin bir sitopatik etki (SPE)'nin tam olarak mikroskopta gözlemlenmesi ile

inkübasyon süresi sonlandırılmış ve MTS analizi yapılarak optik değerler saptanmıştır (Delang ve diğerleri, 2014; Lacroix ve diğerleri, 2014).

Sonuç olarak, yapılan test ve analizler sonrasında fenotipik direncin gözlendiği iki izolat (P1, P4), VC ve stok suşu genomik olarak değerlendirilmek üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Tüm çalışmalar, her antiviral test için paralel olarak iki plaka ve iki tekerrürlü derişimler olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.7. Viral RNA izolasyonu

Bu çalışmada, viral RNA manuel spin kolon metodu kullanılarak elde edilmiştir. İlk olarak, NUCLEOSPIN© RNA virus (MACHEREY-NAGEL) kitinde bulunan carrier RNA ve içerisinde %30-60 Guanidinyum Tiyosiyanat bulunan RAV1 tamponu karıştırılmıştır. Ardından, 150 µL P1, P4 ve VC izolatlarına ve 600 µL bu karışımdan eklenerek iyice vortekslenmiştir. 70°C'de 5 dakika inkübasyonla viral hücrelerde lizis gerçekleştirilmiş ve bu tüplere 600 µL %96-100 etanol (Merck) eklenerek 10-15 sn tekrar vortekslenmiştir. Hücre lizatından 700 µL, kolon içeren 2 mL'lik tüplere alınmış ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Yeni bir 2 mL'lik tüpe alınan kolonlara 500 µL %24–36 guanidinyum tiyosiyanat ve %35-55 etanol bulunduran RAW eklenerek aynı hızda 1 dakika daha santrifüjlenmiş ve aynı işlem 600 µL RAV3 tamponu ile tekrarlanmıştır. Tüp değişimi sonrası 200 µL RAV3 eklenen kolonlar 11.000 g hızda 5 dakika santrifüjlenerek yıkama işlemi tamamlanmıştır. Son olarak, 1,5 mL'lik tüplere aktarılan kolonlar önceden 70°C'ye ısıtılmış, 50 µL RNaz içermeyen H_2O ilave edilerek 1-2 dk oda sıcaklığında beklenmiş ve ardından 11.000 g'de 1 dakika santrifüjlenerek viral RNA ektrakraktı elde edilmiştir.

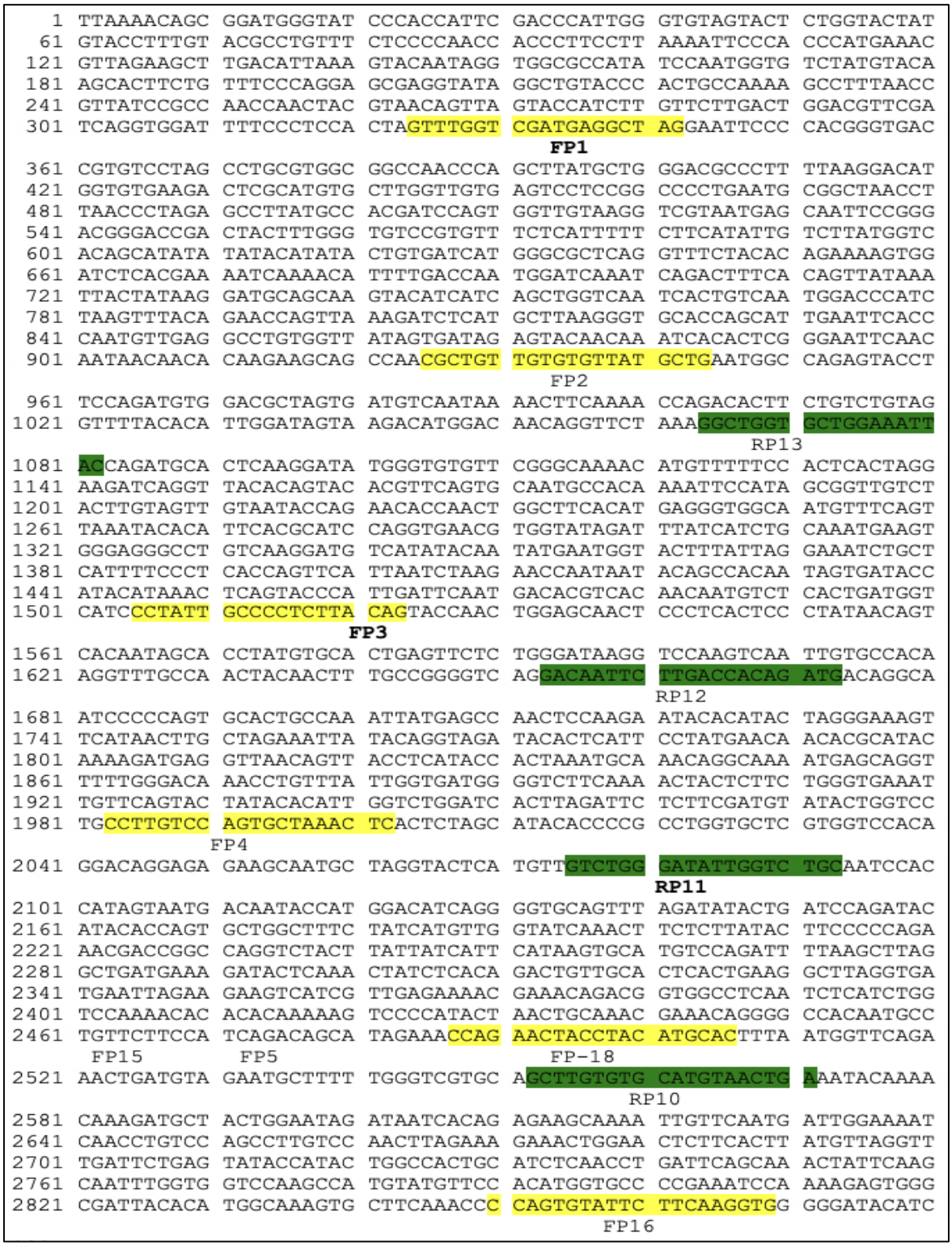
3.2.8. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

Viral RNA izolatından revers transkriptaz enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmek için One Step RT-PCR (Qiagen) kiti kullanılmıştır. Bu amaçla, NCBI referans sekansı NC_001490.1 olarak ifade edilen ve aşağıda Şekil 3.3'de gösterilen HRV-14 genomu yaklaşık 1500-2000 nükleotidden oluşan 4 hedef bölgeye ayrılmıştır (Stanway, Hughes, Mountford, Minor ve Almond, 1984). Bu gen bölgelerinin çoğaltılması

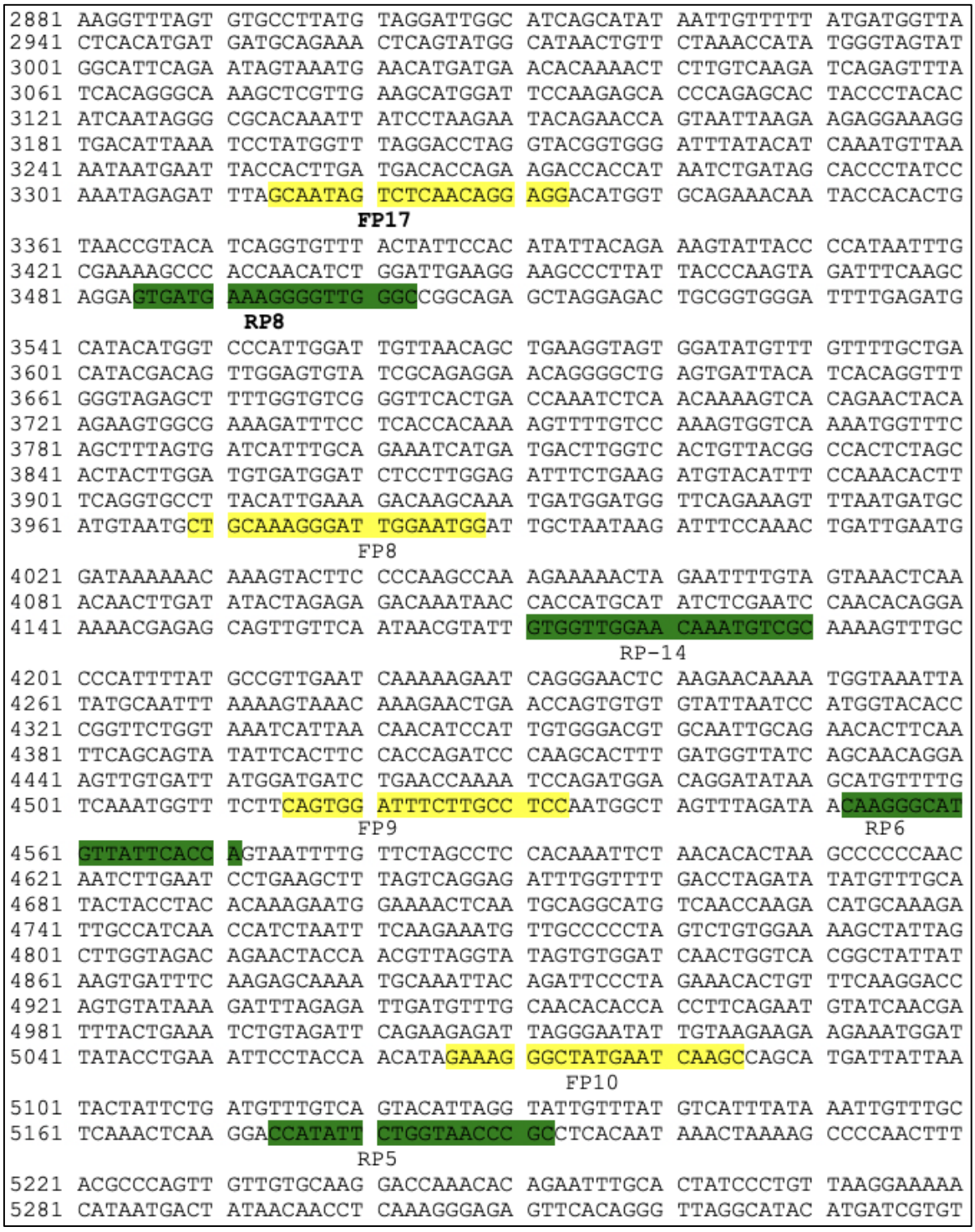
için ise 4 adet ileri primer (FP) ve geri primer (RP), ortalama GC yüzdesi yaklaşık %45-50 olacak şekilde tasarlanarak Integrated DNA Technologies (Leuven, Belgium) şirketinde sentezlenmiştir. Çizelge 3.1'de hedef bölge ve isimlendirmeleri ifade edilen liyofilize primeler, T_m değerlerine göre PCR öncesi optimize edilmiş ve 6 µM derişimde olacak şekilde sulandırılmıştır (Lacroix ve diğerleri, 2014).

Çizelge 3.1. RT-PCR için tasarlanan primer isimlendirmesi

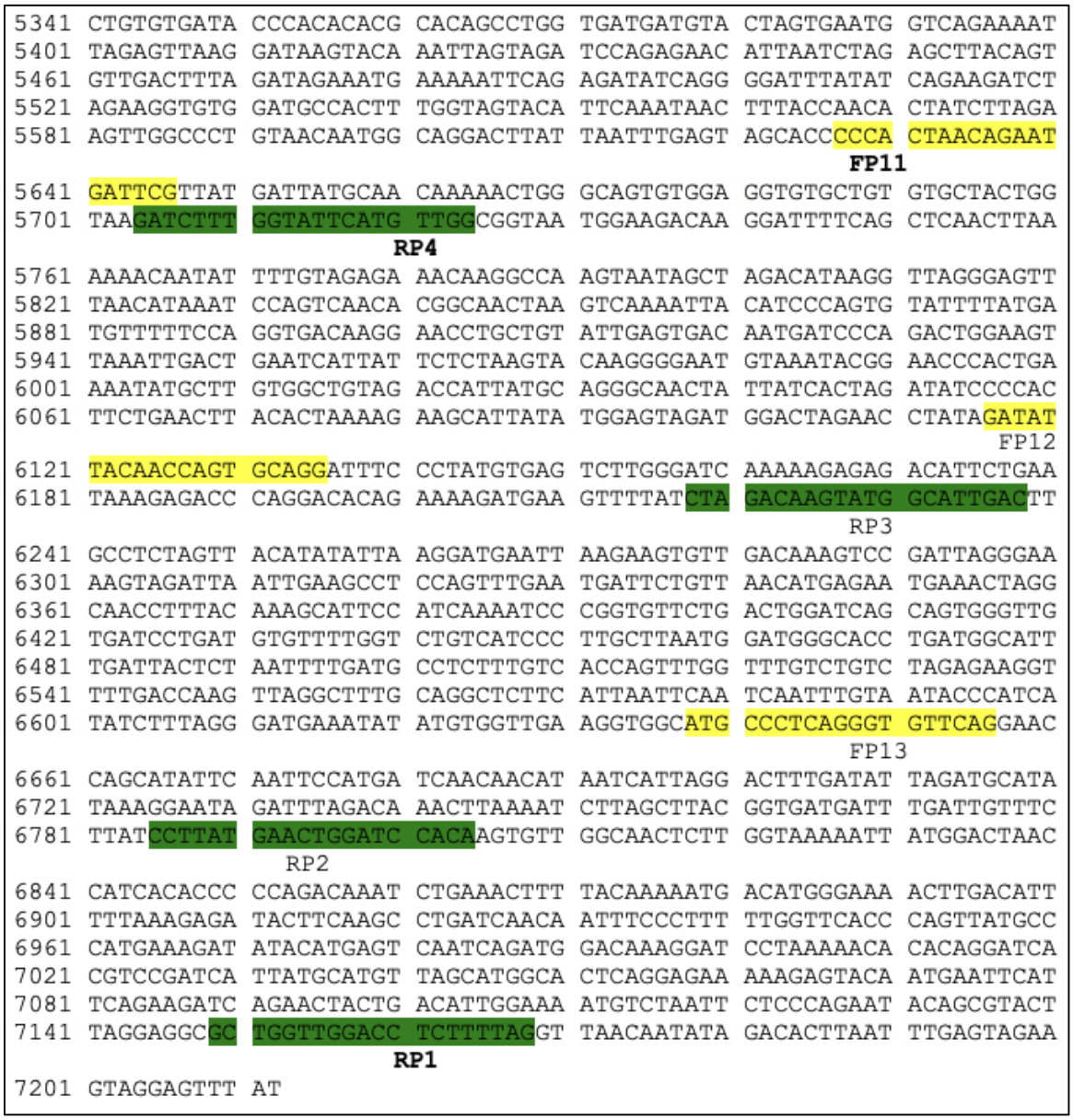
Hedef Bölgeler	İleri Primerler	Geri primerler	Ürün Büyüklüğü (Baz çifti)
Bölge 1	FP1	RP11	1769
Bölge 2	FP3	RP8	1999
Bölge 3	FP17	RP4	2410
Bölge 4	FP11	RP1	1542



Şekil 3.3. HRV- 14 tüm genomu ve primer bölgeleri (sarı ile ifade edilen diziler ileri primer; yeşil ile ifade edilen diziler geri primer bölgeleridir)



Şekil 3.3. (devam) HRV- 14 tüm genomu ve primer bölgeleri (sarı ile ifade edilen diziler ileri primer; yeşil ile ifade edilen diziler geri primer bölgeleridir)



Şekil 3.3. (devam) HRV- 14 tüm genomu ve primer bölgeleri (sarı ile ifade edilen diziler ileri primer; yeşil ile ifade edilen diziler geri primer bölgeleridir) (Stanway ve diğerleri, 1984)

PCR amplifikasyonu için gerekli olan kit içeriği reaksiyon başına toplam hacim 25 µL olacak şekilde Çizelge 3.2.'de gösterildiği miktarlar esas alınarak hazırlanmıştır. Her bir kimyasal örnek sayısı ile çarpılarak PCR için yeterli miktar oluşturulmuştur.

Çizelge 3.2. PCR kimyasal protokolü

Bileşenler	Tek örnek miktarı (µL)
Su	10
5X Tamponu	5
dNTP karışımı	1
RT-PCR enzim karışımı	1
Rnasine	0,5
RNA izolatı	2,5
FP veya RP	2,5
Toplam	25

Hazırlanan reaksiyon tüpleri için termal döngü cihazında PCR programı özel olarak dizayn edilmiştir. Başlangıç denatürasyonu, 50°C'de 30 dakika; denatürasyon 95°C'de 15 dakika ve 94°C'de 45 saniye, birleşme 55°C'de 45 saniye, uzama 72°C'de 1,5 dakika olacak şekilde 40 döngü; son uzama ise 72°C'de 10 dakika olarak ayarlanmıştır.

3.2.9. Agaroz jel elektroforezi ve görüntüleme

1 gram agaroz (Sigma) tartılarak 100 mL 1X TBE (45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA) içerisinde mikrodalga fırın yardımıyla çözdürülmüştür. Ardından 50-55°C'e kadar soğutulan çözeltiye 0,5 µg/µL etidyumbromür eklenerek tarak yerleştirilmiş elektroforez kabına dökülmüştür. Oda sıcaklığında 20-30 dakika polimerize olması beklenmiştir. Katılaşan jel taraklardan ayrılmış ve içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 3 µL PCR ürünü ve 2 µL yükleme boyası karıştırılarak jel gözeneklerine pipetlenmiştir. 75 voltta 45 dakika yürütülen jel UV ışık veren görüntüleme sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır (Albright ve Hall, 2011).

3.2.10. DNA'nın saflaştırılması

Amplifikasyon ürünlerine bağlanmayan ekstra primer ve dNTP artıklarını temizlemek için Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kiti kullanılmıştır. Kit yönergeleri doğrultusunda PCR ürünü ile aynı miktarda, içeriğinde 4,5 M guanidinyum izoiyosiyanat ve 0,5 M potasyum asetat (pH 5,0) Membrane Binding solüsyonu eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Kolon eklenmiş 2 mL'lik tüplere aktarılan karışım 1600 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir. Yeni bir 2 mL'lik tüpe alınan kolonlara 700 µL önceden etanol eklenmiş Membrane Binding solüsyonu koyulmuş aynı hızda 1 dakika daha

santrifüjlenmiştir. Aynı işlem 500 µL solüsyon ile 5 dk olacak şekilde yinelenmiştir. Ardından, etanolü uzaklaştırmak için boş bir tüpe aktarılan kolonlar santrifüj kapağı açık olacak şekilde 1 dk 16000 g'de döndürülmüştür. Son olarak, kolon steril 1,5 mL'lik tüpe aktarılmış, üzerine 50 µL nükleaz içermeyen su ilave edilerek 1 dk oda sıcaklığında beklenmiştir. Böylelikle, 1 dk 16000 g'de santrifüjlenen tüplerden kolonlar uzaklaştırılarak amplikonlardan temizlenen viral cDNA elde edilmiştir.

3.2.11. DNA dizi analizi

Dizi analizi için kalıp olarak temizlenen PCR ürünleri Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kiti kullanılarak Çizelge 3.3.'de belirtilen hacimlerde hazırlanmış ve RT-PCR primelerine ek olarak ara gen bölgelerini kapsayan ekstra sekans primerleri Çizelge 3.4 ve Şekil 3.3.'deki gibi reaksiyon tüplerine yine 6 µM derişimde eklenmiştir. Termal döngü cihazı ise Çizelge 3.5' deki sıcaklık değerleri ile ayarlanmıştır (Lacroix ve diğerleri, 2014).

Çizelge 3.3. Dizileme Kimyasal Protokolü

Bileşenler	Tek kuyucuk miktarı (µL)
Hazır reaksiyon karışımı	1
5X Tamponu	1,5
Su	1,5
FP veya RP	1
Kalıp DNA	5
Toplam	10

Çizelge 3.4. DNA Dizileme için tasarlanan primerler

Hedef Bölgeler	İleri Primerler	Geri primerler
Bölge 1	FP1-FP2	RP11-RP12-RP13
Bölge 2	FP3-FP4-FP18-FP16	RP8-RP10
Bölge 3	FP17-FP8-FP9-FP10	RP4-RP5-RP6-RP14
Bölge 4	FP11-FP12-FP13	RP2-RP3
Primer Adları	İleri Primerler 5'----------3'	
FP1	GTTTGGTCGATGAGGCTAG	
FP2	CGCTGTTGTGTGTTATGCTG	
FP3	CCTATTGCCCCTCTTACAG	
FP4	CCTTGTCCAGTGCTAAACTC	

Çizelge 3.4. (devam) DNA Dizileme için tasarlanan primerler

FP10	GAAAGGGCTATGAATCAAGC
FP11	CCCACTAACAGAATGATTCG
FP12	GATATTACAACCAGTGCAGG
FP13	ATGCCCTCAGGGTGTTCAG
FP16	CCAGTGTATTC TTCAAGGTG
FP17	GCAATAGTCTCAACAGGAGG
FP18	CCAG AACTACCTACATGCAC
Primer Adları	Geri Primerler 5’----------3’
RP1	CTAAAAGAGGTCCAACCAGC
RP2	TGTGGATCCAGTTCATAAGG
RP3	GTCAATGCCATACTTGTCTAG
RP4	CCAACATGAATACCAAAGATC
RP5	GCGGGTTACCAGAATATGG
RP6	TGGTGAATAACATGCCCTTG
RP8	GCCCAACCCCTTTCATCAC
RP10	TCAGTTACATGCACACAAGC
RP11	GCAGACCAATATCCCAGAC
RP12	CATCTGTGGTCAAGAATTGTC
RP13	GTAATTTCCAGCACCAGCC
RP14	GCGACATTTG TTCCAACCAC

Çizelge 3.5. Termal döngü cihazı protokolü

Adım	Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre
1	Aktivasyon	96	2 dk
2	Amplifikasyon (25 Döngü)	96	30 sn
		50	15 sn
		60	4 dk
3	Bekleme	4	sonsuz

Sekans PCR işlemi sonrası, fazla ddNTP’lerin ve primer artıklarının uzaklaştırılması için etanol/sodyum asetat çöktürmesi yapılmıştır. İlk olarak, kısa süre santrifüj edilen örnekler üzerine 10 µL su, 2 µL 3 M sodyum asetat ve 55 µL %100 etanol (EtOH) eklenmiş ve karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyon sonrasında ise 4°C'de 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Ardından, süpernatant 500 µL %70 EtOH ile yıkanmış ve 4°C'de 15 dakika 13000 rpm'de döndürülmüştür. Pipet yardımıyla süpernatant alınmış ve

örnekler bir saatten fazla kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen DNA 15 µL formamid içinde çözdürülmüş, 96°C'de 2 dakika santrifüj yapıldıktan sonra buz üzerinde 2 dakika denatüre edilmiştir (Lacroix ve diğerleri, 2014).

3.2.12. DNA dizi analizi değerlendirilmesi

Denatüre edilen PCR ürünleri silika temelli Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer cihazına yüklenmiş, elde edilen sonuçlar sekans yazılım programı Geneious Prime 2022.1 ile değerlendirilmiştir. Her bir izolat için ileri ve geri primerlerin kullanılmasıyla elde edilen kromotogramlarda Adenin (A) yeşil, Guanin (G) siyah, Sitozin (C) mavi ve Timin (T) kırmızı renkli pikler ile gösterilmektedir. Bu piklerin yorumlanması ile DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Cihazın pikleri hatalı okuyup okumadığının kontrolü de elektroferogramların tek tek göz ile incelenerek ve tamamlayıcı dizilerle karşılaştırılmasıyla yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Antiviral SPE redüksiyon testi

498 nm'de her bir kuyucuk, mikroplaka okuyucu ile absorbansı ölçülmüştür. Optik yoğunluk değerleri, kontrol yüzdelerine dönüştürülmüş ve %50 inhibisyon sağlayan ilaç derişimi (EC_{50}), virüs kaynaklı SPE'ye karşı %50 koruyucu etki ile sonuçlanan bileşik derişimi olarak logaritmik enterpolasyon ile hesaplanmıştır. Ek olarak, her bir bileşik koşulunun hücre ve tek tabakalı morfolojisi, küçük SPE işaretleri veya bileşiğin neden olduğu olumsuz etkiler için mikroskobik olarak değerlendirilmiştir.

1:100 ve 1:1000 MOI viral enfeksiyonda aynı bileşik derişimlerinde mikroskobik olarak benzer sitopatik etkiler gözlenmesine rağmen hücre canlılığındaki değişkenlikten ötürü EC_{50} değerleri farklılık göstermiştir. 1:100 MOI viral titrede EC_{50} 0,71 µM olurken, 1:1000 MOI'de 0,40 µM olarak bulunmuştur. Bu değer 1:10000 MOI de ise <0,023 olup bileşik kaynaklı en güçlü inhibisyonu ortaya koymuştur. Bileşiğin antiviral etkinliğinin en yüksek, sitopatik etkinin en düşük olduğu viral titre ise 1:10000 MOI olarak tespit edilmiştir.

Enfeksiyon oranı azalmasına paralel olarak aynı derişimde bileşik etkinliğinde artış görülmüştür; ancak bu deneysel değişkenlik ve bileşik stabilitesi sebebiyle kuyucuk bazında tam bir korelasyon göstermemektedir.

Çizelge 4.1. Antiviral SPE redüksiyon testi sonrası MTS okumaları, kontrol yüzde ifadesi ve EC_{50} değerleri

		MTS okumaları (OD)									
	CIM212240(µM)	50	16,66667	5,555556	1,851852	0,617284	0,205761	0,068587	0,022862	VC	CC
Enfeksiyon oranı(MOI)	1/100	0,21999	0,85311	0,85724	0,20929	0,18976	0,81721	0,24937	0,22799	0,12985	0,90987
		0,40307	0,86291	0,82637	0,74329	0,21044	0,87349	0,28756	0,19293	0,13286	0,94089
	1/1000	0,36874	0,87794	0,93331	0,88756	0,93406	0,95314	0,25133	0,21389	0,1482	0,94497
		0,27844	0,88952	0,4771	0,91881	0,9353	0,92891	0,43599	0,67654	0,13555	0,85256
	1/10 000	0,47333	0,91112	0,90307	0,91536	0,90551	0,89932	0,9253	0,92906	0,14011	0,88463
		0,19412	0,93262	0,93274	0,92827	0,93605	0,92405	0,91204	0,9041	0,13153	0,95618

		Kontrol yüzdelerine dönüştürülen değerler										
	CIM212240(µM)	50	16,667	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	EC50 (µM)
Enfeksiyon oranı(MOI)	1/100	11	92	93	9	7	87	15	12	-1	99	0,71 ± 0,20
		34	93	89	78	10	95	19	7	0	103	
	1/1000	30	95	102	96	102	105	15	10	2	104	0,40 ± 0,01
		18	97	44	101	103	102	38	69	0	92	
	1/10 000	43	100	98	100	99	98	101	102	0	96	<0,023
		7	102	102	102	103	101	100	99	-1	105	

4.2. Beş Aşamalı Klonal Seçim Prosedürü ile Varyantların Eldesi

4.2.1. Adım 1

En düşük CIM212240 derişimini ve virüs kaynaklı sitopatik etkinin (SPE) %100 gözlemlenebildiği en yüksek virüs miktarını belirlemek için bir farklı MOI (1:10000, 1:1000, 1:100) HRV- 14 antiviral deneyi yapılmıştır. İnokülasyondan sonraki 3. günde, plak mikroskobik olarak kontrol edilip Çizelge 4.2.'deki gibi skorlanmıştır. Bu skorlandırmada ise CC kuyucuklarında olan yoğun hücre varlığı 0, VC kuyucuklarında gözlenen etkin viral hücre deformasyonu 5 olacak şekilde bir skala oluşturularak değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuk bu kıyaslama ile tek tek gözlemlenerek kaydedilmiş ve MTS okumaları ile nicelik kazandırılmıştır (Çizelge 4.2.).

İlk adım sonrası, CIM212240 bileşiğinin enfeksiyon oranına bağlı antiviral aktivitesi gözlemlenmiştir. Yeşil renk ile ifade edilen değerler virüs kaynaklı SPE etkinin %100 inhibisyonunu, kırmızı ise aktif SPE varlığına işaret etmektedir.

Enfeksiyon oranının 10 kat azaltılması ile bileşik etkinliğinde azalma görülmüştür; ancak bu kuyucuk bazında canlı metabolizmasındaki değişkenlik ve bileşik stabilitesinden ötürü sistematik bir düşüş olmamıştır. Buna rağmen, 1:10000 dilüsyonunda bileşik derişimine paralel şekilde azalma olması yanında yoğun bir hücre canlılığı görülmüştür. Bu ise bileşiğe karşı gelişen direncin sinyali olarak nitelenmiştir.

Sonuçta, yapılan değerlendirmeler ışığında Adım 2 için 1 µg/mL ve 0,2 µg/mL bileşik derişimi ile 1/10000 virüs dilüsyonu seçilmesine karar verilmiştir. Çizelge 4.3.'de sarı ile çerçevelenen kuyucuklar bu değerlendirmede etkin rol oynamıştır.

Çizelge 4.2. 1. adım MTS sonuçları

		MTS okumaları(OD)									
	CIM212240(µM)	50	16,66667	5,555556	1,851852	0,617284	0,205761	0,068587	0,022862	VC	CC
Enfeksiyon oranı(MOI)	1/100	0,90324	0,21788	0,2949	0,18438	0,29332	0,16695	0,20288	0,16072	0,19028	0,95336
		0,83991	0,83526	0,66428	0,1745	0,26274	0,20911	0,20993	0,1719	0,17815	0,93304
	1/1000	0,8728	0,87413	0,68066	0,89858	0,26813	0,32557	0,23694	0,19651	0,20555	0,94695
		0,88263	0,43854	0,78637	0,21534	0,24974	0,30187	0,19183	0,74759	0,20619	0,97644
	1/10 000	0,86153	0,82219	0,76367	0,78931	0,74648	0,76194	0,39714	0,20944	0,17855	0,98922
		0,82378	0,80886	0,75488	0,74529	0,72769	0,67807	0,33758	0,199	0,17862	0,98429

Çizelge 4.3. 1.adım sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 5 = VC)

		Mikroskobik Skorlandırma									
	CIM212240(µM)	50	16,66667	5,555556	1,851852	0,617284	0,205761	0,068587	0,022862	VC	CC
Enfeksiyon oranı(MOI)	1/100	0	5	4	5	4	5	5	5	5	0
		0	0	0	5	4	5	5	5	5	0
	1/1000	0	0	0	0	5	5	5	5	5	0
		0	0	0	5	5	5	5	5	5	0
	1/10 000	0	0	0	0	0	0	2	5	5	0
		0	0	0	0	0	0	2	5	5	0

4.2.2. Adım 2

Bir 96 kuyucuklu plak üzerinde sırasıyla 54 özdeş kuyucuk oluşturmak için 1. adımda seçilen virüs derişimi ve bileşik derişimi kokültüre edilmiştir. Tüm kuyucuklar, SPE gelişimi için günlük olarak izlenmiş 0,2 µg/mL bileşik derişimli olan plaklar enfeksiyondan sonraki 4. günde, 1 µg/mL bileşik derişimli ise enfeksiyondan sonraki 6. günde, sarı ile çerçevelenen kuyucuklarda dirençli oldukları varsayılarak toplanmıştır. Her bir plaktan virüs izolatları ile virüs kültürleri (VC)'de alınarak sonraki analizlerde paralel bir şekilde çalışılmıştır (Çizelge 4.4, Çizelge 4.5). Yeşil ile ifade edilen tüm kuyucuklarda virüsün indüklediği SPE'nin %100 inhibe olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, enfeksiyon oranları sabit olan hücrelerde bileşik derişimi artışı SPE'de azalmaya sebebiyet vererek bileşiğin rinoviral etkinliğini ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.4. 2. adım MTS sonuçları

	CIM 212240									CC/VC
Enfeksiyon oranı (MOI): 1/10000 Konsantrasyon: 0,2 µg/mL	0,8139	0,78971	0,79206	0,87299	0,84524	0,84799	0,91448	0,49933	0,89874	0,8354
	0,75241	0,79553	0,74918	0,78214	0,84258	0,82049	0,8296	0,88839	0,90654	0,7585
	0,88377	0,76564	0,74375	0,78552	0,82921	0,883	0,91171	0,81702	0,90891	0,76255
	0,87836	0,75896	0,70767	0,70226	0,75036	0,77795	0,90135	0,75002	0,91978	0,2239
	0,84145	0,73535	0,73719	0,74596	0,73911	0,78899	0,85907	0,93957	0,89294	0,12964
	0,7899	0,72781	0,72502	0,75331	0,16361	0,72492	0,84148	0,83962	0,85819	0,20051

Çizelge 4.5. 2. adım MTS sonuçları

	CIM 212240									CC/VC
Enfeksiyon oranı (MOI): 1/10000 Konsantrasyon: 1 µg/mL	0,94754	0,87457	0,83483	0,7603	0,87203	0,83826	0,78791	0,80344	0,83024	0,85028
	0,89377	0,88802	0,88669	0,7734	0,81814	0,8468	0,8613	0,84681	0,819	0,78679
	0,88257	0,85884	0,87184	0,87755	0,85331	0,83316	0,84419	0,84461	0,14722	0,78463
	0,91174	0,83848	0,77362	0,68203	0,68036	0,77183	0,72446	0,74966	0,74154	0,17316
	0,90548	0,80313	0,74268	0,74833	0,81368	0,75452	0,72468	0,81432	0,77757	0,13941
	0,80416	0,69561	0,69081	0,64887	0,6292	0,65397	0,68247	0,685	0,68188	0,16446

4.2.3. Adım 3

İkinci adımda seçilen virus izolatları ve virus kültürü (VC), kendi başlangıç derişimlerinde olacak şekilde 0,2 ve 1 µM CIM212240 bileşik varlığında aynı virus titrasyonuna tabi tutulmuştur. İnokülasyondan 3 gün sonra önemli SPE gösteren en yüksek virus titresi seçilerek ayrıştırılmıştır. Böylece, saflaştırılmış/zenginleştirilmiş bileşiğe dirençli olduğu varsayılan virus popülasyonları elde edilmiştir. Mikroskobik olarak kuyucuk başına skorlandırılan plaklar hücre kültürü 0, virus kültürü ise 1 olacak şekilde SPE değerlendirmesine tabi tutulmuştur. Çizelge 4,6'da sarı ile çerçevelenen kuyucuklardan elde edilen virus populasyonları P1, P2 ve Çizelge 4.7' de sarı çerçeveli kuyucuklar ise P3, P4 izolatları olarak isimlendirilmiştir.

Çizelge 4.6. 0,2 µM CIM212240 bileşik varlığında virus titrasyonu sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 1= VC)

		--> 1/5 -->									CC
1. İzolat	+Bileşik	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
		1	1	1	1	1	1	1	0,25	0,25	0
		1	1	1	1	1	1	1	0	0,25	0
		1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
	-Bileşik	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
		--> 1/5 -->									CC
1. VC	-Bileşik	1	1	1	1	1	0,5	0	0	0	0
		1	1	1	1	1	0,5	0	0	0	0
		1	1	1	1	1	0,5	0	0	0	0
		1	1	1	1	1	0,5	0	0	0	0
	+ Bileşik	0,75	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0

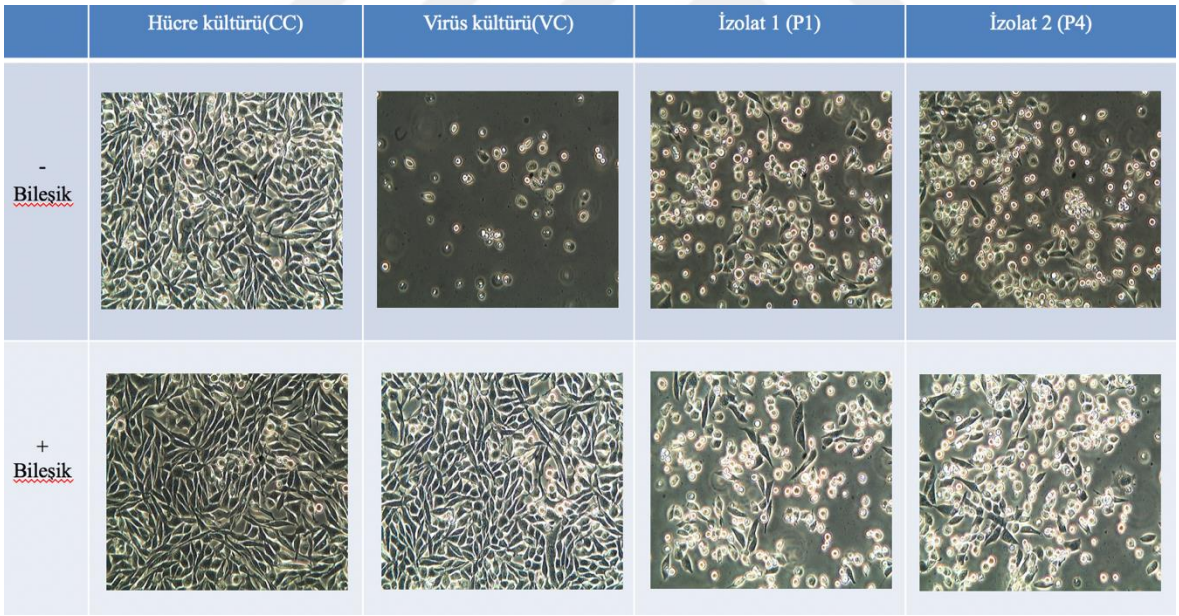
Çizelge 4.7. 1 µM CIM212240 bileşik varlığında virus titrasyonu sonrası mikroskobik değerlendirme (0 = CC, 1= VC)

		--> 1/5 -->									CC
2. İzolat	+Bileşik	1	1	1	1	1	0,75	0,75	0	0	0
		1	1	1	1	1	1	0,75	0	0	0
		1	1	1	1	1	0,75	0	0	0	0
		1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
	-Bileşik	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
		--> 1/5 -->									CC
2.VC	-Bileşik	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	0	0,25	0,25	0	0	0	0	0	0
		1	0,5	0,5	0,25	0	0	0	0	0	0
		1	1	0,75	0	0	0	0	0	0	0
	+ Bileşik	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4.2.4. Adım 4

Adım 3'de seçilen 2 virüs izolatı (P1, P2) ve virüs kontrolü 0,2 µM CIM212240 bileşik varlığında ve diğer 2 virüs izolatı (P3, P4) ve VC'ü 1 µM CIM212240 bileşik derişiminde sonraki deneylerde kullanılmak üzere yeterince büyük miktarda bileşiğe dirençli virüs eldesi için 25 cm^2 flasklarda kültüre edilmiştir. Flasklardan mikroskobik görüntüler alınmış (Resim 4.1), bileşik varlığında ve yokluğunda sitopatik etki (SPE) değerlendirilmesi yapılmıştır (Çizelge 4.8). Bileşik varlığına rağmen virüs kaynaklı hücre ölümünün inhibe edilmesi izolatların bileşiğe karşı direnç geliştirdiğini fenotipik olarak doğrulamaktadır.

Flasklarda bileşik varlığına rağmen %100 sitopatik etkinliğe sahip iki izolat olan P1 ve P4 yakinen ilk günden itibaren takip edilmiş ve mikroskobik görüntü alınmıştır (Resim 4.1). P2 ve P3 izolatlarında ise görülen zayıf SPE yaklaşık olarak değerlendirilmiş ve ileri çalışmalara dahil edilmemiştir.



Resim 4.1. Enfeksiyondan (MOI: 0,0001) birinci gün sonrası inverted mikroskop görüntüsü

Çizelge 4.8. Enfeksiyondan (MOI: 0,0001) 3 gün sonra SPE değerlenmesi

	CC		VC		P1		P2		P3		P4	
	- Bileşik	+ Bileşik	- Bileşik	+ Bileşik	- Bileşik	+ Bileşik	- Bileşik	+ Bileşik	- Bileşik	+ Bileşik	- Bileşik	+ Bileşik
Enfeksiyon 3. gün	0	0	%100 CPE	0	%100 CPE	%100 CPE	%100 CPE	%80 CPE	%100 CPE	%60 CPE	%100 CPE	%100 CPE

4.2.5. Adım 5

Son olarak, CIM212240'ın antiviral aktivitesi, fenotipik direnci doğrulamak için bileşiğe dirençli olduğu varsayılan iki izolat (P1, P4) ve VC'ü virüs referans stoğuna paralel olacak şekilde farklı viral enfeksiyon oranlarında ilk adımla benzer şekilde değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9). P1 ve P4 izolatlara ait plaklarda 0,01, 0,0001 ve 0,00001 MOI enfeksiyon oranlarında %100 virüs kaynaklı sitopatik etki bileşik varlığına rağmen neredeyse her kuyucukta gözlenmiştir. Bu kırmızı ile ifade edilen kuyucuklardaki canlı hücre ölümü virüsün bileşik direnci geliştirmesini kanıtlar niteliktedir. Ayrıca, izolatlarla beraber değerlendirilen virüs kontrolünde aynı şartlarda SPE redüksiyon testine yakın (EC_{50}=0,71) olan 0,78 değeri hesaplanmıştır. Sonuçta, virüsün bileşik varlığından etkilenerek direnç mekanizması oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca aralarında 10 kat değişkenlik bulunan enfeksiyon oranlarına rağmen elde edilen izolatlarda bileşiğe ait anlamlı bir antirinoviral etkinlik (EC_{50}> 50) gözlemlenmemiştir.

Çizelge 4.9. 5.adım sonrası MTS okumaları, kontrol yüzde ifadesi ve EC_{50} değerleri

		MTS okumaları(OD)									Kontrol yüzdelerine dönüştürülen optik değerler									EC50
	CIM212240 (µM)	50	16,667	5,5556	1,8519	0,6173	0,2058	0,0686	0,0229	VC	CC	50	16,67	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	
VC	1/100	0,978	0,907	0,939	0,866	0,213	0,192	0,163	0,174	0,169	1,075	94	86	90	81	5	2	-1	0	0	106	1,42 ± 0,34
		1,003	0,976	0,960	0,645	0,199	0,185	0,171	0,164	0,171	0,971	97	94	92	55	3	2	0	-1	0	94	
	1/1000	0,922	1,052	1,122	0,893	0,659	0,250	0,173	0,165	0,184	1,040	88	103	111	85	57	9	0	-1	1	102	0,52 ± 0,01
		1,070	1,013	1,071	1,116	0,672	0,247	0,182	0,172	0,170	1,057	105	99	105	111	59	9	1	0	0	104	
	1/10 000	1,093	1,175	1,107	1,126	1,080	0,843	0,201	0,313	0,172	0,981	108	117	110	112	106	79	3	17	0	95	0,13 ± 0,01
		1,068	1,027	0,981	0,961	1,045	0,969	0,197	0,173	0,164	1,026	105	100	95	92	102	93	3	0	-1	100	
		50	16,667	5,5556	1,8519	0,6173	0,2058	0,0686	0,0229	VC	CC	50	16,67	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	
VC stok	1/1000	0,930	0,977	1,058	0,904	0,605	0,180	0,174	0,165	0,150	1,051	95	101	111	92	56	5	4	3	1	110	0,78 ± 0,33
		1,074	0,923	0,974	0,932	0,240	0,171	0,149	0,153	0,140	1,004	113	95	101	96	12	3	1	1	0	104	
	1/1000	0,934	1,020	1,101	1,103	1,009	0,193	0,179	0,162	0,141	0,901	96	106	116	116	105	6	4	2	0	92	0,32 ± 0,02
		0,986	1,168	0,961	1,168	1,015	0,284	0,177	0,166	0,138	0,937	102	124	99	124	106	17	4	3	0	96	
	1/10 000	0,968	1,050	1,016	0,982	0,957	0,973	1,123	0,837	0,192	0,934	100	110	106	102	99	101	119	84	6	96	0,04
		1,008	1,063	1,077	0,926	0,919	0,947	0,991	0,229	0,306	0,981	105	112	113	95	94	97	103	10	20	102	
		50	16,667	5,5556	1,8519	0,6173	0,2058	0,0686	0,0229	VC	CC	50	16,67	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	
P1 izolatı	1/100	0,191	0,186	0,177	0,187	0,192	0,200	0,196	0,202	0,181	1,058	2	1	0	1	2	3	2	3	1	101	> 50
		0,182	0,175	0,172	0,169	0,171	0,181	0,177	0,171	0,168	1,043	1	0	0	-1	0	1	0	-1	-1	99	
	1/1000	0,313	0,182	0,183	0,180	0,176	0,187	0,175	0,165	0,176	1,129	16	1	1	0	0	1	0	-1	0	109	>50
		0,262	0,181	0,185	0,184	0,183	0,191	0,174	0,166	0,166	1,019	10	1	1	1	1	2	0	-1	-1	97	
	1/10 000	0,457	0,206	0,202	0,204	0,196	0,204	0,192	0,185	0,184	1,027	32	3	3	3	2	3	2	1	1	98	> 50
		0,343	0,197	0,202	0,203	0,182	0,196	0,182	0,170	0,179	1,011	19	2	3	3	1	2	1	-1	0	96	
		50	16,667	5,5556	1,8519	0,6173	0,2058	0,0686	0,0229	VC	CC	50	16,67	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	
P4 izolatı	1/100	0,156	0,146	0,141	0,151	0,137	0,149	0,142	0,147	0,139	0,880	2	1	0	2	0	1	0	1	0	108	> 50
		0,142	0,141	0,141	0,146	0,135	0,145	0,138	0,141	0,133	0,786	0	0	0	1	-1	1	0	0	-1	94	
	1/1000	0,181	0,144	0,140	0,159	0,144	0,152	0,154	0,138	0,134	0,827	6	1	0	3	1	2	2	0	-1	100	> 50
		0,229	0,128	0,150	0,150	0,137	0,159	0,148	0,151	0,147	0,823	13	-2	2	2	0	3	1	2	1	100	
	1/10 000	0,598	0,197	0,157	0,165	0,166	0,172	0,161	0,152	0,156	0,810	67	8	3	4	4	5	3	2	2	98	36,99 ± 1,21
		0,630	0,143	0,147	0,155	0,147	0,156	0,145	0,147	0,126	0,833	71	0	1	2	1	2	1	1	-2	101	

4.3. Çapraz Direnç Testi

CIM212240'ın antiviral aktivitesi, fenotipik direnci doğrulamak için bileşiğe dirençli olduğu varsayılan virus izolatları, referans bileşikler CIM119143 ve Rupintrivir varlığında farklı derişimlerde kültüre edilmiştir (Çizelge 4.10). İnokülasyonun 4. gününde virüs kültürlerinde görülen tam SPE sonrasında plaklar MTS analizi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen optik değerler daha sonra kontrol yüzdelerine çevrilerek EC_{50} hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

Elde edilen iki izolat enfeksiyon oranları (MOI) 20 kat arttırılarak aynı miktarda CIM212240 ve CIM119143 bileşik derişimine maruz bırakılmıştır. Benzer moleküler yapıya sahip bu iki bileşik beklendiği üzere dirence bağlı yüksek EC_{50} değerleri göstermişlerdir. Aynı zamanda izolatlar referans bileşik olan rupintrivir ile daha düşük bir başlangıç derişimi ile (10 µM) titre edilmiştir. Rupintirivir derişimindeki anlamlı farka rağmen EC_{50} değerleri 0,16 ve 0,11 olarak saptanmış ve izolatlarda herhangi bir dirence bağlı %100 SPE inhibisyonu gerçekleşmemiştir. Rupintrivir'in hem iki izolat hem de VC ile çalışılması sonucunda ise benzer EC_{50} değerleri olan 0,16, 0,11 ve 0,12 elde edilmiştir. CIM212240 bileşiğinin stok virüs (VC) üzerindeki %50 etkili derişimi ise <0,023'tür ve antiviral SPE redüksiyon testi ile örtüşmektedir.

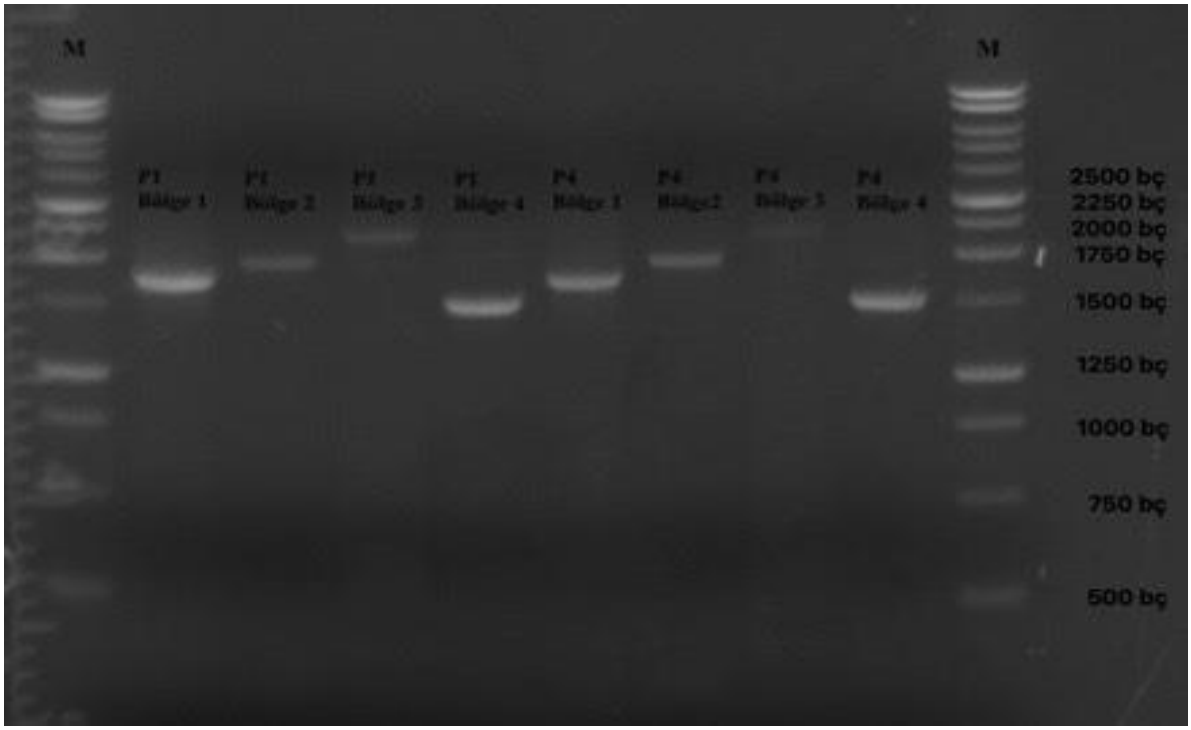
		MTS okumaları (OD)									
		50	16,667	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC
P1, 1/500	CIM119143 (50µM)	0,31336	0,20705	0,15743	0,1926	0,1907	0,17938	0,18344	0,19008	0,1728	0,89992
		0,28708	0,14609	0,13742	0,15413	0,17411	0,17007	0,21055	0,19611	0,18749	0,85672
	CIM 212240 (50µM)	0,77363	0,40102	0,2647	0,23016	0,27619	0,21747	0,24571	0,21396	0,19666	0,87985
		0,77798	0,34779	0,2681	0,20896	0,18643	0,18325	0,20513	0,16569	0,21172	0,85263
	Rupintrivir (10µM)	0,82769	0,85212	0,79681	0,80851	0,76806	0,85165	0,25376	0,18179	0,1952	0,83985
		0,80143	0,81013	0,7894	0,81278	0,79988	0,82354	0,23339	0,19726	0,20387	0,78444
									Ortalama	0,195	0,852
P4, 1/500	CIM119143 (50µM)	0,29188	0,19676	0,17221	0,18628	0,16852	0,17212	0,14796	0,17933	0,14617	0,7759
		0,28818	0,1774	0,19092	0,18286	0,16219	0,13339	0,15362	0,22129	0,17685	0,74623
	CIM 212240 (50µM)	0,78298	0,52227	0,24328	0,23179	0,19269	0,17032	0,16963	0,20749	0,17654	0,75903
		0,78618	0,47826	0,24032	0,22793	0,16773	0,13904	0,19145	0,16363	0,17261	0,72727
	Rupintrivir (10µM)	0,81274	0,76143	0,74465	0,75025	0,78009	0,83691	0,21808	0,1912	0,14873	0,74911
		0,73209	0,7005	0,696	0,68552	0,70301	0,71498	0,20036	0,18702	0,16051	0,74402
									Ortalama	0,164	0,750
VC, 1/250	CIM119143 (50µM)	0,93996	0,94325	0,84985	0,53829	0,25662	0,23101	0,21311	0,19179	0,20296	0,83607
		0,9335	0,89486	0,44052	0,52955	0,26606	0,26648	0,23104	0,23302	0,19349	0,81293
	CIM 212240 (50µM)	0,70491	0,88282	0,89055	0,87622	0,86095	0,83121	0,88992	0,86124	0,23644	0,82214
		0,84331	0,88423	0,68476	0,66168	0,50892	0,81931	0,83836	0,85203	0,20175	0,82175
	Rupintrivir (10µM)	0,86002	0,86517	0,81286	0,87535	0,87421	0,84556	0,22603	0,23084	0,17928	0,80952
		0,84731	0,81508	0,78159	0,80414	0,85016	0,79082	0,21376	0,24349	0,17316	0,7892
									Ortalama	0,198	0,815

Çizelge 4.11. Çapraz direnç testinin kontrol yüzdelik ifadesi ve EC_{50} değerleri

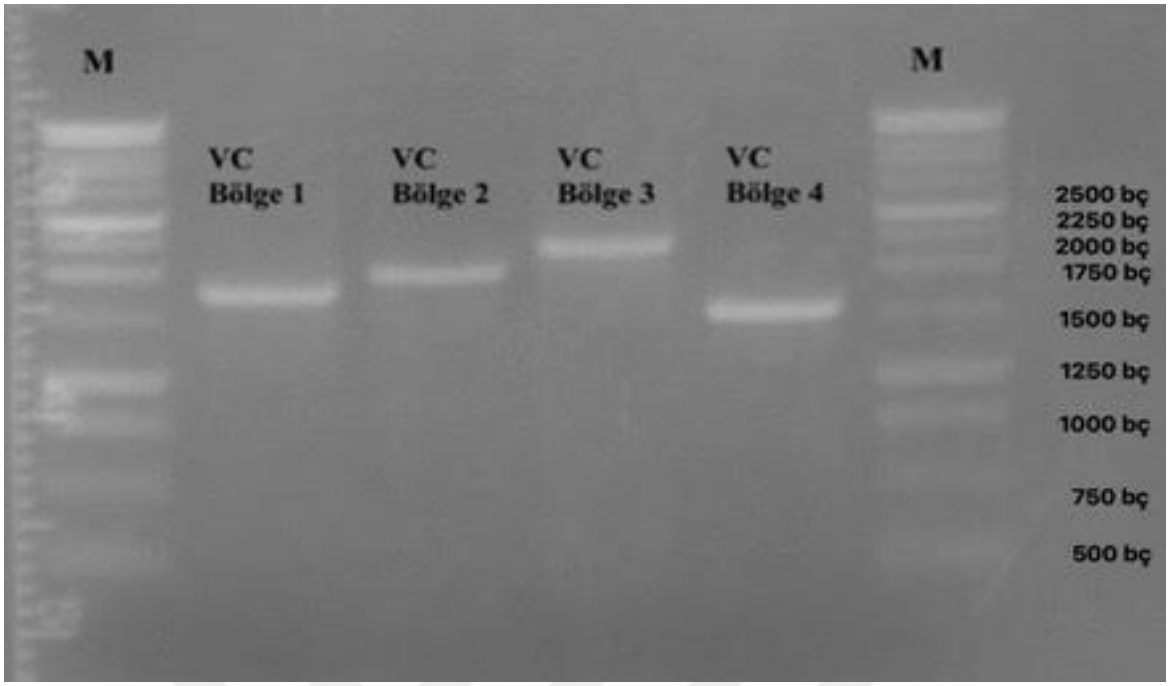
		Kontrol yüzdelerine dönüştürülen optik değerler									EC50 (µM)
		50	16,667	5,556	1,852	0,617	0,206	0,069	0,023	VC	CC	
P1, 1/500	CIM119143 (50µM)	18	2	-6	0	-1	-2	-2	-1	-3	107	>50
		14	-7	-9	-6	-3	-4	2	0	-1	101	
	CIM 212240 (50µM)	88	31	11	5	12	3	8	3	0	104	25,1 ± 1,48
		89	23	11	2	-1	-2	2	-4	3	100	
	Rupintrivir (10µM)	96	100	92	93	87	100	9	-2	0	98	0,16 ± 0,004
		92	94	90	94	92	96	6	0	1	90	
P4, 1/500	CIM119143 (50µM)	22	6	1	4	1	1	-3	3	-3	104	>50
		21	2	5	3	0	-5	-2	10	2	99	
	CIM 212240 (50µM)	106	61	14	12	5	1	1	7	2	101	13,9 ± 1,48
		106	54	13	11	1	-4	5	0	2	96	
	Rupintrivir (10µM)	111	102	99	100	105	115	9	5	-3	100	0,11 ± 0,001
		97	92	91	89	92	94	6	4	-1	99	
VC, 1/250	CIM119143 (50µM)	120	121	106	55	10	5	2	-1	1	103	1,66 ± 0,023
		119	113	39	54	11	11	5	6	-1	100	
	CIM 212240 (50µM)	82	111	112	110	107	103	112	107	6	101	<0,023
		105	111	79	75	50	101	104	106	1	101	
	Rupintrivir (10µM)	107	108	100	110	110	105	5	5	-3	99	0,12 ± 0,005
		105	100	95	98	106	96	3	7	-4	96	

4.4. Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

Fenotipik direncin gözlendiği izolatlarda genomik arka planını aydınlatmak amacıyla tüm genom hedef bölgelere ayrılarak moleküler genetik bazlı araştırmalar yapılmıştır. Öncelikle, P1, P4, VC izolatları ve stok suşlarda hedef gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği kullanılarak amplifiye edilmiştir. Tüm genomu kapsar nitelikteki dört hedef bölgenin amplikonları %1'lik agaroz jelde yürütülerek primer aktivitesi ve ürün miktarı (baz çifti) test edilmişitr. PCR ile amplifiye edilen bölgelerin amplikon büyüklüğü 1750 baz çifti (bç) ile 2500 bç arasındadır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. P1 ve P4 izolatlarına ait hedef bölge amplikonlarının agaroz jel görüntüsü (M: DNA Ladder- 250 bç)

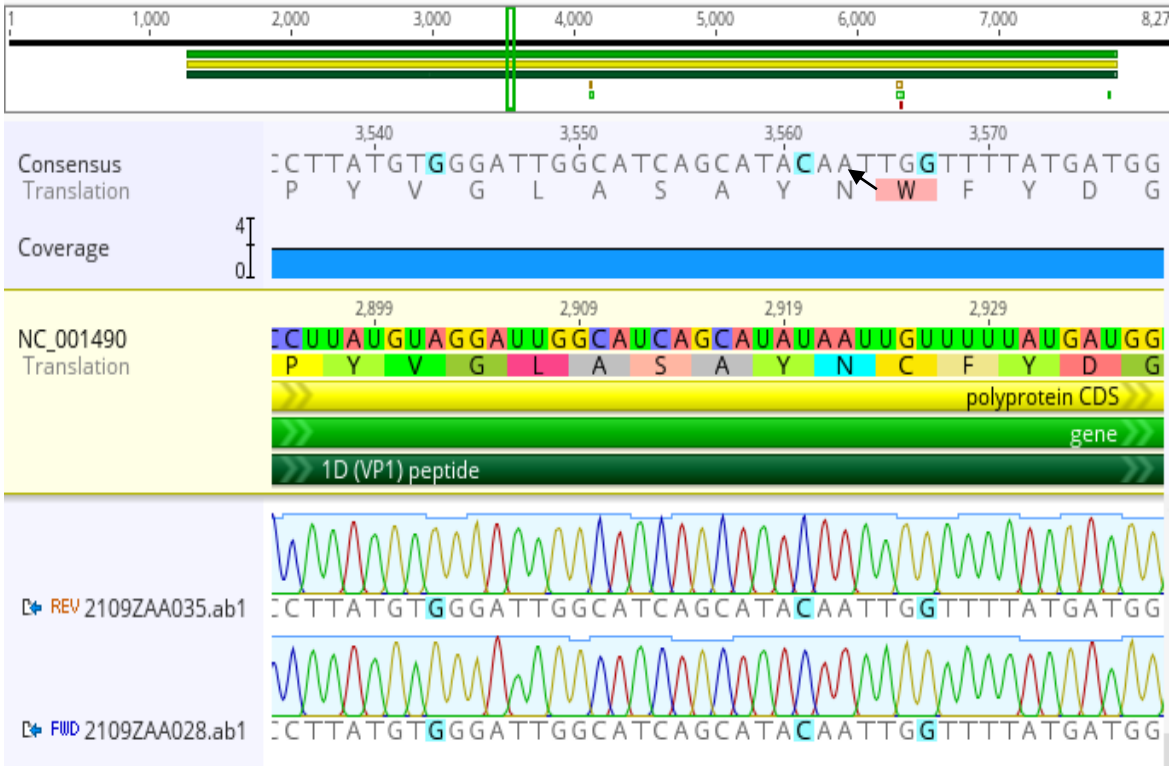


Şekil 4.2. VC ait hedef bölge amplikonlarının agaroz jel görüntüsü (M: DNA Ladder- 250 bç)

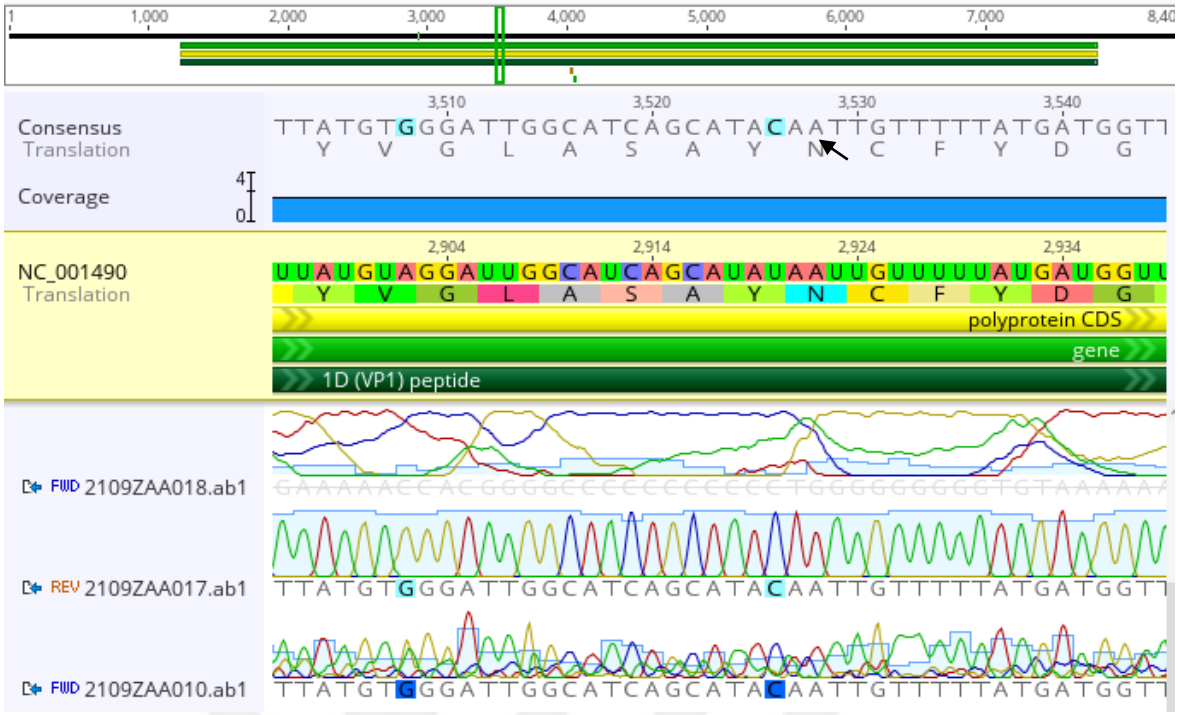
4.5. DNA Dizi Analizi Sonuçları

Sekans PCR reaksiyonunun ardından çalışılan izolatlar (P1, P4), VC ve stok suşuna ait DNA dizi analizi sonuçları ileri ve geri primerler için tek tek elde edilmiştir. Her hedef bölgesine ait ileri ve geri primer elektroferogram görüntüleri Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer cihazından Geneious Prime 2022.1 programına aktarılmış ve iki yönlü olarak elde edilen DNA dizi analizi sonuçları birleştirilerek her bir izolata ait tüm genom tamamlanmıştır. Fenotipik olarak CIM212240 bileşiğine dirençli olan P1 ve P4 izolatları ile VC karşılaştırmalı bir şekilde değerlendirilmiş, VP1 kapsid proteinine ait gen bölgesinde C199W amino asit yer değiştirmesi saptanmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Şekil 4.3. Rinovirus P1 izolatı direnç kromotogramı



Şekil 4.4. Rinovirus P4 izolatında direnç kromotogramı



Şekil 4.5. Virüs kontrolü (VC) direnç kromotogramı

5. TARTIŞMA

İnsan rinovirüsleri, son dönem literatürlerde soğuk algınlığının yarısı ile üçte ikisinin etiyolojik faktörü olarak tanımlanmaktadır. Yıl boyunca çocuklarda 8-12 kez HRV enfeksiyonu gözlenebilirken, yetişkinler yılda 2-3 kez enfekte olabilir ve yıl boyunca enfeksiyon dönemleri gözlemlenebilir (Casanova ve diğerleri, 2018). Etkin bağışıklığı olan konakçılarda hafif seyirli HRV enfeksiyonu varlığına rağmen; bebeklerde bronşiolit, bağışıklığı baskılanmış olanlarda pnömoni, astım veya kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi önceden var olan akciğer rahatsızlıklarının tetiklenmesine sebebiyet vermektedir. Bu durumlar ise sağlık sisteminde büyük ölçekli ekonomik maliyetlerle sonuçlanmaktadır (El-Kafrawy, Alsayed, Alandijany, Bajrai, Faizo, Al-Sharif, Hassan, Alquthami, Al-Tawfiq, Zumla ve Azhar, 2022).

İnsan rinovirüsleri, 1950'lerde soğuk algınlığının etiyolojisinin belirlenmesi sürecinde keşfedilmiştir. Ancak aradan geçen 70 yıla rağmen soğuk algınlığı virüsü için etkin ve önleyici bir aşı geliştirilememiştir. Çok sayıda HRV serotiplerinin gösterdiği antijenik çeşitlilik, etkili ve küresel HRV aşısı araştırmalarını engellemiştir (Glanvilleve Johnston, 2015). Ayrıca, HRV serotiplerinin yaklaşık %90'nın insan ICAM-1 reseptörüne bağlanması, ancak fare ICAM-1 reseptörüne bağlanamaması, hayvan enfeksiyon modellerinin tasarlanmasını ve *in vivo* araştırmaları sınırlamıştır (Register, Uncapher, Naylor, Lineberger ve Colonno, 1991). Bu nedenle, antiviral ilaç tedavileri viral hastalıklarda veya etkili bir aşının olmadığı bu gibi durumlarda en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir. Böylece, antirinoviral tedavi ile viral enfeksiyon semptomları ve bulaşıcılığı en aza indirgenerek tedavi süreci kısaltılabilir ve hastalığın seyri hafifletilebilir (Price ve diğerleri, 2022).

İlerleyen yıllara rağmen antiviral tedavideki ivmelenme gerek antibakteriyel gerekse antifungallere göre daha yavaş seyretmiştir. Bunda en büyük etken ise virüslerin zorunlu, hücre içi parazitler olması ve konak hücreye zarar vermeden viral replikasyonu önleyen hedefler bulmanın diğer antimikrobiyal ilaçlardan çok daha zorlu bir süreci barındırmasıdır. Bu süreç son dönem küresel COVID-19 pandemisi ile büyük ilerlemeler kaydetmiş olsa da hala HRV'ü de kapsayan solunum yolu virüsleri için geliştirilmiş etkili bir ajan yoktur (Abdulaziz, Elhadi, Abdallah, Alnoor ve Yousef, 2022).

Günümüzde, viral enfeksiyonlar için kemoterapötik seçenekler hala sınırlı olmasına rağmen diğer viral enfeksiyonlara karşı kullanım için lisanslanmış mevcut ilaçların anti-HRV aktivitesini karakterize etmek amacıyla birçok araştırma yapılmıştır. Bunlardan en çok üzerinde çalışılanlar HRV gibi genomu RNA olan HIV, hepatit A ve C virüsü, influenza virüsü ve solunum sinsityal virüsü (RSV) için tasarlanan ilaçlardır. Bu terapötik bileşiklerin birçok HRV serotipine karşı antiviral aktivitesi ortaya koyulmuştur ancak bu ilaçların hiçbiri HRV enfeksiyonunda kullanım için lisans alamamıştır (Casanova ve diğerleri, 2018). Bu sebeple, farmasötik şirketleri etkili anti- rinovirallerin geliştirilmesi araştırmalarına devam etmektedir.

Bu tez çalışmasında da CD3 şirketine ait antiviral etkinliği varsayılan CIM212240 bileşiğinin rinoviral aktivite mekanizması üzerinde çalışılmıştır. Farmasötik olarak değerlendirilen bileşiğin mikrobiyolojik etkileri *in vitro* deneylerle aydınlatılmaya çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda etkin enfeksiyon oranları bilinmediğinden tez çalışmasında, en iyi sitopatik etkinin elde edileceği inokülasyon miktarı ve süresi viral duyarlılığı yüksek HeLa Rh hücre hatları kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca, tez çalışmamız süresince literatürde birçok antirinoviral ilaç çalışmasında kullanılan ve 1985 yılında ilk kez viryon kristal yapı keşfine paralel olarak immunojenik bölgeleri dizilenen insan rinovirüslerinden HRV-14 suşu *in vitro* araştırmalar için seçilmiştir (Stanway ve diğerleri, 1984; Rossmann, Arnold, Erickson, Frankenberger, Griffith, Hecht, Johnson, Kamer, Luo ve Mosser, 1985).

Picornaviridae ailesine ait virüslerinin çoğu, en verimli üremeyi 36 santigrat derecede göstermektedir. Ancak literatür incelendiğinde, Picornaviridae ailesinin *Enterovirus* (EV) cinsine ait rinovirüslerin 33 santigrat derecede etkinlik gösterdiği ifade edilmektedir. Bununla ilgili araştırmalar, viral replikasyonun yüksek sıcaklıklarda çok değişkenlik göstermediği ancak konakçı hücre yanıtının sıcaklıkla değiştiğini ve daha yüksek sıcaklıklarda rinovirüslere daha az elverişli bir ortam yarattığını göstermiştir (Sinclair ve Omar, 2022).

HRV 1B ve 14 serotipleriyle HeLa hücreleri kullanılarak yapılan birçok rinovirüs inhibitör adayı bileşiğin incelendiği bir çalışmada optimal üreme sıcaklığı 33 santigrat derece olarak uygulanmıştır. Çalışma süresince virüsün indüklediği sitopatik etki bu şartlar altında

değerlendirilmiş ve EC_{50} verimli bir şekilde hesaplanmıştır. (Conti, Proietti Monaco ve Desideri, 2017).

Pleconaril türevlerinin araştırıldığı çoklu enteroviral etkinlik panelinde HeLa hücrelerindeki sitopatik etki farklı suşlarda farklı sıcaklık değerlerinde çalışılmıştır. Rinovirüs 14 suşu 37 santigrat derecede, rinovirüs A2 ve B5 ise 33 santigrat derecede verimli çoğalmayı göstermiştir (Egorova, Kazakova, Jahn, Ekins, Makarov ve Schmidtke, 2020). HRV-14 suşunun antiviral bir bileşik olan WIN 52084 varlığında stabilitesinin analiz edildiği ve birçok farklı HeLa alt klonlarının hücre hattı olarak kullanıldığı bir çalışmada viral kültür için uygun üreme sıcaklığı 34 santigrat derece olarak belirtilmiştir (Gonçalves, Mendes, Soares, Katpally, Smith, Silva ve Oliveira, 2007).

Çok sayıda DNA ve RNA virüsüne karşı antiviral aktiviteye sahip Laktoferrin'in rinovirüs 14 enfektivitesi üzerindeki etkisinin H1- HeLa hücreleri kullanılarak incelendiği bir çalışmada ise inkübatör sıcaklığı 34 santigrat derecede sabitlenmiştir. Çalışmada, etkin bir şekilde üretilen HRV 14 plak redüksiyon testlerinde kullanılarak Laktoferrin'in sitopatik etki değerlendirmesinde kullanılmıştır (Denani, Real-Hohn, de Carvalho, Gomes ve Gonçalves, 2021).

Birçok farklı sınıf antiviral ajanın test edildiği bir rinovirüs C çalışmasında ise benzer şekilde optimal virüs inkübasyon ısısı 33 santigrat derece olarak ayarlanmıştır. Rinovirüs C'nin *in vitro* olarak direk çalışılamaması sebebiyle subgenomik RNA replikonlarının HeLa hücrelerine transfeksiyonu sonrasında bu enfeksiyon önleyici bileşikler denenebilmiştir (Mello, Aguayo, Rodriguez, Lee, Jordan, Cihlar ve Birkus, 2014). Bu HRV-C için oluşturulan hassas hücre kültürü enfeksiyöz modelinde uygun üreme sıcaklığının 33 derece olması virüs serotipi ve hücre hattının optimum inkübasyon sıcaklığında değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu sebeple, HRV-14 suşu ve HeLa Rh hücre hatları ile yaptığımız çalışmamızda seçilecek inkübatör sıcaklığı antiviral deneyler öncesinde imtinayla test edilmiştir. Elde edilen en kısa sürede ve etkin SPE varlığı 35 santigrat derece olarak saptanmıştır. Bu değerin literatürde gözlenen değerlerden farklı olması HeLa hücre hattının bir klonu olan ve SPE duyarlılığı arttırılmış HeLa Rh hücrelerinin tercih edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

İnsan rinovirüslerinin hücre hatları kullanılarak tekrarlanabilir bir şekilde üretilmesi etkin üreme sıcaklığının yanı sıra uygun besi ortamına da bağlıdır. Yapılan çalışmalar incelendiğinde diğer viral kültürlerden farklı olarak $MgCl_2$ varlığı rinoviral ortam besiyeri için önemli bir etmen olarak karşımıza çıkmaktadır. HRV-89 ve HRV-14 ile yapılan bir rekombinant VP1 proteini ekpresyon çalışmasında virüs stokları 40 mM $MgCl_2$ varlığında sitopatik etki deneyleri için çoğaltılırken 30 mM $MgCl_2$ ise çapraz nötralizasyon testlerinde besiyer ortamına eklenmiştir (Edlmayr, Niespodziana, Popow-Kraupp, Krzyzanek, Focke-Tejkl, Blaas, Grote ve Valenta, 2011). Laktoferrin'in rinovirüs 14 üzerindeki antirinoviral etkisinin H1- HeLa hücreleri kullanılarak incelendiği bir çalışmada ise hücre canlılığı ve plak redüksiyon testleri uygulanırken viral üreme için 30 mM $MgCl_2$ varlığı tercih edilmiştir (Denani ve diğerleri, 2021). Gripp-Heel homeopatik bileşenlerinin farklı solunum virüsleri üzerindeki antiviral etkilerinin *in vitro* değerlendirildiği bir çalışmada ise HRV-14, HeLa hücreleri kullanılarak 25 mM $MgCl_2$ varlığında çoğaltılıp sitotoksisite ve SPE redüksiyon analizlerinde kullanılmıştır (Glatthaar-Saalmüller, 2007). Literatürdeki bu değerler bu tez çalışmasında standart bir $MgCl_2$ miktarı tespitini zorunlu kılmıştır. Bu sebeple, çalışmada HeLa Rh hücre hattı üzerinde HRV-14 suşunun 30 mM $MgCl_2$ varlığında etkin bir üreme sağladığı ortaya konmuş antiviral SPE redüksiyon ve çapraz direç testleri için bu değer kullanılmıştır.

I-6602 isimli antiviral özellik gösteren bileşiğin rinoviral aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada benzer hücre ekim metodları uygulanarak HeLa hücreleri tercih edilmiştir. Bu çalışma için HRV-14 ve 39 suşu seçilerek bileşiğin neden olduğu SPE redüksiyon analizleri yapılmıştır. Çalışmada, HRV A ve B'nin etkinlikleri aynı zamanda pirodavir ile karşılaştırılmalı değerlendirilmiştir. Sonuçta, farklı HRV türlerinde VP1 viral kanyonlarının boyut, derinlik ve şekil değişkenliği olmasına rağmen bileşik I-6602' nin pirodavire kıyasla düşük rinoviral etkinliği olduğu saptanmıştır. Bu kanyonların içine daha iyi uyum sağlayabilen yeni moleküllerin tasarlanması ise gelecek çalışmalar için öngörülmüştür (Laconi, Madeddu ve Pompei, 2011). İlerleyen yıllarda ise ca603 olarak adlandırılan I-6602 analoğu olarak tasarlanan bir bileşiğin rinoviral etkinliğini aynı şekilde HeLa hücre kültürü ve HRV-14 suşu kullanarak incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda ca603'ün VP1 kapsid proteini ile etkileşime girerek virüs replikasyonunu inhibe ettiği doğrulanmıştır; ancak bu çalışmalar ve literatür incelendiğinde etkin bir enfeksiyon oranı saptanamamıştır (Lacroix, Laconi, Angius, Coluccia, Silvestri, Pompei, Neyts ve Leyssen, 2015). Bu amaçla,

çalışmamızda başlangıçta farklı inokülasyon miktarları (MOI 1:10000, 1:1000, 1:100), farklı CIM212240 bileşik derişimlerinde denenmiştir.

Mevcut antirinoviral tedavilerin birçok farklı etki mekanizmaları olsa da öncelikle virüs replikasyon döngüsünün hedeflendiği biyoteknolojik sistemler ve farmasötik bileşikler üzerinde çalışmalara ağırlık verilmiştir. Viral replikasyonun önemli adımlarını inhibe ederek HRV enfeksiyonu semptomlarının erken dönemde önlemek veya süresini kısaltmak için bağlanma, endositoz, RNA sentezi, litik salınıma yönelik çeşitli ilaç adayları geliştirilmiştir. Virüs replikasyon döngüsünün bozulması ise bu döngüde önemli olan viral proteinlerin (VP1-VP4) hedeflendiği birçok inhibitör veya konak hücre faktörlerini hedefleyen bileşikler tasarlanarak gerçekleştirilmektedir (Thibaut ve diğerleri, 2012).

Viral kapsid proteinlerinin hedeflendiği bileşikler ise klinik deneyler aşamasına gelebilen, üzerine en çok çalışılan ve etki potansiyeli yüksek inhibitörlerdir. Pleconaril, "kapsid bağlayıcılar" olarak da bilinen en eski antirinoviral ilaç adayıdır. Bu bileşik, viral kapsid üzerinde bulunan kanyonun tabanındaki hidrofobik bir cebe bağlanarak virüsün konak hücreye kaplanmasını ve/veya bağlanmasını önler. Pirodavir ve vapendavir ise literatürde etkinliği ortaya konulan diğer kapsid bağlayıcı inhibitörlerdir ve benzer bir etki mekanizmasıyla çalışırlar. Rupintrivir, Enviroxime, 2′-*C*-Met-Cyt, MDL-860, Ribavirin, TTP-8307 gibi farklı etki mekanizmaları ve hedef bölgeleri barındıran bileşikler ile bu kapsid bağlayıcıların etkinliği HRV- 14, Poliovirüs 1 ve Enterovirüs 71 kullanılarak karşılaştırılmıştır. Bu geniş anti- rinoviral etkinlik panelinde kapsid bağlayıcı inhibitörler EC_{50} hesaplanarak değerlendirilmiş ve diğer bileşiklere kıyasla ilaç etkinlik potansiyellerinin daha yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Thibaut ve diğerleri, 2011). Bu sebeple, CD3 şirketi ve birçok farmasötik araştırma grupları kapsid proteinlerini hedefleyen antirinoviral bileşikler üzerine yoğunlaşmıştır.

Son dönem çalışmaları incelendiğinde HRV-14'ün yer aldığı üç farklı rinovirüs suşunda üç N-Alkil triazolopirimidinon türevi bileşiğin etkinliği çalışmamıza benzer şekilde HeLa hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Bu üç HRV türüne karşı tek basamaklı mikromolar aralıkta EC_{50} değerleri hesaplanarak oldukça aktif rinoviral etkinlikler tespit etmişlerdir. Özellikle, bileşik 2c olarak adlandırılan formül, test edilen tüm HRV'lere karşı ≤ 2 μM EC_{50} ile geniş anti-HRV aktivite sergilemiştir. Pleconaril, rupintrivir ile karşılaştırmalı analizler sonucunda, bileşik 2c'nin virüsteki replikasyon aşamalarını hedeflediğini ortaya çıkarmıştır

(Kumar Biswas, Soo Shin, Malpani, Hwang, Jung, Bong Han, Vishakantegowda ve Jung, 2022). 25- ve 27-hidroksikolesterol (25OHC ve 27OHC) ile HeLa hücreleri üzerinde yapılan bir başka çalışmada ise SPE redüksiyon testleri ile bu iki fizyolojik oksisterolün antirinoviral etkinliğini göstermişlerdir. Ayrıca, klonal pasajlamalarla elde edilen sonuçlar, 25OHC ve 27OHC'nin çalışmada kullanılan iki HRV suşu üzerinde de dirençli varyant oluşturmadığını ortaya koymuştur (Civra, Costantino, Cavalli, Adami, Volante, Poli ve Lembo, 2022).

Viral proteinlerin hedeflendiği ilaç teknolojileri insan rinovirüs tedavisinde kullanılan ilk yaklaşım olmuştur, ancak genomik çeşitliliğin yoğun olduğu HRV serotipleri için geniş spektrumlu viral aktivitenin sağlanması kolay değildir. Ek olarak, RNA polimerazların mutajenik frekansının yüksekliği farklı varyantların oluşumuna sebebiyet vermektedir. Enfeksiyon süresince her replikatif döngüde oluşabilen mutasyonlar geliştirilen antivirallere karşı ilaca dirençli mutantlara sebebiyet vermektedir. Klinik fazda ilaç direncinin ortaya çıkması, tedavi süresince dirençli virüs mutantlarının gelişimini artıracak böylelikle antiviral tedaviyi etkisiz hale getirecektir (De Palma, Vliegen, De Clercqve Neyts, 2008). Bu nedenle, tez süresince tasarlanan CIM212240 bileşiğinin antiviral etkinliğinin yanında antiviral direnç mekanizmaları hakkında detaylı bilgi için ilaca dirençli varyantlar seçilmiştir. Beş aşamalı bir klonal seçim prosedürü ile hücre morfolojileri viral yük ve bileşik derişimleri değişkenliğinde değerlendirilmiştir. Gerçekleştirilen pasajlar sonucunda yoğun fenotipik direnç profili gözlenmiş ve oluşan varyantlar genomik verilerle karşılaştırılmıştır. Sekanslama sonrasında, ilaca dirençli varyantlarda kapsid proteini VP1 üzerinde (C199W) tek bir mutasyon tespit edilmiştir.

Vapendavir'e karşı direnç moleküler mekanizmasının araştırıldığı kapsamlı picornavirüs panelinde, HRV-14 suşunun direnç mekanizmasında aynı lokasyonda benzer bir mutasyon keşfedilmiştir. VP1'deki ilaç bağlama cebi olarak da düşünülen bu hidrofobik cepte C199R/Y tek mutasyonu gözlenmiş ve bu bölgenin aynı zamanda cep girişi olarak konumlandığı rapor edilmiştir (Lanko ve diğerleri, 2021). Bir kapsid inhibitörü olan Pleconaril'e dirençli HRV-14 izolatlarında gerçekleştirilen genomik bir araştırmada ise C199 pozisyonunda tekli mutasyona rastlanmıştır (Feil, Hamilton, Krippner, Lin, Luttick, McConnell, Nearn, Parker, Ryan, Stanislawski, Tucker, Watson ve Morton, 2012). Bu veriler 1989 yılında öncül çalışmalardan olan Heinz ve ekibinin hücre tutunumunu engelleyen WIN-52084 bileşiğine yüksek dirençli HRV-14 izolatlarında saptadığı C199T mutasyonu ile örtüşmektedir. Ayrıca, tüm bu çalışmalar hücre kültürü açısından benzer

metotlar takip edilerek HeLa hücre hatlarında çalışılmıştır; bu sebeple genomik tutarlılık barındıran sonuçlarımız metodolojik olarak da benzeşmektedir.

WIN 52035-2 bileşiğinin kapsid içindeki bir hidrofobik cebe bağlanarak insan rinovirüs 14 bağlanmasını inhibe ettiğinin ortaya konduğu bir çalışmada ilaç bağlanma kapasitesindeki düşüş benzer şekilde dirençli varyantlara işaret etmiştir. Yapılan moleküler analizlerle C1199T ve V1153I tekli amino asit yer değiştirmelerinin neden olduğu konformasyonel değişiklik bu mutantların ilacın varlığına rağmen hücre reseptörlerine bağlanabildiğini ortaya koymaktadır (Shepard, Heinz ve Rueckert, 1993). Benzer yapısal özelliklere sahip WIN 53338 bileşiğiyle yürütülen bir başka çalışmada ise HRV- 14 suşunda gelişen bileşik bazlı dirence V188L mutasyonunun sebebiyet verdiği ispatlanmıştır (Wade ve McCammon, 1992).

Faz II aşamasına kadar değerlendirilen Pleconaril'in birçok insan rinovirüs A ve B serotipi kullanılarak incelendiği detaylı bir çalışmada ise gelişen doğal direncin etki mekanizmasındaki rolü ve nedeni aydınlatılmıştır. Genomik araştırma yapılarak gözlenen dirençli varyantlarda HRV-14'te V191L ve/veya F152P mutasyonları tespit edilmiştir. V191L tekli mutasyonunun bileşik duyarlılığını EC_{50} değerleri kıyaslanarak 30 kat azalttığı tespit edilmiştir. Ancak, F152P tekli mutasyonunun görüldüğü izolatlarda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. İki mutasyonun beraber görüldüğü durumda ise tam bir direnç (EC_{50}>10 μM) gözlenmiştir (Ledford, Collett ve Pevear, 2005). Neticede, etkin mutajen bölgenin ilaç-virüs mekanizmasıyla yakından ilişkili olduğu literatürsel açıdan desteklenmiştir.

Yapılan çapraz direnç ve SPE redüksiyon testleri ışığında CIM212240 bileşiğinin, rinovirüs 14 replikasyonunun seçici bir inhibitörü olduğu kanıtlanmıştır (EC_{50} =0,40±0,01 μM). Ek olarak, çapraz direnç testinde CIM212240 bileşiğinin bir analoğu olan aynı şirkete ait CIM119143 olarak adlandırılan bileşikle aynı derişimde değerlendirilen (50 μM) izolatlarda benzer şekilde SPE inhibisyonunun gözlenmesi şüpheye yer bırakmaksızın ilaca karşı gelişen direnç mekanizmasının göstergesi olmuştur. Aynı zamanda, CIM119143 bileşiğinin kapsin bağlayıcı özellik taşıdığı önceki çalışmalarla bilindiğinden izolatlarda gözlenen VP1 mutasyonunu anlamlı kılmıştır. Elde edilen dirençli izolatlarda (P1, P4) bir proteaz inhibitörü olan rupintrivir ile yapılan çapraz direnç testi neticesinde etkin EC_{50} değerleri saptanmıştır (EC_{50} =0,16±0,004 μM ve EC_{50} =0,11±0,001 μM). Ayrıca, virüs kontrol değeri

(EC_{50}=0,12±0,005 μM) ile karşılaştırıldığında izolatlarda rupintirivir varlığına bağlı değişkenlik olmadığı ortaya konmuştur. Rupintrivir ile yapılan HRV- 14 dahil birçok serotip barındıran bir çalışmada bileşiğin antirinoviral etkinliği H1-HeLa hücreleri kullanılarak çalışmamıza benzer antiviral SPE redüksiyon testleri kullanılarak ortaya konmuştur (Binford ve diğerleri, 2005). Bu sebeple, rupintrivir karşılaştırmalı analizler için ideal bir referans bileşik olarak çalışmamıza dahil edilmiş olup bir viral kapsid inhibitörü olan CIM212240 bileşiğinin dirençli izolatlarındaki bu sonuçlar bilimsel açıdan beklenen niteliktedir ve çapraz direnç göstermemiştir.

Rupintirivir ile yapılan bir çalışmada HRV-14 serotipinde dirençli varyantlar elde edilmiş olup 7 ile 16 kat antirinoviral etkinlikte azalma tespit edilmiştir. Yapılan tersine mühendislik çalışmalarında ise *in vitro* seçilmiş rupintrivire dirençli bu varyantlarda 3C bölgesinde dört (T129A, T131A, Y139H, T143P) aminoasit yer değiştirmesi bildirilmiştir (Patick ve Potts, 1998; Binford ve diğerleri, 2005). Ancak, bir kapsid inhibitörü olan pleconaril ile yapılan çapraz direnç testinde varyantların antirinorival etkinliğinde herhangi bir azalma kaydedilmemiştir. Bu karşılaştırmalı yöntem tez çalışmamızdaki yaklaşımla birebir örtüşmektedir. Rupintrivir gibi bir proteaz inhibitörü olan SG85 bileşiği ve 14 farklı rinovirüs ile yapılan bir çalışmada ise HRV-14 suşunda çift mutant taşıyan dirençli varyantlarda (S127G, T143A) bileşiğin antirinoviral etkinliğinde 3 kat azalma olduğu kanıtlanmıştır. Ancak, rupintrivir ve pleconaril ile yapılan çapraz direnç analizinde EC_{50} değerlerinde bir değişim gözlenmemiştir. Bu sebeple, etki mekanizmaları örtüşen bileşiklerle elde edilen varyantların değerlendirilmesi çalışmanın verimliliği açısından elzemdir.

Bağımsız olarak seçilmiş CIM212240 dirençli varsayılan HRV-14 virüs varyantları, logaritmik interpolasyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu virüs varyantlarının fenotipik karakterizasyonu ile hesaplanan EC_{50} değerleri karşılaştırıldığında bileşiğin antiviral aktivite duyarlılığında yaklaşık 50 kat azalmaya sebebiyet vermektedir. Bu da oluşan direncin ilaç etkinliği üzerindeki olumsuz etkisinin büyüklüğünü vurgular niteliktedir.

LPCRW_0005 bileşiğinin rinoviral etkinliğini araştırdıkları bir çalışmada, HRV-14 suşu ile yapılan analizlerde VP1 kapsid proteini üzerinde mutasyonlara rastlanmıştır. A150T veya A150V amino asit yer değiştirmeleri gözlenen farklı varyantlarda ilaç duyarlılığında 30 kata

yakın azalma saptanmıştır. HRV14/LPCRW_0005 kompleksinin kristal yapısı incelendiğinde ise VP1 cebi ve LPCRW_0005 arasında çoklu hidrofobik ve polar etkileşimlerin olduğu saptanmış; bunun ise mutajenik etkinliğe sebep olduğu rapor edilmiştir (Lacroix ve diğerleri, 2014). İki farklı kapsid inhibitör adayı bileşik ile yapılan bir araştırmada H1-HeLa hücrelerinde HRV-14'ün bileşiğe dirençli varyantlarının seçimi sonrası şaşırtıcı bir şekilde 3A proteininde I42V bölgesinde tek nükleotid mutasyonu keşfedilmiştir. Ancak, stok şuşu ve mutant izolatların SPE analizleri karşılaştırıldığında antiviral etkinlikte büyük bir değişim gözlenmemiştir. Bu nedenle, ilacın neden olduğu mutasyon bölgesi inhibisyon etkinliği ve ilaç duyarlılığı açısından önem arz ettiği; bunun da genomik analizin tasarlanan bileşikleri değerlendirirken önemli bir veri olduğunu ortaya koyduğu bildirilmiştir. Ayrıca mutajenik bölgenin ilacın genellikle hedef bölgesinde olmasının tesadüfi olmadığı, ilacın etkinliği açısından bilgi verir nitelikte olduğu rapor edilmiştir. Bu sebeple yapılan direnç seçimi ve ardından tersine mühendislik, kapsid proteini VP1'in ilacın etki mekanizmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu veriler, umut verici olan geniş rinoviral etkinliği olduğu düşünülen bu bileşiklerin tetkikinin önemini ortaya koymaktadır (Spickler, Lippens, Laberge, Desmeules, Bellavance, Garneau, Guo, Hucke, Leyssen, Neyts, Vaillancourt, Décor, O'Meara, Franti ve Gauthier, 2013). Yeni sentezlenen bileşiklerin stabilitesi ve biyoyararlanımı bu çalışmaların ilerlemesiyle mümkün olacaktır.

Bu tez çalışmasında altın standart olarak kabul gören hücre kültür yöntemi ile antiviral etkinlik deneyleri tasarlanmıştır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda duyarlılığı yüksek revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ve Sanger dizileme yöntemi ile genomik veriler elde edilerek virüs-bileşik mekanizması aydınlatılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yıllardır virüslerle sürdürülen savaşta biyoteknolojinin ve moleküler genetiğin hızlı gelişmesi spesifik olarak her bir viral enfeksiyonun tedavisinde antiviral ilaçların geliştirilmesi çalışmalarını hızlandırmıştır. Birçok şirket ilaç adaylarının canlı hücre metabolizması ve biyolojik arka planının keşfine yoğunlaşarak bilim insanlarıyla ortak araştırmalar yürütmektedir. Bu sebeple, çalışmamızda İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi (CD3) Laboratuvarı'nda geliştirilen ve CIM212240 olarak isimlendirilen bileşiğin antirinoviral etkisi KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı'nda *in vitro* deneylerle araştırılmıştır. Kültür yöntemi ve tersine mühendislik kullanılarak elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde aşağıdaki çıkarımlar ve önerilerde bulunulmuştur;

1. KU Leuven Üniversitesi, Rega Tıbbi Araştırma Enstitüsü, Viroloji, Antiviral İlaç ve Aşı Araştırmaları Neyts Laboratuvarı Kültür Koleksiyonu'nda bulunan HRV-14 suşu HeLa Rh hücreleri kullanılarak farklı enfeksiyon oranlarında optimize edilmiştir. Bu hücre hattının HRV-14 suşunun laboratuvar ortamında geliştirilmesinden başlayarak bileşik deneyleri için optimize bir süreç ve metot tanımlanmıştır. Bu metot diğer viral kültür çalışmalarının aksine besiyeri çözeltisine uygun miktada $MgCl_2$ bileşiği eklenmesi ve inkübatörün 35°C'de tutulması dahil farklı uygulamaları kapsamaktadır.

2. İlaç Tasarım ve Keşif Merkezi (CD3) Laboratuvarı'nda geliştirilen CIM212240 bileşiğinin farklı derişimleri, farklı enfeksiyon oranlarında HRV-14 suşu ile inolüke edilerek HeLa Rh hücre hatlarında değerlendirilmiştir ve standart bir SPE redüksiyon testi ve dilüsyon oranı belirlenmiştir. Mikroskobik incelemelerle fenotipik karakterizasyonu oluşturulan deney düzeneğinin optik okumalarla örtüşmesi sağlanmıştır. Bu oluşturulan metot ile hazırlanan plaklar ışığında CIM212240 bileşiğinin, rinovirüs 14 enfeksiyonunda etkin bir antirinoviral bileşik olabileceği kanıtlanmıştır.

3. Antiviral tedavide, sadece fenotipik profilin ve dışsal değişkenlerin değil, aynı zamanda içsel mekanizmalarında değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla, birçok pasajlama ile farklı bileşik ve enfeksiyon konstrasyonları barındıran uzun soluklu bir deney prosedürü tasarlanmıştır. Geliştirilen bu metotla farklı direnç etkinlikleri gözlenen durumlar

kaydedilerek çalışmalar ilerletilmiştir. Bu beş aşamalı klonal seçim protokolü ileride birçok rinovirüs-bileşik etkileşiminin aydınlatılmasında kullanılabilecektir.

4. Klonal seçim protokolü ile belirlenen optimum enfeksiyon koşullarında iki farklı CIM212240 bileşiğine dirençli izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu suşlarda %50 ilaç etkinlik değeri (EC_{50}) değerlendirilmiş ve antiviral aktivite duyarlılığında 50 kat azalma hesaplanmıştır. Bu veri, şirket açısından bileşiğin tekrar tasarlanması ve/veya *in vivo* deneylerle desteklenmesi gerektiğinin açık kanıtı olmuştur.

5. Moleküler altyapının aydınlatılması için literatür bilgileri ile örtüşen özel primerler tasarlanmıştır. Tersine mühendislik ve Sanger sekans dizileme yöntemiyle dirençli suşlar, virüs kültürü ve stok suşunda kullanılan bu yeni primerler mutajenik etkinin VP1 kapsid proteini üzerinde olduğunu göstermiştir. Bu bölgenin hem hidrofobik cep oluşturma potansiyeli hem de CIM212240 bileşiğinin direnç mekanizmasının VP1 kapsid proteinini kodlayan bölgede olması ilaç etkinliğinin hedef bölgesine de işaret etmektedir.

6. DNA dizi analizleri sonucunda çalışılan tüm varyantlarda VP1 kapsid protein bölgesinde G→T transversiyonu 199. pozisyondaki sistein (Cys) aminoasidinin triptofan (Trp) aminoasidine dönüşmesine neden olmuştur. Polar özellik gösteren bu aminoasidin apolar özellik gösteren bir yapıya dönüşmesi ilaç-virüs bağlanma mekanizmasını bozarak direnç gelişimine sebebiyet verdiği öngörülmektedir.

7. İnhibisyon ve direnç mekanizmasının daha net anlaşılması için aynı şirketin sağladığı, moleküler olarak benzerlik gösteren, direnç dinamikleri bilinen CIM119143 bileşiği ile farklı etkinlik mekanizmasına sahip, yapısal olmayan proteinleri hedefleyen bir bileşik olan Rupintivir ile bir deney düzeneği oluşturulmuştur. Virüs kontrolleriyle de desteklenen veriler ışığında ilacın viral proteinleri hedeflediği ancak benzer şartlarda direnç gelişiminde kararlı olduğu ortaya koyulmuştur. Elde edilen tüm bu sonuçlar, ilacın inhibe edici etkisinden kaçabilen bu mutantların daha kapsamlı incelenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

8. CIM212240 bileşiğinin rinoviral etkinliğine rağmen gelişen direncin ilacın endüstriyel anlamda geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Tez çalışmasında kullanılan metot

ile analizler ve bulunan sonuçlar yeni tasarlanacak ilaç adaylarının değerlendirilmesine öncülük edecek niteliktedir.

KAYNAKLAR

Abdulaziz, L., Elhadi, E., Abdallah, E. A., Alnoor, F. A., and Yousef, B. A. (2022). Antiviral activity of approved antibacterial, antifungal, antiprotozoal and anthelmintic drugs: chances for drug repurposing for antiviral drug discovery. *Journal of Experimental Pharmacology*, 14, 97–115.

Adams, M. J., King, A. M., and Carstens, E. B. (2013). Ratification vote on taxonomic proposals to the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, 158(9), 2023–2030.

Albright, C. J., and Hall, D. J. (2011). An exercise in molecular epidemiology: human rhinovirus prevalence and genetics. *Biochemistry and Molecular Biology Education: A Bimonthly Publication of The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(6), 426–431.

Allen, L. B., Boswell, K. H., Khwaja, T. A., Meyer, R. B., Jr, Sidwell, R. W., Witkowski, J. T., Christensen, L. F., and Robins, R. K. (1978). Synthesis and antiviral acticity of some phosphates of the broad-spectrum antiviral nucleoside, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (ribavirin). *Journal of Medicinal Chemistry*, 21(8), 742–746.

Alper, C. M., Winther, B., Mandel, E. M., and Doyle, W. J. (2007). Temporal relationships for cold-like illnesses and otitis media in sibling pairs. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(9), 778–781.

Andrewes C. H. (1964). The complex epidemiology of respiratory virus infections. *Science*, 146(3649), 1274–1277.

Andries, K., Dewindt, B., Snoeks, J., Willebrords, R., van Eemeren, K., Stokbroekx, R., and Janssen, P. A. (1992). In vitro activity of pirodavir (R 77975), a substituted phenoxy-pyridazinamine with broad-spectrum antipicornaviral activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(1), 100–107.

Arden, K. E., and Mackay, I. M. (2010). Newly identified human rhinoviruses: molecular methods heat up the cold viruses. *Reviews in Medical Virology*, 20(3), 156–176.

Arruda, E., Pitkäranta, A., Witek, T. J., Jr, Doyle, C. A., and Hayden, F. G. (1997). Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2864–2868.

Atmar, R. L, (2009). *Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases.* (6. Baskı). London: Elsevier Health Sciences, 2170-2193.

Bartlett, N.W. and Johnston S.L. (2014). *Reference Module in Biomedical Sciences*. Cambridge: Academic Press, 467-475.

Basnet, S., Palmenberg, A. C., and Gern, J. E. (2019). Rhinoviruses and their receptors. *Chest*, 155(5), 1018–1025.

Braun, H., Kirchmair, J., Williamson, M. J., Makarov, V. A., Riabova, O. B., Glen, R. C., Sauerbrei, A., and Schmidtke, M. (2015). Molecular mechanism of a specific capsid binder resistance caused by mutations outside the binding pocket. *Antiviral Research*, 123, 138–145.

Binford, S. L., Maldonado, F., Brothers, M. A., Weady, P. T., Zalman, L. S., Meador, J. W., 3rd, Matthews, D. A., and Patick, A. K. (2005). Conservation of amino acids in human rhinovirus 3C protease correlates with broad-spectrum antiviral activity of rupintrivir, a novel human rhinovirus 3C protease inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), 619–626.

Bizzintino, J., Lee, W. M., Laing, I. A., Vang, F., Pappas, T., Zhang, G., Martin, A. C., Khoo, S. K., Cox, D. W., Geelhoed, G. C., McMinn, P. C., Goldblatt, J., Gern, J. E., and Le Souëf, P. N. (2011). Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *The European Respiratory Journal*, 37(5), 1037–1042.

Bochkov, Y. A., Watters, K., Ashraf, S., Griggs, T. F., Devries, M. K., Jackson, D. J., Palmenberg, A. C., and Gern, J. E. (2015). Cadherin-related family member 3, a childhood asthma susceptibility gene product, mediates rhinovirus C binding and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(17), 5485–5490.

Bochkov, Y. A., Watters, K., Basnet, S., Sijapati, S., Hill, M., Palmenberg, A. C., and Gern, J. E. (2016). Mutations in VP1 and 3A proteins improve binding and replication of rhinovirus C15 in HeLa-E8 cells. *Virology*, 499, 350–360.

Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K., Black, R. E., and WHO Child Health Epidemiology Reference Group (2005). WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*, 365(9465), 1147–1152.

Casanova, V., Sousa, F. H., Stevens, C., and Barlow, P. G. (2018). Antiviral therapeutic approaches for human rhinovirus infections. *Future Virology*, 13(7), 505–518.

Civra, A., Costantino, M., Cavalli, R., Adami, M., Volante, M., Poli, G., and Lembo, D. (2022). 27-Hydroxycholesterol inhibits rhinovirus replication in vitro and on human nasal and bronchial histocultures without selecting viral resistant variants. *Antiviral Research*, 204, 105368.

Conti, C., Proietti Monaco, L., and Desideri, N. (2017). 3-Phenylalkyl-2H-chromenes and -chromans as novel rhinovirus infection inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(7), 2074–2083.

Coultas, J. A., Cafferkey, J., Mallia, P., and Johnston, S. L. (2021). Experimental antiviral therapeutic studies for human rhinovirus infections. *Journal of Experimental Pharmacology*, 13, 645–659.

Cox, D.W. and LeSouëf, P.N. (2014). *Paediatric Respiratory Reviews: Rhinovirus and The Developing Lung.* London: Elsevier Health Sciences, 268-274.

Delang, L., Segura Guerrero, N., Tas, A., Quérat, G., Pastorino, B., Froeyen, M., Dallmeier, K., Jochmans, D., Herdewijn, P., Bello, F., Snijder, E. J., de Lamballerie, X., Martina, B., Neyts, J., vanHemert, M. J., and Leyssen, P. (2014). Mutations in the chikungunya virus non-structural proteins cause resistance to favipiravir (T-705), a broad-spectrum antiviral. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2770–2784.

Denani, C. B., Real-Hohn, A., de Carvalho, C. A. M., Gomes, A. M. O., and Gonçalves, R. B. (2021). Lactoferrin affects rhinovirus B-14 entry into H1-HeLa cells. *Archives of Virology*, 166(4), 1203–1211.

De Palma, A. M., Vliegen, I., De Clercq, E., and Neyts, J. (2008). Selective inhibitors of picornavirus replication. *Medicinal Research Reviews*, 28(6), 823–884.

Dougherty, R. H., and Fahy, J. V. (2009). Acute exacerbations of asthma: epidemiology, biology and the exacerbation-prone phenotype. *Clinical and experimental allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(2), 193–202.

Edlmayr, J., Niespodziana, K., Popow-Kraupp, T., Krzyzanek, V., Focke-Tejkl, M., Blaas, D., Grote, M., and Valenta, R. (2011). Antibodies induced with recombinant VP1 from human rhinovirus exhibit cross-neutralisation. *The European Respiratory Journal*, 37(1), 44–52.

Egorova, A., Kazakova, E., Jahn, B., Ekins, S., Makarov, V., and Schmidtke, M. (2020). Novel pleconaril derivatives: Influence of substituents in the isoxazole and phenyl rings on the antiviral activity against enteroviruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 112007.

El-Kafrawy, S. A., Alsayed, S. M., Alandijany, T. A., Bajrai, L. H., Faizo, A. A., Al-Sharif, H. A., Hassan, A. M., Alquthami, K. M., Al-Tawfiq, J. A., Zumla, A., and Azhar, E. I. (2022). High genetic diversity of human rhinovirus among pilgrims with acute respiratory tract infections during the 2019 Hajj pilgrimage season. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of The International Society for Infectious Diseases*, 121, 130–137.

Ellis H. (2003). Cold wars: The fight against the common cold. *BMJ: British Medical Journal*, 326(7379), 57.

Elfiky A. A. (2021). SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) targeting: an in silico perspective. *Journal of Biomolecula Structure & Dynamics*, 39(9), 3204–3212.

Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Rossmann, M. G., Fout, G. S., Medappa, K. C., and Rueckert, R. R. (1983). Crystallization of a common cold virus, human rhinovirus 14: "isomorphism" with polio virus crystals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(4), 931–934.

Esneau, C., Bartlett, N., and Bochkov, Y. A. (2019). *Rhinovirus Infections*. Cambridge: Academic Press, 1–23.

Feil, S. C., Hamilton, S., Krippner, G. Y., Lin, B., Luttick, A., McConnell, D. B., Nearn, R., Parker, M. W., Ryan, J., Stanislawski, P. C., Tucker, S. P., Watson, K. G., and Morton, C. J. (2012). An orally available 3-ethoxybenzisoxazole capsid binder with clinical activity against human rhinovirus. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 3(4), 303–307.

Fuchs, R., and Blaas, D. (2010). Uncoating of human rhinoviruses. *Reviews in Medical Virology*, 20(5), 281–297.

Fuchs, R., and Blaas, D. (2012). Productive entry pathways of human rhinoviruses. *Advances in Virology*, 2012, 826301.

Gern, J. E., and Busse, W. W. (1999). Association of rhinovirus infections with asthma. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 9–18.

Glatthaar-Saalmüller B. (2007). In vitro evaluation of the antiviral effects of the homeopathic preparation Gripp-Heel on selected respiratory viruses. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 85(11), 1084–1090.

Glanville, N., and Johnston, S. L. (2015). Challenges in developing a cross-serotype rhinovirus vaccine. *Current Opinion in Virology*, 11, 83–88.

Gonçalves, R. B., Mendes, Y. S., Soares, M. R., Katpally, U., Smith, T. J., Silva, J. L., and Oliveira, A. C. (2007). VP4 protein from human rhinovirus 14 is released by pressure and locked in the capsid by the antiviral compound WIN. *Journal of Molecular Biology*, 366(1), 295–306.

Greve, J. M., Davis, G., Meyer, A. M., Forte, C. P., Yost, S. C., Marlor, C. W., Kamarck, M. E., and McClelland, A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56(5), 839–847.

Griggs, T. F., Bochkov, Y. A., Basnet, S., Pasic, T. R., Brockman-Schneider, R. A., Palmenberg, A. C., and Gern, J. E. (2017). Rhinovirus C targets ciliated airway epithelial cells. *Respiratory Research*, 18(1), 84.

Hayden F. G. (2004). Rhinovirus and the lower respiratory tract. *Reviews in Medical Virology*, 14(1), 17–31.

Heinz, B. A., Rueckert, R. R., Shepard, D. A., Dutko, F. J., McKinlay, M. A., Fancher, M., Rossmann, M. G., Badger, J., and Smith, T. J. (1989). Genetic and molecular analyses of spontaneous mutants of human rhinovirus 14 that are resistant to an antiviral compound. *Journal of Virology*, 63(6), 2476–2485.

Heymann, P. W., Carper, H. T., Murphy, D. D., Platts-Mills, T. A., Patrie, J., McLaughlin, A. P., Erwin, E. A., Shaker, M. S., Hellems, M., Peerzada, J., Hayden, F. G., Hatley, T. K., and Chamberlain, R. (2004). Viral infections in relation to age, atopy and season of admission among children hospitalized for wheezing. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(2), 239–247.

Jackson, D. J., Gangnon, R. E., Evans, M. D., Roberg, K. A., Anderson, E. L., Pappas, T. E., Printz, M. C., Lee, W. M., Shult, P. A., Reisdorf, E., Carlson-Dakes, K. T., Salazar, L. P., DaSilva, D. F., Tisler, C. J., Gern, J. E., and Lemanske, R. F., Jr (2008). Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 178(7), 667–672.

Jackson, D. J., and Gern, J. E. (2022). Rhinovirus infections and their roles in asthma: etiology and exacerbations. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 10(3), 673–681.

Jacobs, S. E., Lamson, D. M., St George, K., and Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 135–162.

Jans, D. A. and Ghildyal, R. (Editörler). (2015). *Rhinoviruses: Methods and Protocols*. United States: Humana Press, 5-7.

Jensen, L. M., Walker, E. J., Jans, D. A., and Ghildyal, R. (2015). Proteases of human rhinovirus: role in infection. *Methods in Molecular Biology*, 1221, 129–141.

Jiang, H., Yang, T., Yang, C., Lu, Y., Yi, Z., Zhang, Q., and Wang, W. (2022). Molecular epidemiology and clinical characterization of human rhinoviruses circulating in Shanghai, 2012-2020. *Archives of Virology*, 167(4), 1111–1123.

Kaiser, L., Crump, C. E., and Hayden, F. G. (2000). In vitro activity of pleconaril and AG7088 against selected serotypes and clinical isolates of human rhinoviruses. *Antiviral Research*, 47(3), 215–220.

Kerr, S. L., Mathew, C., and Ghildyal, R. (2021). Rhinovirus and cell death. *Viruses*, 13(4), 629.

Kumar Biswas, B., Soo Shin, J., Malpani, Y. R., Hwang, D., Jung, E., Bong Han, S., Vishakantegowda, A. G., and Jung, Y. S. (2022). Enteroviral replication inhibition by N-Alkyl triazolopyrimidinone derivatives through a non-capsid binding mode. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 64, 128673.

Laconi, S., Madeddu, M. A., and Pompei, R. (2011). Study of the biological activity of novel synthetic compounds with antiviral properties against human rhinoviruses. *Molecules*, 16(5), 3479–3487.

Lacroix, C., Querol-Audí, J., Roche, M., Franco, D., Froeyen, M., Guerra, P., Terme, T., Vanelle, P., Verdaguer, N., Neyts, J., and Leyssen, P. (2014). A novel benzonitrile analogue inhibits rhinovirus replication. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2723–2732.

Lacroix, C., Laconi, S., Angius, F., Coluccia, A., Silvestri, R., Pompei, R., Neyts, J., and Leyssen, P. (2015). In vitro characterisation of a pleconaril/pirodavir-like compound with potent activity against rhinoviruses. *Virology Journal*, 12, 106.

Lanko, K., Sun, L., Froeyen, M., Leyssen, P., Delang, L., Mirabelli, C., and Neyts, J. (2021). Comparative analysis of the molecular mechanism of resistance to vapendavir across a panel of picornavirus species. *Antiviral Research*, 195, 105-177.

Ledford, R. M., Collett, M. S., and Pevear, D. C. (2005). Insights into the genetic basis for natural phenotypic resistance of human rhinoviruses to pleconaril. *Antiviral Research*, 68(3), 135–138.

Ledford, R. M., Patel, N. R., Demenczuk, T. M., Watanyar, A., Herbertz, T., Collett, M. S., and Pevear, D. C. (2004). VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds. *Journal of Virology*, 78(7), 3663–3674.

Lee, W. M., Monroe, S. S., and Rueckert, R. R. (1993). Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectosome. *Journal of Virology*, 67(4), 2110–2122.

Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., and Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708–D717.

Linsuwanon, P., Payungporn, S., Suwannakarn, K., Chieochansin, T., Theamboonlers, A., and Poovorawan, Y. (2011). Complete coding sequence characterization and comparative analysis of the putative novel human rhinovirus (HRV) species C and B. *Virology Journal*, 8, 5.

McIntyre, C. L., Knowles, N. J., and Simmonds, P. (2013). Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types. *The Journal of General Virology*, 94(8), 1791–1806.

Mello, C., Aguayo, E., Rodriguez, M., Lee, G., Jordan, R., Cihlar, T., and Birkus, G. (2014). Multiple classes of antiviral agents exhibit in vitro activity against human rhinovirus type C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3), 1546–1555.

Nature (2004). Don't catch me if you can. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(5), 385.

Nirwan, S., and Kakkar, R. (2019). Rhinovirus RNA polymerase: structure, function, and inhibitors. *Viral Polymerases*, 19(3), 301–331.

Ortega, H., Nickle, D., and Carter, L. (2021). Rhinovirus and asthma: Challenges and opportunities. *Reviews in Medical Virology*, 31(4), 2193.

Pappas, D. E., Hendley, J. O., Hayden, F. G., and Winther, B. (2008). Symptom profile of common colds in school-aged children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 27(1), 8–11.

Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A., Fraser-Liggett, C. M., and Liggett, S. B. (2009). Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*, 324(5923), 55–59.

Palmenberg, A. C., Rathe, J. A., and Liggett, S. B. (2010). Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(6), 1190–1201.

Palmenberg, A. C., and Gern, J. E. (2015). Classification and evolution of human rhinoviruses. *Methods in Molecular Biology*, 1221, 1–10.

Patick, A. K., and Potts, K. E. (1998). Protease inhibitors as antiviral agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 614–627.

Patick A. K. (2006). Rhinovirus chemotherapy. *Antiviral Research*, 71(2-3), 391–396.

Paul, A. V., vanBoom, J. H., Filippov, D., and Wimmer, E. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393(6682), 280–284.

Pitkäranta, A., Arruda, E., Malmberg, H., and Hayden, F. G. (1997). Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1791–1793.

Powell, K. L., Thomas, E., and Cockerill, G. S. (2017). Antiviral drugs for acute infections. *Comprehensive Medicinal Chemistry III*, 26(9), 665–681.

Price, A. S., and Kennedy, J. L. (2022). T-helper 2 mechanisms involved in human rhinovirus infections and asthma. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of The American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 129(6), 681–691.

Price W. H. (1956). The isolation of a new virus associated with respiratory clinical disease in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 42(12), 892–896.

Racaniello, V.R. (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*. (5. baskı). Philadelphia: Wolters Klewer / Lippincott Williams & Wilkins, 795-838.

Real-Hohn, A., and Blaas, D. (2021). Rhinovirus inhibitors: including a new target, the viral RNA. *Viruses*, 13(9), 1784.

Register, R. B., Uncapher, C. R., Naylor, A. M., Lineberger, D. W., and Colonno, R. J. (1991). Human-murine chimeras of ICAM-1 identify amino acid residues critical for rhinovirus and antibody binding. *Journal of Virology*, 65(12), 6589–6596.

Reisdorph, N., Thomas, J. J., Katpally, U., Chase, E., Harris, K., Siuzdak, G., and Smith, T. J. (2003). Human rhinovirus capsid dynamics is controlled by canyon flexibility. *Virology*, 314(1), 34–44.

Rollinger, J. M., and Schmidtke, M. (2011). The human rhinovirus: human-pathological impact, mechanisms of antirhinovira lagents, and strategies for their discovery. *Medicinal Research Reviews*, 31(1), 42–92.

Rossmann, M. G., Arnold, E., Erickson, J. W., Frankenberger, E. A., Griffith, J. P., Hecht, H. J., Johnson, J. E., Kamer, G., Luo, M., and Mosser, A. G. (1985). Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317(6033), 145–153.

Sinclair, W., and Omar, M. (2022). *Enterovirus*. Treasure Island: StatPearls Publishing, 92-99.

Shepard, D. A., Heinz, B. A., and Rueckert, R. R. (1993). WIN 52035-2 inhibits both attachment and eclipse of human rhinovirus 14. *Journal of Virology*, 67(4), 2245–2254.

Smee, D. F., Evans, W. J., Nicolaou, K. C., Tarbet, E. B., and Day, C. W. (2016). Susceptibilities of enterovirus D68, enterovirus 71, and rhinovirus 87 strains to various antiviral compounds. *Antiviral Research*, 131, 61–65.

Spickler, C., Lippens, J., Laberge, M. K., Desmeules, S., Bellavance, É., Garneau, M., Guo, T., Hucke, O., Leyssen, P., Neyts, J., Vaillancourt, F. H., Décor, A., O'Meara, J., Franti, M., and Gauthier, A. (2013). Phosphatidylinositol 4-kinase III beta is essential for replication of human rhinovirus and its inhibition causes a lethal phenotype *in vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3358–3368.

Strikas, R. A., Anderson, L. J., and Parker, R. A. (1986). Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. *The Journal of Infectious Diseases*, 153(2), 346–351.

Stanway, G., Hughes, P. J., Mountford, R. C., Minor, P. D., and Almond, J. W. (1984). The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Research*, 12(20), 7859–7875.

Stobart, C. C., Nosek, J. M., and Moore, M. L. (2017). Rhinovirus biology, antigenic diversity, and advancements in the design of a human rhinovirus vaccine. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2412.

Sun, L., Delang, L., Mirabelli, C., and Neyts, J. (2017). *In vitro* assay to assess efficacy of potential antiviral compounds against enterovirus D68. *Bio-protocol*, 7(6), e2183.

Tam, J. C., Bidgood, S. R., McEwan, W. A., and James, L. C. (2014). Intracellular sensing of complement C3 activates cell autonomous immunity. *Science*, 345(6201), 1256070.

Thibaut, H. J., Leyssen, P., Puerstinger, G., Muigg, A., Neyts, J., and De Palma, A. M. (2011). Towards the design of combination therapy for the treatment of enterovirus infections. *Antiviral Research*, 90(3), 213–217.

Thibaut, H. J., De Palma, A. M., and Neyts, J. (2012). Combating enterovirus replication: state-of-the-art on antiviral research. *Biochemical Pharmacology*, 83(2), 185–192.

To, K., Yip, C., and Yuen, K. Y. (2017). Rhinovirus-from bench to bed side. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(7), 496–504.

Touabi, L., Aflatouni, F., and McLean, G. R. (2021). Mechanisms of rhinovirus neutralisation by antibodies. *Viruses*, 13(3), 360.

Triantafilou, M., Ramanjulu, J., Booty, L. M., Jimenez-Duran, G., Keles, H., Saunders, K., Nevins, N., Koppe, E., Modis, L. K., Pesiridis, G. S., Bertin, J., and Triantafilou, K. (2022). Human rhinovirus promotes STING trafficking to replication organelles to promote viral replication. *Nature Communications*, 13(1), 1406.

Turner R. B. (1997). Epidemiology, pathogenesis, and treatment of the common cold. *Annals of allergy, asthma & immunology: Official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 78(6), 531–540.

Van der Linden, L., Wolthers, K. C., and van Kuppeveld, F. J. (2015). Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses. *Viruses*, 7(8), 4529–4562.

Van Dycke, J., Rymenants, J., Neyts, J., and Rocha-Pereira, J. (2021). Assessment of the anti-norovirus activity in cell culture using the mouse norovirus: Identification of active compounds. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 29, 20402066211026852.

Vlasak, M., Goesler, I., and Blaas, D. (2005). Human rhinovirus type 89 variants use heparan sulfate proteoglycan for cell attachment. *Journal of Virology*, 79(10), 5963–5970.

Wade, R. C., and McCammon, J. A. (1992). Binding of an antiviral agent to a sensitive and a resistant human rhinovirus. Computer simulation studies with sampling of amino acid side-chain conformation. I. Mapping the rotamers of residue 188 of viral protein 1. *Journal of Molecular Biology*, 225(3), 679–696.

Wells, A. I., and Coyne, C. B. (2019). Enteroviruses: a gut-wrenching game of entry, detection, and evasion. *Viruses*, 11(5), 460.

EKLER

Ek-1. Mektup

KU LEUVEN

REGA INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, IMMUNOLOGY AND TRANSPLANTATION
HERESTRAAT 49
3000 LEUVEN, BELGIË

OURREFERENCE
YOURREFERENCE
LEUVEN June 30th, 2022

To whom it may concern

I am Professor of Virology at the Department of Microbiology, Immunology and Transplantation of the University of Leuven (KU Leuven) in Belgium. I teach medical virology and my laboratory (www.antivirals.be) has a focus on the development of antiviral and vaccine strategies, in particular against neglected and emerging viruses.

With this letter, I would like to grant Aytug Meric (date of birth: May 12th, 1989), who has been an intern in my laboratory from November 22nd, 2021 until May 22nd, 2022, permission to use the research data. All data involves in the results of a program to select for drug-resistant variants of inhibitors of rhinoviruses.

Please do not hesitate to contact me in case you would need further information,

Sincerely yours,

Johan Neyts
Professor of Virology

Gazili olmak ayrıcalıktır...