T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

COVID-19 KONVALESAN BİREYLERDE OMİCRON VARYANTINA ÖZGÜ SİTOTOKSİK T HÜCRE YANITLARININ ÖLÇÜLMESİ VE SARS-COV-2 CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARINDA ORİJİNAL ANTİJENİK SİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

AYLİN SEHER UZUNOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SEVGİ KALKANLI TAŞ

İMMÜNOLOJİ ANA BİLİM DALI
İMMÜNOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
ARALIK/2025

İTHAF

“Aileme ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince engin bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, çalışmanın her aşamasında bilimsel katkılarını ve desteğini esirgemeyen, karşılaştığım zorluklarda çözüm odaklı yaklaşımıyla yanımda olan değerli danışman hocam İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın deneysel aşamalarını laboratuvarında yürütmemi sağlayan, gerek katılımcıların çalışmaya dahil edilmesi sürecinde gerekse laboratuvar sarf malzemelerinin temininde sunduğu imkanlarla çalışmamın tamamlanmasına büyük katkı sunan, her aşamada akademik desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün IŞIKSAÇAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın klinik aşamasını yürütmeme olanak sağlayan, süreç boyunca her zaman anlayışlı ve destekleyici yaklaşımıyla yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği'nden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye KART YAŞAR'a ve katkıda bulunan bütün klinik hemşirelerine şükranlarımı sunarım.

Tezimin en yoğun geçen deneysel süreçlerinde, akan hücre ölçer analizlerinde ve laboratuvar aşamalarında her zaman yanımda olan, tez çalışmamla kendi çalışmaları gibi ilgilenip yardımlarıyla yükümü hafifleten, kendilerinden çok şey öğrendiğim sevgili arkadaşlarım Tamay Seda TAŞÇI ve Melis İrem KUYAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, Tıbbi Biyokimya Birimi, Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı/ Flow Sitometri Laboratuvarı çalışanlarından Evrim YILMAZ, Hatice KINALI ve Havva KAŞIKÇI'ya ve özellikle katılımcıların çalışmaya dahil edilmesi sürecindeki özverili yardımlarından dolayı Songül İNCEOKUR'a teşekkür ederim.

Akademik yolculuğumda bilgi ve tecrübelerinden, sadece bir arkadaş olarak değil, aynı zamanda bir meslektaş olarak da oldukça istifade ettiğim; kendisinden çok şey öğrendiğim ve gerçekleştirdiğimiz verimli bilimsel tartışmalarla ufkumu açan; yoğun bilgi alışverişlerimizle tezimin bilimsel altyapısını zenginleştiren, immünfenotipleme deneylerimin optimizasyonu ve malzeme tedarik ağının oluşturulması konularında paha biçilemez yardımlarını esirgemeyen dostluğuyla her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Bengü AKÇAM ÇELİK'e çok teşekkür ederim.

Çalışmanın planlaması aşamasındaki, özellikle antikor panelinin oluşturulması konusundaki değerli katkıları ve desteği için Pınar ATAR'a çok teşekkür ederim. Sağlık Bilimleri Üniversitesi'nde yürüttüğüm deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları ve desteği için Sibel KURAŞ'a çok teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca sadece manevi desteğiyle değil, laboratuvar malzemelerinin temininde karşılaştığım lojistik engelleri aşmamda gösterdiği üstün gayret ve analiz aşamalarında kendi teknik imkanlarını cömertçe seferber ederek çalışmamın kesintisiz ilerlemesini sağlayan değerli arkadaşım Sümeyya ÇAPUK'a ve kardeşi Betül ÇAPUK'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm deney ve analiz aşamalarını başından sonuna kadar birlikte gerçekleştirdiğimiz, benim için sadece bir kardeş değil, aynı zamanda en güvenilir çalışma ortağı olan kıymetli meslektaşım ve ikiz kardeşim Merve Saide UZUNOĞLU'na teşekkür ederim.

Son olarak; bu zorlu sürecin her aşamasında yanımda olan kıymetli aileme ve karşılaştığım engellere, uykusuz gecelere ve zaman zaman hissettiğim tükenmişliğe rağmen pes etmeyen, içindeki başarma inancını ve azmini hiç kaybetmeyen, düştüğü her an yeniden ayağa kalkarak bu eseri tamamlayan kendime teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim süresince 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında sağladıkları burs desteği ile hayatımı idame ettirmeme ve çalışmalarıma odaklanmama olanak sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı'na (BİDEB) teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince 100/2000 YÖK Doktora Bursu, Enfeksiyon Hastalıklarının İmmünolojisi alt alanı kapsamında sağladıkları burs desteğinden dolayı Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜSEB 2023-A3-02 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında 37756 Proje Nolu "COVID-19 Konvalesan Bireylerde Omicron Varyantına Özgü Sitotoksik T Hücre Yanıtlarının Ölçülmesi ve SARS-CoV-2 CD8+ T Hücre Epitoplarında Orijinal Antijenik Sin Rolünün Araştırılması" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (TÜSEB) teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vii
TABLOLAR LİSTESİ xi
ŞEKİLLER LİSTESİ xii
SİMGELER VE KISALTMALAR xv
ÖZET xvii
ABSTRACT xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ 21
2. GENEL BİLGİLER 24
2.1. CORONAVİRÜS AİLESİ VE SARS-CoV-2 24
2.1.1. Koronavirüslerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırması 24
2.1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısal Özellikleri ve Genom Organizasyonu 24
2.1.2.1. Spike (S) proteini ve immünojenik önemi 24
2.1.3. Viral Replikasyon Döngüsü ve Konak Hücreye Giriş 25
2.2. SARS-CoV-2 VARYANTLARI VE EVRİMİ 25
2.2.1. Endişe Verici Varyantlar (VOC) ve İzlenmesi Gereken Varyantlar (VOI) 26
2.2.1.1. Endişe verici varyantlar 26
2.2.1.2. İzlenmesi gereken varyantlar 26
2.2.2. Omicron Varyantı (B.1.1.529) ve Alt Soylarının Mutasyon Profilleri (BA.2, BA.5, JN.1, XEC) 27
2.2.3. Omicron Alt Soylarının Analizi 27
2.2.3.1. BA.2 Alt Soyu 27
2.2.3.2. BA.5 Alt Soyu 28
2.2.3.3. JN.1 Alt Soyu 28
2.2.3.4. XEC Alt Soyu 28
2.2.4. Varyantların İmmün Kaçış Mekanizmaları 28
2.2.4.1. Spike proteinindeki mutasyonlar 29
2.2.4.2. Antijenik sapma (antigenic drift) 29
2.2.4.3. CD8+ T hücresi epitop kaybı 29
2.2.4.4. Nötralizan antikordan kaçış 29
2.2.4.5. Reseptör afinitesi modülasyonu 29
2.2.4.6. Terapötiklerden kaçış 30

2.3. VİRAL ENFEKSİYONLARA KARŞI İMMÜN YANIT 30
2.3.1. Doğal Bağışıklık 30
2.3.1.1. Fiziksel bariyerler 30
2.3.1.2. Hücresel yanıtlar 30
2.3.1.3. Sitokin salınımı 31
2.3.2. Edinsel Bağışıklık 31
2.3.2.1. T Hücresi aracılı bağışıklık 31
2.3.2.2. B Hücresi aracılı bağışıklık 31
2.4. VİRAL EVRİM YOLUYLA İMMÜN MODÜLASYON 32
2.4.1. İmmün Kaçış Mekanizmaları 32
2.4.2 İmmün İmprinting (Bağışıklık İzi) 32
2.5. CD8+ SİTOTOKSİK T LENFOSİTLERİ (CTL) 33
2.5.1. Efektör CD8+ T Hücreleri 33
2.5.2. Bellek CD8+ T Hücreleri 33
2.6. CD8+ T HÜCRELERİNİN İŞLEVLERİ 34
2.6.1. Viral Klirens (Temizlenme) 34
2.6.2. İmmün Belleğin Korunması 34
2.6.3. Çapraz Reaktivite ve Uyarlanabilirlik 34
2.7. CD8+ T HÜCRELERİNİN AKTİVASYONU VE EFEKTÖR FONKSİYONLARI 35
2.7.1. CD8+ T Hücrelerinin MHC Sınıf I Yoluyla Antijen Sunumu ve Aktivasyonu 35
2.7.2. Genişleme (Ekspansiyon) ve Farklılaşma 35
2.7.3. CD8+ T Hücrelerinin Efektör Fonksiyonları 36
2.7.4. MHC Sınıf I Antijen Sunumu ve TCR Tanıması Arasındaki Etkileşimi 36
2.8. T HÜCRESİ BELLEK GELİŞİMİ VE ALT POPÜLASYONLARI 37
2.8.1. T Hücresi Bellek Gelişimi 37
2.8.2. T Hücresi Alt Popülasyonları 38
2.9. AKAN HÜCRE ÖLÇER ANALİZİ 38
2.10. T HÜCRESİ AKTİVASYON BELİRTEÇLERİ VE ÖNEMİ 39
2.11. SARS-CoV-2'YE ÖZGÜ T HÜCRESİ YANITLARI: CD8+ T HÜCRELERİNİN ROLÜ 40
2.11.1. Akut Enfeksiyon Sırasında CD8+ T Hücresi Yanıtı 40
2.11.2. Konvalesan Bireylerde Uzun Süreli Belleğin Kurulması 41
2.11.3. Aşı Kaynaklı ve Enfeksiyon Kaynaklı T Hücre Bağışıklığı 41
2.11.4. Viral Varyantlara Karşı T Hücresi Çapraz Reaktivitesi 42
2.12. İMMÜNOLOJİK İMPRİNTİNG VE ORİJİNAL ANTİJENİK SİN'E GENEL BAKIŞ 42
2.12.1. Viral Enfeksiyonlarda OAS Mekanizmaları 43

2.12.2. SARS-CoV-2 ve COVID-19 Kapsamında Orijinal Antijenik Sin.....43
2.13. İMMÜNOİNFORMATİK VE EPİTOP ANALİZİ.....44
2.13.1. T Hücresi Epitop Tahmin Algoritmaları: NetMHCpan.....44
2.13.2. HLA Polimorfizminin Popülasyon Kapsayıcılığı Açısından Oluşturduğu Zorluklar.....45
2.13.3. İmmün Kaçış ve Epitop Korunumunu Analiz Etmek İçin *In Silico* Yöntemler.....45
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....47
3.1. ÇALIŞMA KAPSAMI VE ETİK İZİN.....47
3.2. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLECEK KATILIMCILARIN BELİRLENMESİ.....47
3.2.1. Birinci Çalışma Grubu (Grup 1, Wt (+)).....48
3.2.2. İkinci Çalışma Grubu (Grup 2, Wt (-)).....48
3.3. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....49
3.4. PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU.....49
3.5. SARS-CoV-2 PEPTİD HAVUZLARI İLE T HÜCRE STİMÜLASYONU.....50
3.5.1. T Hücre Stimülasyonu için Kullanılan Peptit Havuzları.....50
3.5.1.1. Wild Type referans havuzu.....50
3.5.1.2. Mutasyon referans havuzu.....50
3.5.2. T Hücre Stimülasyon Protokolü.....51
3.6. BELLEK CD8+ T HÜCRELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN İMMÜNOFENOTİPLEME.....52
3.7. ORİGİNAL ANTİJENİK SİN'NİN SARS-CoV-2 CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİ ARAŞTIRILMASI.....57
3.8. BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1, VE XEC VARYANTLARININ DENEYSEL OLARAK TANIMLANMIŞ CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZİ.....57
3.8.1. Seçilen HLA Sınıf I allelleri.....60
3.9. NİCEL ANALİZ VE KARŞILAŞTIRMALAR.....60
3.10. HESAPLAMALI ANALİZ VERİLERİ VE KOD ERİŞİLEBİLİRLİĞİ.....67
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....69
4. BULGULAR.....70
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....70
4.2. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE SPIKE-SPESİFİK CD8+ T HÜCRE POPÜLASYONLARININ ÖLÇÜLMESİ.....72
4.3. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE $CD8^+$ T HÜCRELERİNİN BELLEK ALT POPÜLASYONLARININ DAĞILIMI VE GRUP KARŞILAŞTIRMALARI.....77
4.4. KORELASYON ANALİZLERİ.....88
4.5. VARYANT-SPESİFİK MUTASYONLARIN DENEYSEL CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ.....90

4.6. OMİCRON ALT VARYANTLARINA AİT İMMÜNOJENİK VE İMMÜNODOMİNANT EPİTOPLARIN HLA SINIF I BAĞLANMA ANALİZİ 105
5. TARTIŞMA 126
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 137
KAYNAKLAR 140
EKLER 149

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Akan hücre ölçer ile T hücre immünfenotipleme çalışması için kullanılan antikor paneli 53

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler, cihazlar, yazılım ve algoritmalara ait bilgiler 56

Tablo 4.1: Çalışma grubuna dahil edilen toplam 94 katılımcının demografik ve klinik parametreleri 70

Tablo 4.2: Bellek CD8+ T hücre alt tiplerinin gruplar arası kantitatif karşılaştırılması 81

Tablo 4.3: Wt(+) ve Wt(–) bireylerde, wild type (S^{WT}), Omicron (S^{O}) stimülsyonları ve stimüle edilmemiş (Neg) gruplarında bellek hücre frekanslarının karşılaştırmalı analizi ... 87

Tablo 4.4: SARS-CoV-2 varyantlarında saptanan CD8+ T hücresi epitoplarının wild type suş ile korunum düzeyleri ve eşleşmeyen epitoplar 96

Tablo 4.5: Omicron alt varyantlarının varyant belirleyici spike proteini mutasyonları 97

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: T hücre aktivasyonu ve hafıza T hücreleri immün fenotiplemesine ait kapılama stratejisi gösterilmiştir.....55

Şekil 3.2: Temmuz 2025 GISAID verilerine göre SARS-CoV-2 varyantlarının küresel yayılımı ve bölgesel sıklık değişimleri. 58

Şekil 4.1: Katılımcıların aşılanma geçmişlerinin gruplar arasındaki dağılımı...……..…. 71

Şekil 4.2: Wt(+) ve Wt(-) gruplarında total CD8+ T hücre frekansları…...……...…..73

Şekil 4.3: SARS-CoV-2-spesifik CD8+ T hücreleri stimüle edilmemiş örnekte, pozitif kontrolde, wild type havuzu (S^{WT}) ve omicron havuzu (S^{O}) ile stimüle edilmiş örneklerdeki hücre popülasyonları gösterilmektedir.....74

Şekil 4.4: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında CD8+CD69+CD137+ T hücre frekansları.....75

Şekil 4.5: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde CD8+ T hücrelerinde antijen-spesifik aktivasyonundan sonra NAIVE (CD45RA+CCR7+CD27+) hücre popülasyonunun karşılaştırılması.....76

Şekil 4.6: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında, SARS-CoV-2 spike antijenlerine yanıt olarak aktive olan (CD69+CD137+) CD8+ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının yüzdelik frekansları.....79

Şekil 4.7: Bellek CD8+ T hücre alt popülasyonlarının antijen spesifik yanıt dinamikleri...83

Şekil 4.8: Wt(+) ve Wt(–) gruplarında, SARS-CoV-2 wild type (S^{WT}) veya Omicron (S^{O}) spesifik CD8+ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı dağılımları.....85

Şekil 4.9: Wt(+) **(A)** ve Wt(-) **(B)** çalışma gruplarında Wild type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) varyantlarına özgü CD8+ T hücresi yanıtları arasındaki ilişkinin analizi.....89

Şekil 4.10: IEDB ImmunomeBrowser veritabanı kullanılarak, wild type ve seçili Omicron alt varyantlarına (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) ait Spike proteinleri üzerindeki immünojenik bölgeler taranmış ve CD8 T hücresi epitop yanıt sıklıklarının görselleştirilmesi..... 91

Şekil 4.11: SARS-CoV-2 varyantları ve wild type suş arasındaki CD8+ T hücresi epitop repertuvarlarının karşılaştırmalı analizi.....94

Şekil 4.12: Varyantlar arası spike mutasyon profillerinin karşılaştırılması ve mutasyonların wild type CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki etkisi..... 100

Şekil 4.13: Varyantlar arası CD8+ T hücresi epitoplarının konumsal haritalanması ve durum analizi..... 101

Şekil 4.14: İncelenen SARS-CoV-2 varyantlarında T hücresi epitopları ile ilişkili mutasyonların varlık-yokluk haritası.....104

Şekil 4.15: Wild type SARS-CoV-2 ve seçili varyantlar arasındaki güçlü bağlayıcı CD8+ T hücresi peptit-allel çiftlerinin karşılaştırmalı analizi.....106

Şekil 4.16: HLA Sınıf I allelleri için SARS-CoV-2 varyantları arasında güçlü bağlayıcı epitop sayılarının karşılaştırılması.....107

Şekil 4.17: Wild type, BA.2.86 ve JN.1 varyantları için HLA Sınıf I allelleri bazında güçlü bağlayıcı epitop dağılımı.....110

Şekil 4.18: NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC varyantları için HLA Sınıf I allelleri bazında güçlü bağlayıcı epitop dağılımı.....111

Şekil 4.19: SARS-CoV-2 varyantları arasında epitop-HLA allel çifti korunumu ve kaybının karşılaştırmalı analizi..... 113

Şekil 4.20: Seçilmiş epitop-HLA çiftlerinin SARS-CoV-2 varyantları arasındaki korunma ve kayıp profilleri.....116

Şekil 4.21: JN.1/BA.2.86'da korunup yeni varyantlarda kaybolan epitop-HLA çiftlerinin pozisyonel ve fonksiyonel domain haritalaması..... 117

Şekil 4.22: NetMHCpan ≤1 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı.....119

Şekil 4.23: NetMHCpan ≤0,5 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı.....120

Şekil 4.24: NetMHCpan ≤0,1 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı.....121

Şekil 4.25: En güçlü bağlayıcıları (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) temsil eden, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı.....122

Şekil 4.26: En güçlü bağlayıcı (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arası doğrulaması (Bölüm 1/2).....124

Şekil 4.27: En güçlü bağlayıcı (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arası doğrulaması (Bölüm 2/2)..... 125

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE2 : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2

AIM : Aktivasyon ile İndüklenen Belirteç

APC : Antijen Sunan Hücre

BIDEB : Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı

CTL : Sitotoksik T Lenfositi

DMSO : Dimetil Sülfoksit

E : Zarf Proteini

FBS : Fetal Bovin Serum

FSC : İleri Saçılım

GISAID : Global Initiative on Sharing All Influenza Data

HLA : Human Leukocyte Antigen (İnsan Lökosit Antijeni)

ICS : Hücre İçi Sitokin Boyama

IEDB : Immune Epitope Database

IFN-γ : İnterferon-gama

IL-2 : İnterlökin 2

M : Membrane Proteini

MHC : Majör Histokompatibilite Kompleksi

N : Nükleokapsid Proteini

NK : Doğal Öldürücü Hücre

NTD : N-Terminal Domain (N-Terminal Bölgesi)

OAS : Orijinal Antijenik Sin

ORF : Open Reading Frame

PKMH : Periferik Kan Mononükleer Hücre

PRR : Patern Tanıma Reseptörü

RBD : Reseptör Bağlanma Alanı

RBM : Reseptör Bağlanma Motifi

RPMI : Roswell Park Memorial Institute (Hücre Kültürü Medyumu)

S : Spike Proteini

SARS-CoV-2: Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs-2

SSC : Side Scatter (Yan Saçılım)

TCM : Merkezi Bellek T Hücreleri

TCR : T Hücre Reseptörü

Teff : Effector T Cell (Efektör T Hücresi)

TEM : Efektör Bellek T Hücreleri

TEMRA : Terminal Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri

TLR : Toll-like Receptor (Toll-benzeri Reseptör)

TNAIVE : Naif T Hücreleri

TNF-α : Tümör Nekroz Faktörü-alfa

TSCM : Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücresi

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

TÜSEB : Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı

VOC : Endişe Verici Varyant

VOI : İzlenmesi Gereken Varyant

Wt : Wild Type

COVID-19 KONVALESAN BİREYLERDE OMİCRON VARYANTINA ÖZGÜ SİTOTOKSİK T HÜCRE YANITLARININ ÖLÇÜLMESİ VE SARS-COV-2 CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARINDA ORİJİNAL ANTİJENİK SİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, COVID-19 konvalesan bireylerde SARS-CoV-2 Wild-type ve Omicron varyantlarına özgü bellek CD8+ T hücre yanıtlarının frekansını ve özgüllüğünü belirlemek; önceki enfeksiyon öyküsünün bu yanıtlar üzerindeki etkisini ve Orijinal Antijenik Sin fenomeninin hücresel bağışıklık üzerindeki rolünü deneysel ve hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya dahil edilen katılımcılardan izole edilen PKMH'ler, SARS-CoV-2 Wild-type ve Omicron Spike peptit havuzları ile *in vitro* stimüle edilmiştir. CD8+ T hücrelerinin aktivasyon profillerinin ve bellek alt popülasyonlarının immünofenotiplemeleri çok renkli akan hücre ölçer yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalı biyoloji analizleriyle, OAS fenomeninin etkilerini araştırmak amacıyla Python tabanlı bir pipeline ve NetMHCpan-EL-4.1 algoritması kullanılarak varyant-spesifik mutasyonların epitoplar üzerindeki etkisi, bağlanma afinitesi ve epitop kayıpları incelenmiştir. Bu analizler ile, potansiyel CD8+ T hücre epitopları tanımlanmış; farklı varyantlar arasında çapraz reaktif olma potansiyeli taşıyan epitoplar ile immünodominant, immünojenik, korunmuş, HLA-kısıtlı epitoplar belirlenmiştir.

Bulgular: Her iki çalışma grubunda da varyantlara karşı güçlü CD8+ T hücre yanıtları tespit edilmiştir. Merkezi bellek CD8+ T hücrelerinin, Omicron varyantına karşı Wild-type suşuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek aktivasyon gösterdiği saptanmıştır. Wt(-) grupta Wild-type antijenine karşı çapraz reaktif yanıtların varlığı, hücresel bağışıklığın varyantlar arasında korunduğunu göstermiştir. Biyoinformatik analizlerde, varyantlar arasında epitopların %98'den fazlasının korunduğu, ancak immünolojik açıdan kritik olan Reseptör Bağlanma Bölgesi'nde yoğun epitop kayıplarının yaşandığı belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma, Omicron varyantlarının CD8+ T hücre epitoplarında kısmi kayıplara neden olsa da, hücresel bağışıklığın büyük ölçüde korunduğunu ve bellek T hücrelerinin varyantları tanıma kapasitesinin sürdüğünü ortaya koymaktadır. Enfeksiyon geçmişinin bağışıklık yanıtını şekillendirdiği ve yeni varyantlara karşı gelişen yanıtların çapraz reaktivite ile desteklendiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bellek CD8+ T Hücreleri, İmmünoinformatik, NetMHCpan, Omicron Varyantı, Orijinal Antijenik Sin, SARS-CoV-2

MEASURING OMICRON-SPECIFIC CYTOTOXIC T CELL RESPONSES IN COVID-19 CONVALESCENT INDIVIDUALS AND INVESTIGATING THE ROLE OF ORIGINAL ANTIGENIC SIN IN SARS-CoV-2 CD8+ T CELL EPITOPES

ABSTRACT

Aim: This study aims to determine the frequency and specificity of memory CD8+ T cell responses to SARS-CoV-2 Wild-type and Omicron variants in COVID-19 convalescent individuals. Furthermore, it investigates the impact of prior infection history on these responses and the role of the Original Antigenic Sin phenomenon in cellular immunity, utilizing both experimental and computational biology approaches.

Materials and Methods: PBMCs were stimulated *in vitro* with SARS-CoV-2 Wild-type and Omicron Spike peptide pools. The activation profiles and memory subpopulations of CD8+ T cells were immunophenotyped using multicolor flow cytometry. To investigate the OAS phenomenon computationally, Python-based pipeline and the NetMHCpan-EL-4.1 algorithm were employed to examine the impact of variant-specific mutations on epitopes, including binding affinity changes and epitope loss.

Results: Strong CD8+ T cell responses against both variants were detected in both study groups. Notably, central memory CD8+ T cells exhibited statistically higher activation against the Omicron variant compared to the Wild-type strain. The presence of cross-reactive responses to the Wild-type antigen in the Wt(-) group suggests that cellular immunity is preserved across variants. Bioinformatic analyses revealed that while over 98% of epitopes were conserved among variants, significant epitope loss occurred within the immunologically critical Receptor Binding Domain.

Conclusion: This study demonstrates that despite partial losses in CD8+ T cell epitopes caused by Omicron variants, cellular immunity remains largely intact, and memory T cells retain the capacity to recognize viral variants. We conclude that infection history shapes the immune landscape and that responses to novel variants are supported by cross-reactivity.

Key Words: SARS-CoV-2, Memory CD8+ T Cells, Omicron Variant, Original Antigenic Sin, NetMHCpan, Immunoinformatics

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüs-2 (SARS-CoV-2), 2019 yılının sonlarında ortaya çıkarak küresel bir pandemiye neden olmuş ve Koronavirüs Hastalığı-2019 (COVID-19) olarak adlandırılan ciddi bir halk sağlığı krizine yol açmıştır. Pandeminin başlangıcından bu yana virüs, özellikle Spike (S) glikoproteininde meydana gelen mutasyonlarla evrimleşmeye devam etmiş ve bulaşıcılığı ile immün kaçış potansiyeli yüksek olan çeşitli "Endişe Verici Varyantlar" (Variants of Concern, VOC) ortaya çıkmıştır. Bu varyantlar arasında yer alan Omicron ve alt soyları (BA.2.86, JN.1 vb.), sahip oldukları yüksek mutasyon yükü nedeniyle, önceki enfeksiyonlar veya aşılamalar yoluyla kazanılan nötralizan antikor yanıtlarından kaçabilme yeteneği göstermektedir.

Viral enfeksiyonlara karşı koruyucu bağışıklıkta, hümoral yanıtın (antikorlar) yanı sıra hücresel bağışıklık, özellikle de CD8+ sitotoksik T hücreleri kritik bir rol oynamaktadır. Antikor seviyeleri zamanla azalabilirken veya varyant mutasyonları nedeniyle nötralizasyon kapasitesini yitirebilirken, T hücreleri genellikle virüsün daha korunaklı bölgelerini hedef alarak uzun süreli ve çapraz koruyucu bağışıklık sağlayabilmektedir. Ancak, bağışıklık sisteminin antijenik olarak farklı bir varyantla karşılaştığında, daha önce maruz kaldığı orijinal suşa (wild-type) yönelik bir yanıtı tercih etmesi durumu olan "Orijinal Antijenik Sin" veya immün imprinting fenomeni, yeni varyantlara karşı gelişecek yanıtın kalitesini ve etkinliğini sınırlandırabilir.

Bağışıklık sistemi aynı veya benzer bir antijene yeniden maruz kaldığında, antijeni tanıyan yeni T hücreleri yerine tercihen başlangıçta aktif olan T hücrelerini tekrar aktive edilir. Bu fenomen, aşıların ve tedavilerin etkinliğini ve ayrıca enfeksiyonun seyrini etkileme potansiyeline sahiptir. Bu durum bağışıklık tepkisinin, virüsün mevcut varyantı yerine ilk karşılaşılan antijene doğru eğilimli olmasına neden olabileceğinden, SARS-CoV-2 virüsü kapsamında T hücresi epitoplarını tahmin etme yeteneğini etkileyebilir.

SARS-CoV-2 varyantlarının sürekli evrimi ve toplumdaki bağışıklık geçmişinin (enfeksiyon ve aşılanma kombinasyonları) hibrit bir şekilde gerçekleşmesi, T hücresi yanıtlarının karakterizasyonunu ve OAS fenomeninin bu yanıtlardaki rolünün anlaşılmasını zorunlu kılmaktadır. Özellikle Omicron öncesi

wild-type suşu ile enfekte olmuş bireyler ile sadece Omicron döneminde virüsle karşılaşmış bireylerin immünolojik belleklerinin karşılaştırılması, aşı stratejilerinin güncellenmesi ve gelecekteki varyantlara karşı koruyuculuğun öngörülmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tezin temel amacı, COVID-19 geçirmiş (konvalesan) bireylerde, SARS-CoV-2 Wild-type ve Omicron varyantlarına özgü bellek CD8+ T hücre yanıtlarının frekansını, fenotipik dağılımını ve aktivasyon potansiyelini belirlemektir. Bu kapsamda çalışma, wild-type enfeksiyon geçmişi olan ve olmayan bireylerde hücresel bağışıklık yanıtlarını karşılaştırarak, Orijinal Antijenik Sin (OAS) fenomeninin CD8+ T hücre epitopları üzerindeki etkisini araştırmayı hedeflemektedir.

Bu çalışma doğrultusunda, konvalesan bireylerden izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH), Wild-type ve Omicron Spike peptit havuzlarına karşı gelişen CD8+ T hücre aktivasyonunun (CD69+CD137+) flow sitometri yöntemiyle ölçülmesi ve bellek CD8+ T hücre alt popülasyonlarının (Naive, Merkezi Bellek, Efektör Bellek ve TEMRA) immünofenotipleme ile karakterize edilerek varyant stimülasyonlarına verdikleri yanıtların karşılaştırılması hedeflenmiştir. Buna ek olarak, Wild-type enfeksiyon geçmişinin Omicron varyantına karşı gelişen T hücresi yanıtının büyüklüğü ve kalitesi üzerindeki etkisinin (OAS varlığının) analiz edilmesi ve biyoinformatik ile hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılarak güncel Omicron alt varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) üzerindeki CD8+ T hücresi epitoplarının korunma düzeylerinin, mutasyon profillerinin ve HLA bağlanma afinitelerinin haritalandırılması planlanmıştır. Böylece bu çalışma, hem deneysel verilerle Türk toplumundaki konvalesan bireylerin hücresel bağışıklık profiline ışık tutmayı hem de hesaplamalı analizlerle varyantların immün kaçış potansiyellerine dair kapsamlı bir perspektif sunmayı amaçlamaktadır.

SARS-CoV-2 CD8+ T hücresi epitoplarında orijinal antijenik sin kavramının rolünü araştırmak için biyoinformatik araçlar, epitop tahmin algoritmaları, matematiksel algoritmalar ve modeller gibi hesaplama yöntemleri kullanılmıştır. Hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle, orijinal antijenik sin'in SARS-CoV-2 varyantları arasındaki spike proteininin CD8+ T hücreleri tarafından tanınmasını etkileyip etkilemediği ve immünodominant epitopların belirlenmesi biyoinformatik yöntemlerle araştırılmıştır. Ayrıca SARS-CoV-2 proteinlerinin CD8+ T hücre

epitoplarının tahmin edilmesi ve bunların farklı HLA kısıtlama türleriyle ilişkisinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Bu çok yönlü yaklaşım, SARS-CoV-2'ye karşı bağışıklık yanıtının Türk popülasyonundaki özelliklerini ortaya koymuş, önceki bağışıklığın yeni varyantlara ve hücresel bağışıklık yanıtlarının oluşmasına etkisini anlamamıza katkı sağlamış ve aşı geliştirme stratejileri için bilimsel altyapı sunmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. CORONAVİRÜS AİLESİ VE SARS-CoV-2

2.1.1. Koronavirüslerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırması

Coronavirüsler, *Coronaviridae* ailesine aittir ve *Nidovirales* takımı altında sınıflandırılır. Bu aile, *Orthocoronavirinae* ve *Torovirinae* olmak üzere iki alt aileye ayrılmakta olup; bunlardan ilki (Orthocoronavirinae) Alfa, Beta, Gama ve Delta coronavirüs olmak üzere dört cinsi kapsamaktadır (1,2). Bu virüsler, arasında *Betacoronavirus* cinsi, insanlarda ve özellikle yarasalar ve pangolinler olmak üzere çeşitli hayvan türlerinde yaygın bulaşma ve belirgin patojenite sergileyen, COVID-19'un etkeni SARS-CoV-2'yi içermesiyle dikkat çekmektedir. Coronavirüsler, tipik olarak 26.4 ila 31.7 kb uzunluğunda değişen büyük RNA genomları ve konak hücrelere girişi kolaylaştıran Spike (S) glikoproteinleri ile donatılmış zarflı viryon yapıları ile karakterize edilirler (1,3,4).

2.1.2. SARS-CoV-2'nin Yapısal Özellikleri ve Genom Organizasyonu

SARS-CoV-2, konak hücre zarından köken alan bir lipid çift katmanı ile çevrili olmasıyla diğer coronavirüslere benzer bir yapıya sahiptir ve çoklu yapısal proteinler barındırır: spike (S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsid (N) proteinleri (4). S proteini, reseptör tanımada kritik bir rol oynaması ve özellikle anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'ye (ACE2) bağlanması nedeniyle özellikle önemlidir (5). SARS-CoV-2 genomu, viral replikasyonu ve transkripsiyonu kolaylaştıran yapısal olmayan proteinleri kodlayan ORF1a ve ORF1b de dahil olmak üzere çeşitli açık okuma çerçevelerinden (ORF) oluşur (4).

2.1.2.1. Spike (S) proteini ve immünojenik önemi: SARS-CoV-2'nin S proteini, viral tutunma ve konak hücrelere giriş için hayati önem taşıyan trimerik bir glikoproteindir. Bu protein iki alt birimden oluşur: ACE2 ile etkileşime giren reseptör bağlanma alanını (RBD) içeren S1 ve membran füzyonunu kolaylaştıran S2 (6). Spike proteininin immünojenik önemi yadsınamaz derecede büyüktür; S1 alt birimi içindeki

RBD, nötralizan antikorlar için birincil hedef olarak kabul edilmektedir (2,6). Araştırmalar, COVID-19 hastalarındaki nötralizan antikorların yaklaşık %90'ının bu spesifik bölgeyi hedeflediğini göstermiştir (2).

Spike proteinindeki mutasyonlar, özellikle endişe verici varyantlarda (VOC), nötralizan antikorlardan kaçma kapasitesi göstermiştir. Örneğin çalışmalar, B.1.351 gibi varyantların, RBD içinde nötralizan antikorlara direnç kazandırabilen değişiklikler sergilediğini belirtmiştir (7). Bu durum, aşı tasarımlarını ve terapötik stratejileri buna göre uyarlamak adına spike proteinindeki mutasyonların sürekli olarak izlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

2.1.3. Viral Replikasyon Döngüsü ve Konak Hücreye Giriş

SARS-CoV-2'nin replikasyon döngüsü, spike proteininin konak hücrelerdeki ACE2 reseptörüne bağlanmasıyla başlar; ardından virüs, endositoz veya spike proteininin S2 alt birimi tarafından kolaylaştırılan doğrudan membran füzyonu yoluyla içeri girer (8). Girişi takiben, viral RNA genomu konak sitoplazmasına salınır ve burada viral replikasyon kompleksini oluşturan yapısal olmayan proteinlere transle edilir (çevrilir). Bu kompleks daha sonra viral genomun transkripsiyonunu ve replikasyonunu kolaylaştırır (4,6).

Ardından; spike, zarf ve membran proteinleri de dahil olmak üzere yeni yapısal proteinler sentezlenir ve konak hücre sitoplazmasında viral RNA ile bir araya getirilir (4). Yeni oluşan viryonlar nihayetinde hücre zarına taşınır ve komşu hücreleri enfekte etmek üzere veziküler ekzositoz yoluyla salınır; böylece replikasyon döngüsü sürdürülür (1,8).

2.2. SARS-CoV-2 VARYANTLARI VE EVRİMİ

SARS-CoV-2, ortaya çıkışından bu yana önemli evrimsel değişiklikler geçirmiştir. SARS-CoV-2 varyantları temel olarak iki gruba ayrılmaktadır: Endişe Verici Varyantlar (VOC - Variants of Concern) ve İzlenmesi Gereken Varyantlar (VOI - Variants of Interest). Bu sınıflandırma; artmış bulaşıcılık, virülans ve önceki enfeksiyonlar veya aşılar tarafından oluşturulan bağışıklık yanıtlarından kaçma yeteneği nedeniyle bu varyantların halk sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini yansıtmaktadır.

SARS-CoV-2'nin evrimi, virüsün yüksek mutasyon oranı, konak bağışıklık yanıtından gelen seçici baskı ve popülasyonlar içindeki artan bulaşma dinamikleri gibi çeşitli faktörler tarafından yönlendirilmektedir. SARS-CoV-2'nin ayda yaklaşık iki mutasyonluk tahmini bir oranla mutasyon kazandığı gösterilmiştir (9). Yeni varyantların ortaya çıkışı, genellikle reseptör bağlanmasının iyileşmesi ve artan bulaşıcılık gibi seçici avantajlarla ilişkilidir; bu durum esas olarak Spike proteininde yer alan mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (10). Bu mutasyonlar, farklı viral soyların bağımsız olarak benzer mutasyonlar kazandığı ve böylece insan popülasyonlarındaki enfeksiyon yeteneklerini artırdığı yakınsak evrim (convergent evolution) gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla ortaya çıkabilir (11).

2.2.1. Endişe Verici Varyantlar (VOC) ve İzlenmesi Gereken Varyantlar (VOI)

2.2.1.1. Endişe verici varyantlar: Bulaşıcılıkta, hastalık şiddetinde veya aşı kaynaklı antikorlar tarafından nötralizasyonda önemli değişiklikler gösteren varyantlar, Endişe Verici Varyantlar olarak tanımlanmaktadır. Bu grupta yer alan önemli varyantlardan biri olan ve ilk kez Birleşik Krallık'ta tanımlanan Alfa varyantı (B.1.1.7), reseptör bağlama alanında ACE2 reseptörüne bağlanma afinitesini artırarak bulaşıcılığın yükselmesine yol açan bir mutasyon (N501Y) içermektedir (10). Güney Afrika'da tespit edilen Beta varyantı (B.1.351), nötralizan antikorlara direnç kazandıran E484K gibi mutasyonlara sahiptir ve laboratuvar çalışmaları bu varyantın bazı terapötik antikorlardan kaçabildiğini göstermiştir (12). Brezilya'da ortaya çıkan Gama varyantı (P.1), S proteininde bulaşıcılığı ve immün kaçış özelliklerini artıran çeşitli mutasyonlar barındırırken (13); Hindistan'da tanımlanan Delta varyantı (B.1.617.2), artmış bulaşıcılık ve hastalık şiddeti ile ilişkilendirilmiş olup mevcut aşı kaynaklı bağışıklığa karşı önemli zorluklar oluşturmaktadır (14,15). Ayrıca, benzeri görülmemiş sayıda mutasyona sahip olan, özellikle Spike proteinindeki değişikliklerle ACE2'ye daha güçlü bağlanabilen ve önceki enfeksiyonlar ile aşılamadan kaynaklanan bağışıklıktan önemli ölçüde kaçabilen Omicron varyantı (B.1.1.529) da bu kategoride yer almaktadır (9,15).

2.2.1.2. İzlenmesi gereken varyantlar: Virüs özelliklerini etkileyeceği öngörülen veya bilinen genetik değişikliklere sahip olan ancak henüz VOC olarak

sınıflandırılmak için yeterli kanıt bulunmayan varyantlar, VOI olarak adlandırılır. Bu varyantlar, onları VOC statüsüne yükseltebilecek potansiyel bulaşıcılık veya virülans değişiklikleri açısından yakından izlenmektedir; örneğin, ilk olarak Peru'da tanımlanan Lambda varyantı (C.37), artmış bulaşıcılıkla ilişkili olabilecek mutasyonlara sahip olmakla birlikte, etkisinin tam olarak belirlenmesi için daha fazla veriye ihtiyaç duyulan bir VOI örneğidir (12). Devam eden genomik sürveyans ve araştırmalarla SARS-CoV-2 varyantlarının sınıflandırılması evrilmeye devam etmektedir. VOC ve VOI'ler arasındaki farkların anlaşılması, halk sağlığı stratejileri, aşı geliştirme ve COVID-19'a karşı terapötik müdahaleler için kritiktir. Viral giriş ve immün kaçıştaki merkezi rolü nedeniyle Spike proteini, bu gelişmelerin odak noktası olmaya devam etmektedir.

2.2.2. Omicron Varyantı (B.1.1.529) ve Alt Soylarının Mutasyon Profilleri (BA.2, BA.5, JN.1, XEC)

SARS-CoV-2'nin Omicron varyantı (B.1.1.529), 2021 yılının sonlarında ortaya çıkmış olup, viral giriş ve enfeksiyon için kritik öneme sahip olan S proteininde, önemli sayıda mutasyonla karakterize edilmektedir. Bu varyant, her biri bulaşıcılıklarını ve immün kaçış özelliklerini etkileyen belirgin mutasyon profilleri sergileyen BA.2, BA.5, JN.1 ve XEC dahil olmak üzere çeşitli alt soylara evrilmiştir.

2.2.3. Omicron Alt Soylarının Analizi

2.2.3.1. BA.2 Alt Soyu: Sıklıkla "gizli Omicron" olarak adlandırılan BA.2 alt soyu, PCR testlerinde S-geni hedef başarısızlığı ile ilişkilendirilen Spike proteinindeki delesyonu (ΔH69/V70) içermemektedir. BA.2, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli dikkate değer mutasyonlar barındırır:

N679K, Bu mutasyon, Spike proteini kesimi (cleavage) ve füzyon yetenekleri üzerindeki etkileri nedeniyle artan bulaşıcılık ile ilişkilendirilmiştir (16). P681H, Furin kesim bölgesinin yakınında bulunan bu mutasyon, proteolitik işlemeyi modüle ederek viral enfektiviteyi artırabilir (16). Ek Mutasyonlar, Varyantın nötralizan antikorlardan kaçma yeteneğini toplu olarak artırabilen T95I, G142D, G339D ve R346K mutasyonlarını içerir (9).

2.2.3.2. BA.5 Alt Soyu: BA.2'den kısa bir süre sonra ortaya çıkan BA.5, yayılımını artıran mutasyonlarla karakterizedir. Öne çıkan mutasyonlar şunlardır:

L452R, Artmış virülans ve nötralizan antikorlardan kaçış ile ilişkilendirilmiştir (17). F486V ve R157S, İmmün kaçışa ve artmış enfektiviteye katkıda bulunabilir (18). BA.5, monoklonal antikorlarla etkileşimini değiştirerek aşı kaynaklı bağışıklıktan kaçma yeteneğini artıran, Spike proteininde kapsamlı bağlanma değişiklikleri göstermiştir (17).

2.2.3.3. JN.1 Alt Soyu: JN.1 alt soyu, aşağıdaki spesifik mutasyonlarla karakterizedir:

K417N, Ek immün kaçış özellikleri kazandırdığı bilinmektedir (19). L452Q, Önceki varyantlardaki rolüne benzer şekilde, artmış bulaşıcılık ile ilişkilendirilmiştir (17). Bu mutasyonlar, virüsün daha önce bağışıklık kazanmış popülasyonları enfekte etme yeteneğini artırarak mevcut aşılar ve tedaviler için zorluklar oluşturmaktadır (20).

2.2.3.4. XEC Alt Soyu: XEC soyu, potansiyel rekombinasyon olayları nedeniyle ilgi görmüştür ve aşağıdaki mutasyonları içerir:

E484A, Monoklonal antikorların nötralizasyon kapasitesini etkilediği bilinmektedir (21). S371F, Bu mutasyon, ACE2 reseptörleri ile etkileşimi iyileştirerek viral enfektiviteyi muhtemelen artırabilir (9). Ek Mutasyonlar, N501Y gibi mutasyonlar, reseptör bağlanma dinamiklerini değiştirmedeki rolleri açısından incelenmektedir (22).

Omicron varyantı ve özellikle BA.2, BA.5, JN.1 ve XEC alt soyları, evrimsel uyum yeteneklerini vurgulayan ayırt edici mutasyon profilleri göstermektedirler. Bu adaptasyonlar, varyantın artmış bulaşıcılığını, immün kaçış yeteneğini ve halk sağlığı üzerindeki genel etkisini anlamak için çok önemlidir. Bu varyantlara yönelik süregelen genomik sürveyans ve araştırmalar; aşılamalar, terapötik stratejiler ve halk sağlığı politikaları hakkında bilgi sağlamak için dikkate alınmalıdır.

2.2.4. Varyantların İmmün Kaçış Mekanizmaları

COVID-19'dan sorumlu virüs olan SARS-CoV-2, gelişmiş immün kaçış mekanizmalarına sahip varyantların ortaya çıkmasına yol açan çeşitli mutasyonlar geçirmiştir. Bu varyantların, özellikle aşı etkinliği ve doğal bağışıklık açısından halk sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır.

2.2.4.1. Spike proteinindeki mutasyonlar: SARS-CoV-2'nin S proteini, nötralizan antikorların birincil hedefidir ve virüsün konak hücrelere girişinde kritik bir rol oynar. Birçok varyant, RBD alanında ve spike proteininin antikor direnci sağlayan diğer bölgelerinde mutasyonlar sergiler. Örneğin E484K, N501Y ve K417N gibi mutasyonların immün kaçışı teşvik etmede kilit rol oynadığı belirlenmiştir (23–25). Bu mutasyonlar, spike proteininin konformasyonunu değiştirir ve önceki enfeksiyonlara veya aşılamalara yanıt olarak üretilen nötralizan antikorların bağlanmasını engelleyebilir (26).

2.2.4.2. Antijenik sapma (antigenic drift): Antijenik sapma, viral mutasyonların zamanla birikerek konakçının bağışıklık yanıtından kaçabilen yeni varyantların oluşmasına yol açtığı süreci ifade eder. Çalışmalar, Omicron gibi varyantların, sadece spike proteininde 30'dan fazla mutasyonla önemli ölçüde antijenik sapma sergilediğini ve böylece bağışıklık sistemine sunulan antijenik profili önemli ölçüde değiştirdiğini göstermektedir (25,27). Bu olgu, mevcut aşıların etkinliğini zorlaştırmakta ve bu değişiklikleri hesaba katmak için aşılama stratejilerinde güncellemeler yapılmasını gerektirebilir (27).

2.2.4.3. CD8+ T hücresi epitop kaybı: Varyantlar ayrıca immünodominant epitopları kaybederek CD8+ T hücresi yanıtlarından kaçabilirler. Araştırmalar, bazı Omicron alt varyantlarının, CD8+ T hücreleri tarafından tanınan spesifik epitopların silinmesine (delesyonuna) yol açan mutasyonlara sahip olduğunu göstermektedir (28,29). Bu kayıp, hücresel bağışıklık yanıtını zayıflatabilir ve daha önce enfekte olmuş veya aşılanmış bireylerde viral kalıcılığı (persisdansı) uzatabilir.

2.2.4.4. Nötralizan antikordan kaçış: Delta ve Omicron gibi SARS-CoV-2 varyantları, nötralizan antikorlara karşı önemli direnç gösterir. Çalışmalar, hem BA.1 hem de BA.5 alt varyantlarının, önceki enfeksiyonlardan veya aşılamalardan kaynaklanan nötralizan antikorlardan etkili bir şekilde kaçtığını göstermiştir (30). Bu varyantlardaki kaçış mutasyonları, virüsün kontrol altına alınması için kritik olan hümoral bağışıklık yanıtlarına karşı nötralizasyon aktivitesinde azalmaya yol açar (9,31).

2.2.4.5. Reseptör afinitesi modülasyonu: Dördüncü Bazı mutasyonlar, spike proteininin ACE2 reseptörüne bağlanma afinitesini artırarak, aynı anda nötralizan

antikorlardan kaçarken konak hücrelere girişi kolaylaştırır. Örneğin, N501Y mutasyonu bağlanma afinitesini artırır; bu da bulaşıcılığı ve immün kaçış potansiyelini yükseltir (32,33). Bu çifte avantaj, Omicron gibi varyantları kontrol önlemleri açısından özellikle endişe verici hale getirmektedir.

2.2.4.6. Terapötiklerden kaçış: Dördüncü varyantlar, spike proteininin belirli bölgelerini hedeflemek üzere tasarlanmış terapötik monoklonal antikorlardan kaçma kapasitesi sergilemektedir. Bu durum klinik etkinliklerini etkiler; örneğin Omicron, önceki suşlara karşı etkili olan birkaç monoklonal antikora karşı direnç göstermiştir (9,26). Varyantların sürekli evrimi, etkili terapötik stratejilerin geliştirilmesi konusunda zorluklar yaratmaktadır.

2.3. VİRAL ENFEKSİYONLARA KARŞI İMMÜN YANIT

Viral enfeksiyonlara karşı immün yanıt, hem doğal hem de edinsel bağışıklığı içeren karmaşık ve çok yönlü bir süreçtir. Bu mekanizmaların anlaşılması, SARS-CoV-2 ve varyantları da dahil olmak üzere viral patojenlere karşı etkili aşılar ve terapötik stratejiler geliştirmek için kritiktir.

2.3.1. Doğal Bağışıklık

Doğal bağışıklık, viral enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattı olarak görev yapar. Bu sistem; deri ve mukoza zarları gibi fiziksel bariyerleri, çeşitli doğal bağışıklık hücreleri aracılığıyla gerçekleşen hücresel yanıtları ve sitokinler ile interferonlar gibi sinyal moleküllerinin üretimini kapsar.

2.3.1.1. Fiziksel bariyerler: Başlangıç aşamasındaki viral enfeksiyonlar genellikle virüsün girişini önleyen fiziksel bariyerler tarafından engellenir. Mukozal yüzeyler, özellikle solunum ve gastrointestinal sistemlerde, viral erişimi sınırlamak için hücresel bağlantıları (junctions) kullanan epitel hücreleri ile bir ön savunma hattı oluşturur.

2.3.1.2. Hücresel yanıtlar: Viral girişin ardından; makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal öldürücü (NK) hücreler dahil olmak üzere doğal bağışıklık hücreleri aktive olur. Dendritik hücreler, Toll-benzeri reseptörler (TLR'ler) gibi patern tanıma reseptörleri (PRR'ler) aracılığıyla viral bileşenleri tanımada ve tip I interferonların (IFN'ler) üretimine yol açmada hayati bir rol oynar (34). Bu IFN'ler, komşu hücrelerde

antiviral bir durum indükleyerek viral replikasyonu önler ve genel immün yanıtı modüle eder.

2.3.1.3. Sitokin salınımı: Enfekte hücreler, IL-6, TNF-α ve IFN'ler gibi sitokinler salgılar; bu moleküller diğer bağışıklık hücrelerini enfeksiyon bölgesine çekerek (rekrutman) ve aktive ederek immün yanıtı güçlendirir (35). Bu aktivasyon, enfeksiyonun kontrol altına alınması için kritik olan enflamasyona yol açabilir; ancak aşırı aktif olması durumunda doku hasarına da katkıda bulunabilir.

2.3.2. Edinsel Bağışıklık

Edinsel bağışıklık, viral enfeksiyonlara karşı daha spesifik ve uzun süreli bir yanıt sağlar. Bu sistem, virüsü hedef alan ve ortadan kaldıran T hücrelerinin ve B hücrelerinin aktivasyonunu içerir.

2.3.2.1. T Hücresi aracılı bağışıklık: T lenfositleri, özellikle CD8+ sitotoksik T hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri tanır ve öldürür. Bunu, enfekte hücrelerin yüzeyindeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) molekülleri tarafından sunulan viral peptidleri tanımlayarak gerçekleştirirler. CD4+ yardımcı T hücrelerinin aktivasyonu, CD8+ T hücrelerinin etkili yanıtı için gereklidir ve aynı zamanda B hücresi aracılı antikor üretimine yardımcı olur (36).

2.3.2.1.a. Bellek T hücreleri: Enfeksiyonun iyileşmesinden sonra bellek T hücreleri vücutta varlığını sürdürür ve virüse tekrar maruz kalındığında daha hızlı ve güçlü yanıtlar sağlar. Çalışmalar, virüsteki mutasyonlara rağmen T hücresi yanıtlarının Omicron gibi varyantlara karşı büyük ölçüde korunduğunu göstermiştir (36,37).

2.3.2.2. B Hücresi aracılı bağışıklık: B hücreleri öncelikle virüsleri nötralize eden antikorlar üreterek virüslerin hücrelere girmesini önler ve temizlenmelerini (klirens) kolaylaştırır. Aktivasyon üzerine, bazı B hücreleri virüse özgü antikorlar salgılayan plazma hücrelerine farklılaşırken, diğerleri dolaşımda kalan ve sonraki enfeksiyonlar sırasında hızla yanıt verebilen uzun ömürlü bellek B hücrelerine dönüşür (38).

2.3.2.2.a. Nötralizan antikorlar: Bu antikorlar viral girişi bloke edebilir. Ancak, Omicron gibi varyantlar, önceki enfeksiyonlardan veya aşılamalardan üretilen nötralizan antikorların etkinliğini azaltan mutasyonlar sergileyebilir (26,39).

2.3.2.2.b. Antikora bağımlı hücresel sitotoksisite (ADCC): Bu mekanizma, antikorların enfekte hücreler üzerindeki viral antijenlere bağlanarak onları NK hücreleri ve makrofajlar tarafından yıkım için işaretlemesini içerir (40).

2.4. VİRAL EVRİM YOLUYLA İMMÜN MODÜLASYON

SARS-CoV-2 gibi viral patojenler sürekli olarak evrilir ve bu durum, immün tespitten ve yanıttan kaçabilen varyantların oluşmasıyla sonuçlanır. Özellikle Omicron varyantları, antikorlar tarafından nötralizasyondan kaçabilen ve hem hümoral hem de hücre aracılı bağışıklığı zayıflatan bir dizi mutasyon sergilemektedir (9,30).

2.4.1. İmmün Kaçış Mekanizmaları

Delta ve Omicron gibi varyantlar, hem nötralizan antikor yanıtlarından hem de T hücresi aracılı yanıtlardan kaçma yeteneği göstermiştir. Bu durum şu yollarla gerçekleşir:

- T hücreleri ve antikorlar tarafından tanınan kilit epitoplardaki mutasyonlar (39,41).
- Spike proteini yapısında, reseptör bağlanmasını artırırken immün tanımayı azaltan değişiklikler (42).

2.4.2 İmmün İmprinting (Bağışıklık İzi)

Belirli viral antijenlere tekrarlayan maruziyet, bağışıklık sisteminin varyantlarda bulunan yeni mutasyonlara uyum sağlamak yerine tercihen bu orijinal antijenlere yönelik yanıtları hatırladığı "immün imprinting" durumuna yol açabilir. Bu durum, yeni ortaya çıkan varyantlara karşı aşı etkinliğinin azalmasına katkıda bulunabilir (36,43).

Viral enfeksiyonlara karşı immün yanıt, vücudun patojenleri etkili bir şekilde tanımasını ve ortadan kaldırmasını sağlayan, doğal ve edinsel mekanizmalar arasındaki dinamik bir etkileşimi içerir. Ancak virüslerin, özellikle immün kaçış yetenekleri kazandıran mutasyonlar yoluyla evrimi, önemli zorluklar yaratmaktadır. Bu immünolojik mekanizmalar üzerine yapılacak sürekli araştırmalar, viral enfeksiyonların değişen yapısına uyum sağlayabilen etkili aşı geliştirme ve terapötik stratejiler için elzemdir.

2.5. CD8+ SİTOTOKSİK T LENFOSİTLERİ (CTL)

Sitotoksik T lenfositleri (CTL'ler) olarak da bilinen CD8+ T hücreleri, viral enfeksiyonlara karşı immün yanıtta kritik bir rol oynar. Birincil işlevleri, virüsle enfekte olmuş hücrelerin tanınması ve elimine edilmesidir; bu da edinsel bağışıklık savunmasına önemli ölçüde katkıda bulunur.

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerden köken alan ve timusta olgunlaşma sürecini tamamlayan CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu, birbirini tamamlayan iki kritik sinyalin varlığına bağlıdır. Bu süreçte ilk olarak (Sinyal 1), enfekte hücrelerin veya APC yüzeyindeki MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan spesifik antijenlerin tanınması gerekir. Eş zamanlı olarak, tam bir T hücresi aktivasyonunun sağlanabilmesi için, T hücreleri üzerindeki CD28 reseptörü ile APC'ler üzerindeki B7 molekülleri (CD80/CD86) arasındaki etkileşimden kaynaklanan ko-stimülatör sinyallere (Sinyal 2) ihtiyaç duyulur (44).

Bu aktivasyon mekanizmasının başarıyla gerçekleşmesiyle birlikte klonal genişlemeye (ekspansiyona) uğrayan CD8+ T hücreleri, enfekte hücreleri spesifik olarak tanıma ve elimine etme kapasitesine sahip çok sayıda efektör hücrenin üretilmesini sağlar. CD8+ T hücreleri çeşitli işlevsel alt kümelere farklılaşabilir.

2.5.1. Efektör CD8+ T Hücreleri

Bu hücreler, devam eden bir viral enfeksiyon sırasında sitotoksik etkilerin sağlanmasında aktif olarak rol alırlar. Enfekte hücrelerde apoptozu indükleyen perforin ve granzimler içeren sitotoksik granüller üretirler (45).

2.5.2. Bellek CD8+ T Hücreleri

Enfeksiyonun iyileşmesinden sonra, bir CD8+ T hücresi alt grubu bellek hücreleri olarak varlığını sürdürür ve aynı virüse yeniden maruz kalındığında hızlı yanıtlar sağlar. Bellek T hücreleri; lenfoid dokularda bulunan merkezi bellek (TCM) ve periferik dokularda bulunan efektör bellek (TEM) olmak üzere alt popülasyonlara ayrılabilir (46).

2.6. CD8+ T HÜCRELERİNİN İŞLEVLERİ

2.6.1. Viral Klirens (Temizlenme)

Viral enfeksiyonların eliminasyonunda hayati bir rol üstlenen CD8+ T hücreleri, enfekte konak hücrelerini, yüzeylerindeki MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan viral peptidler ile kendi T hücresi reseptörleri (TCR) arasındaki spesifik etkileşim yoluyla tanır. Bu tanıma sonrası aktive olan CD8+ T hücreleri, çok yönlü bir savunma mekanizması sergiler. Bir yandan interferon-gama (IFN-γ) ve tümör nekroz faktörü (TNF-α) gibi sitokinler salgılayarak diğer bağışıklık hücrelerini aktive edip antiviral yanıtı güçlendirirken (37); diğer yandan perforin ve granzim içeren sitotoksik granüllerin salınımı ile hedef hücre zarında gözenekler oluşturarak kaspaz yolağı üzerinden apoptozu tetikler ve enfekte hücreyi yok ederler (45).

2.6.2. İmmün Belleğin Korunması

Uzun ömürlü bellek CD8+ T hücrelerinin üretimi, yeniden enfeksiyon durumunda gelişmiş ve hızlı bağışıklık yanıtlarına olanak tanır. Bu bellek T hücreleri, SARS-CoV-2'nin Omicron gibi varyantları örneğinde olduğu gibi mutasyona uğrayıp nötralizan antikorlardan kaçabilen patojenlerin kontrol altına alınması için kritiktir. Çalışmalar, nötralizan antikor yanıtları azaldığında bile bellek CD8+ T hücresi yanıtlarının güçlü kaldığını ve şiddetli hastalığa karşı önemli koruma sağlayabildiğini göstermiştir (36,46).

2.6.3. Çapraz Reaktivite ve Uyarlanabilirlik

Son bulgular, CD8+ T hücrelerinin farklı viral varyantlara karşı kapsamlı çapraz reaktivite sergilediğini göstermektedir. mRNA aşıları ile aşılanmış bireylerde, spike proteinini hedefleyen CD8+ T hücresi yanıtları, SARS-CoV-2'nin hem Delta hem de Omicron varyantlarına karşı yüksek düzeyde çapraz reaktivite göstermiştir (36). Bu uyum yeteneği, hümoral bağışıklıktan kısmen kaçabilen, evrimleşen viral suşlara karşı etkili immün sürveyansın sürdürülmesinde çok önemlidir.

2.7. CD8+ T HÜCRELERİNİN AKTİVASYONU VE EFEKTÖR FONKSİYONLARI

CD8+ T hücreleri, hücre içi patojenlere, özellikle virüslere karşı immün yanıtta hayati öneme sahiptir. Bu hücrelerin nasıl aktive edildiğini ve birincil işlevlerini anlamak, viral enfeksiyonlardaki rollerine ve genel bağışıklık sistemine dair önemli bilgiler sağlar.

2.7.1. CD8+ T Hücrelerinin MHC Sınıf I Yoluyla Antijen Sunumu ve Aktivasyonu

CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu, öncelikle tüm çekirdekli hücreler tarafından eksprese edilen MHC sınıf I molekülleri üzerinde sunulan endojen antijenlerin (örneğin viral peptidler) tanınmasıyla başlar. Bu süreçte ilk adım, CD8+ T hücresinin TCR'lerinin, antijen sunan hücre yüzeyindeki spesifik bir peptid-MHC sınıf I kompleksine yüksek özgüllükle bağlanmasıdır (Sinyal 1) (47).

Ancak tam bir T hücresi aktivasyonunun sağlanabilmesi için TCR bağlanması tek başına yeterli değildir; eş zamanlı olarak APC'ler üzerindeki CD80/CD86 molekülleri ile T hücresi üzerindeki CD28 reseptörü arasındaki etkileşimden doğan kritik bir ko-stimülatör sinyale (Sinyal 2) ihtiyaç duyulur (48). Bu ikinci sinyalin yokluğu, özellikle kronik enfeksiyonlarda T hücresi anerjisine (yanıtsızlık) veya tükenmişliğine (exhaustion) yol açabilir (49).

Antijen tanıma ve ko-stimülasyon sinyallerinin yanı sıra, immünolojik mikroçevre içerisindeki sitokin profili de CD8+ T hücresi aktivasyonunu ve kaderini belirleyen üçüncü bir kritik faktördür. Özellikle APC'ler tarafından salgılanan IL-12 gibi pro-enflamatuar sitokinler, CD8+ T hücrelerinin tam aktivasyonunu destekler ve bu hücrelerin güçlü sitotoksik işlevler sergileyebilen efektör hücrelere farklılaşmasını teşvik eder (48).

2.7.2. Genişleme (Ekspansiyon) ve Farklılaşma

Aktivasyonu takiben CD8+ T hücreleri çoğalır ve efektör CD8+ T hücreleri ile bellek CD8+ T hücrelerine farklılaşır. Efektör hücreler acil antiviral eylemden sorumluyken, bellek T hücreleri uzun vadede varlığını sürdürerek antijene tekrar maruz kalındığında daha hızlı bir yanıt sağlar (50).

2.7.3. CD8+ T Hücrelerinin Efektör Fonksiyonları

Aktivasyonun ardından viral enfeksiyonlara karşı immün yanıtın yönetiminde merkezi bir rol üstlenen CD8+ T hücreleri, sitotoksisite ve sitokin üretimi olmak üzere iki temel mekanizma aracılığıyla işlev görürler. Bu hücrelerin en belirgin özelliği olan enfekte hücre eliminasyonu; öncelikle perforin ve granzim içeren granüllerin salınımıyla hedef hücre zarında gözeneklerin açılması ve kaspaz aktivasyonuyla apoptozun tetiklenmesi yoluyla gerçekleşirken, alternatif olarak Fas Ligandı (FasL)-Fas (CD95) etkileşimi üzerinden de programlanmış hücre ölümü indüklenebilmektedir (49).

Doğrudan sitotoksik etkilerine ek olarak immün yanıtı orkestre eden CD8+ T hücreleri; salgıladıkları IFN-γ ile makrofajları ve CD4+ T hücrelerini aktive edip antiviral durumu güçlendirirken (51), TNF-α aracılığıyla da enflamatuar süreçleri ve hücresel aktivasyonu desteklerler (47).

Enfeksiyonun temizlenmesini takiben, bir CD8+ T hücresi alt kümesi uzun ömürlü bellek T hücrelerine farklılaşır. Bu hücreler, kapsamlı bir aktivasyona gerek duymadan hızla efektör fonksiyonlar üretebildikleri için sonraki enfeksiyonlarda hızlı ve etkili yanıtlar için çok önemlidir. Bellek CD8+ T hücreleri, lenfoid ve lenfoid olmayan dokular dahil olmak üzere çeşitli dokularda yerleşerek aynı patojene tekrar maruz kalındığında hızlı bir immün yanıtı kolaylaştırabilir (50).

2.7.4. MHC Sınıf I Antijen Sunumu ve TCR Tanıması Arasındaki Etkileşimi

CD8+ T hücresi aktivasyonunun temelini oluşturan TCR ve MHC sınıf I molekülleri arasındaki etkileşim, oldukça hassas ve özgül moleküler mekanizmalara dayanır. Bir ağır zincir ile peptid bağlama oluğunu sabitleyen beta-2 mikroglobulinden oluşan MHC sınıf I molekülleri, hücre içinde sentezlenen proteinlerden türetilen, tipik olarak 8-11 amino asit uzunluğundaki endojen peptidleri sunarak antijen sergilenmesini kolaylaştırır (52).

İmmün yanıtın etkinliği, TCR'nin bu spesifik peptid-MHC kompleksine olan özgüllüğü ile belirlenirken (53), aktivasyon için kritik olan aşağı yönlü sinyalizasyon süreçleri başlatılır. Yüksek derecede özgüllük gerektiren bu etkileşim, TCR'nin MHC-peptid kompleksine olan afinitesini artıran CD8 ko-reseptörleri tarafından stabilize

edilerek, T hücresinin aktivasyon, proliferasyon ve efektör hücrelere farklılaşma gibi kader belirleyici süreçlere girmesini sağlar (47,54).

2.8. T HÜCRESİ BELLEK GELİŞİMİ VE ALT POPÜLASYONLARI

T hücresi belleğinin gelişimi, bağışıklık sisteminin önceden karşılaşılan antijenlere verimli bir şekilde yanıt verme yeteneği için temeldir. Bu süreç, enfeksiyonlara ve malignitelere karşı uzun vadeli koruma sağlayan çeşitli bellek T hücresi popülasyonlarının oluşumuyla sonuçlanır. Farklı T hücresi alt kümelerinin özelliklerini, işlevsel rollerini ve farklılaşma yollarını anlamak, bunların immünolojik bellekteki rollerini ve terapötik müdahaleleri aydınlatmak için elzemdir.

2.8.1. T Hücresi Bellek Gelişimi

T hücresi bellek gelişimi, organizmanın antijene maruz kalmasını takiben naif T hücrelerinin (T_{NAIVE}) ilk aktivasyonu ile tetiklenen dinamik bir süreçtir. Bu aktivasyonun gerçekleşebilmesi için, T_{NAIVE} hücrelerinin TCR aracılığıyla APC'ler üzerindeki peptid-MHC komplekslerini tanıması (birinci sinyal) ve eş zamanlı olarak, esasen APC'ler üzerindeki CD80/CD86 molekülleri ile T hücresi üzerindeki CD28'in etkileşiminden doğan ko-stimülatör sinyali (ikinci sinyal) alması gerekmektedir (55,56). Başarılı bir aktivasyonun ardından proliferasyon sürecine giren hücreler; anlık immün fonksiyonları yerine getiren Efektör T hücreleri (T_{EM}) veya patojen elimine edildikten sonra da uzun süre hayatta kalarak yeniden maruziyet durumunda hızlı yanıt oluşturma kapasitesine sahip Bellek T hücreleri olmak üzere, işlevsel rolleri ve ömürleri bakımından ayrışan farklı alt popülasyonlara farklılaşırlar.

SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrası aktive olan naif CD8+ T hücreleri, antijenik uyaranın niteliği ve ortamdaki sitokin profiline bağlı olarak fonksiyonel açıdan farklılaşmış bellek alt gruplarına evrilmektedir. Literatürde yaygın kabul gören lineer farklılaşma modeli uyarınca, bu süreç naif hücrelerin önce yüksek proliferasyon kapasitesine sahip merkezi bellek hücrelerine, ardından efektör fonksiyonların ön plana çıktığı efektör bellek ve terminal farklılaşmış hücrelerine dönüşümü şeklinde hiyerarşik bir seyir izlemektedir. Viral evrim süreci, özellikle varyant mutasyonları aracılığıyla immün kaçış mekanizmalarını tetiklese de, CD8+ T hücre belleği geniş çapraz reaktivite potansiyeli sayesinde virüsün korunmuş epitoplarını tanımaya devam etmektedir. Bu bağlamda, bellek T hücre alt popülasyonlarının dağılımı ve

aktivasyon kapasitesi, hem orijinal suşlara hem de Omicron gibi yeni gelişen varyantlara karşı uzun süreli hücresel korumanın temel belirleyicisidir.

2.8.2. T Hücresi Alt Popülasyonları

Temel T hücresi alt popülasyonları, yüzey belirteçlerinin ekspresyon profilleri ve fonksiyonel kapasitelerine göre hiyerarşik bir farklılaşma süreci izlemektedir. Bu sürecin başında, henüz antijenle karşılaşmamış olan ve tipik olarak CD45RA+CCR7+ fenotipini sergileyen T_{NAIVE} hücreleri bulunur. Bu hücreler lenfoid dokularda dolaşarak ilk antijen sunumuyla aktive olmayı beklerler (57). Aktivasyonun ardından, kök hücre benzeri özellikler ve kendi kendini yenileme kapasitesi gösteren Kök Hücre Benzeri Bellek T hücreleri (T_{SCM}) gelişir. Bu hücreler fenotipik olarak naif hücrelere benzer şekilde (CD45RA+CCR7+) kalsa da uzun ömürlü belleğin sürdürülmesi için kritik bir köprü görevi görürler (58). Farklılaşma ilerledikçe, lenfoid dokuya yönelimi sağlayan CCR7 ekspresyonunu koruyan ancak CD45RA'yı kaybeden (CD45RA-CCR7+) Merkezi Bellek T hücreleri (T_{CM}) ortaya çıkan bu popülasyon, antijenle tekrar karşılaşma durumunda hızla çoğalma kapasitesine sahiptir (56). Sürecin devamında, periferik dokularda lokalize olan ve hem CD45RA hem de CCR7 ekspresyonunu kaybeden (CD45RA-CCR7-) Efektör Bellek T hücreleri (T_{EM}), anlık sitokin üretimi ve sitotoksik yanıtlar için özelleşmiştir (55). Son aşamada ise, genellikle kronik antijen maruziyeti sonucu oluşan Terminal Farklılaşmış Efektör Bellek T hücreleri (T_{EMRA}) bulunur. CD45RA'yı yeniden eksprese eden ancak CCR7 taşımayan (CD45RA+CCR7-) bu hücreler, sıklıkla CD57 gibi yaşlanma belirteçleri ile ilişkilendirilmekte olup, proliferasyon kapasiteleri sınırlı olmasına rağmen güçlü sitotoksik aktivite sergilemektedirler (57,59).

2.9. AKAN HÜCRE ÖLÇER ANALİZİ

T hücresi alt kümelerinin spesifik yüzey belirteç ekspresyonlarına ve fonksiyonel özelliklerine göre karakterize edilmesinde güçlü bir analitik araç olan akan hücre ölçer, bu popülasyonların tanımlanması ve ayırt edilmesi için çeşitli belirteç kombinasyonlarını kullanır. Analizlerde; tipik olarak naif T hücrelerinde bulunan CD45RA ile bellek T hücrelerini işaret eden CD45RO'nun yanı sıra, naif (CCR7+) ve bellek (CCR-) T hücreleri arasındaki temel ayrımı sağlamak için CCR7 belirteci yaygın olarak kullanılmaktadır (60). Bellek popülasyonlarının daha ileri

düzeyde sınıflandırılmasında CD27 ekspresyonu, efektör bellek (CD27-) ve merkezi bellek (CD27+) hücrelerini ayırt etmeye olanak tanırken; CD57 ve Ki-67 gibi belirteçler sırasıyla terminal farklılaşma durumunu ve proliferasyon kapasitesini değerlendirmek amacıyla panele dahil edilir. Bu kapsamlı flow sitometrik profilleme, T hücresi popülasyonlarının immün yanıtlar, kronik enfeksiyonlar veya kanser gibi patolojiler sürecinde geçirdiği dinamik değişimlerin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını sağlar (61,62).

T hücresi belleğinin gelişimi, her biri benzersiz fenotipik özelliklere, işlevsel rollere ve farklılaşma yollarına sahip farklı alt popülasyonlarla sonuçlanan son derece organize bir süreçtir. Bu alt kümelerin anlaşılması, bağışıklık sisteminin enfeksiyonlara karşı koruma yeteneğine dair önemli bilgiler sağlar ve immünoloji ve onkolojideki terapötik stratejilere yön verir.

2.10. T HÜCRESİ AKTİVASYON BELİRTEÇLERİ VE ÖNEMİ

Edinsel immün yanıtın merkezinde yer alan T hücresi aktivasyonu, patojenlerle mücadele edebilecek efektör hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasıyla sonuçlanan kritik bir süreçtir. Bu süreç sırasında T hücre yüzeyinde eksprese edilen aktivasyon belirteçleri, hücrelerin fonksiyonel durumuna dair değerli bilgiler sunar. Bu belirteçlerden biri olan CD69, TCR ile antijen-MHC kompleksinin etkileşiminden kısa bir süre sonra upregüle olan ve aktivasyondan sonraki saatler içinde tespit edilebilen bir "erken aktivasyon belirteci"dir. CD69, T hücrelerinin lenfoid dokularda tutulmasında rol oynayarak sürekli aktivasyona katkıda bulunur ve hücrenin proliferasyon ile efektör fonksiyonlar için hazırlandığını (priming) gösterir (63,64).

Aktivasyon sürecinde rol oynayan bir diğer önemli molekül, T hücresi sağkalımını ve efektör fonksiyonlarını artıran ko-stimülatör CD137 (4-1BB) reseptörüdür. CD137 etkileşimi, özellikle CD8+ T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitotoksik kapasitelerini güçlendirerek enfeksiyonlara ve kansere karşı sağlam bir immün yanıt oluşturulmasında kritik rol oynar; bu özelliği nedeniyle kanser immünoterapilerinde potansiyel bir hedef olarak kabul edilmektedir (65,66). Bu temel belirteçlere ek olarak T hücreleri; büyüme ve sağkalım için IL-2 reseptör alfa zinciri olan CD25'i, hücre adhezyonu ve bellek oluşumuyla ilişkilendirilen CD44'ü ve genellikle kronik antijen uyarımı sonucu ortaya çıkan ve T hücresi tükenmişliğini

(exhaustion) işaret edebilen inhibitör reseptör PD-1'i de eksprese edebilirler (Liu ve ark., 2021; Dumolard ve ark., 2025).

Bu aktivasyon belirteçlerinin tespiti, T hücrelerinin fonksiyonel durumunun ve antijenlere yanıt verme kapasitesinin değerlendirilmesinde, hastalıkların izlenmesinde ve aşı etkinliğinin ölçülmesinde hayati öneme sahiptir (67,68). Bu amaçla kullanılan akan hücre ölçer, floresan işaretli antikorlar aracılığıyla spesifik belirteçleri hedefleyerek aktive T hücresi popülasyonlarının nicel (kantitatif) analizine olanak tanıyan güçlü bir platform sunar. Bu analizler, CD69 ve CD137 gibi temel belirteçlerin anlaşılmasıyla birleştiğinde, kişiselleştirilmiş immünoterapilerin geliştirilmesi ve immünosüpresif hastalıkların yönetimi için kritik bir zemin oluşturmaktadır (69).

2.11. SARS-CoV-2'YE ÖZGÜ T HÜCRESİ YANITLARI: CD8+ T HÜCRELERİNİN ROLÜ

2.11.1. Akut Enfeksiyon Sırasında CD8+ T Hücresi Yanıtı

SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıt, akut enfeksiyon sırasında virüsün temizlenmesinde (klirensi) ve uzun süreli bağışıklığın kurulmasında hayati bir rol oynayan T hücrelerinin, özellikle de CD8+ T hücrelerinin güçlü aktivasyonunu gerektirir.

CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu, T hücre reseptörlerinin enfekte hücrelerin yüzeyindeki MHC sınıf I molekülleri tarafından sunulan viral peptidleri tanımasıyla gerçekleşir. Aktivasyon üzerine, CD8+ T hücreleri çoğalır ve enfekte hücreleri tanıyıp öldürebilen efektör T hücrelerine farklılaşır. Bu efektör T hücreleri, sitotoksik işlevleri yerine getirmeye hazır olduklarını gösteren CD69 ve CD137 gibi aktivasyon belirteçlerini eksprese ederler (70).

SARS-CoV-2 kapsamında, çalışmalar etkili CD8+ T hücresi yanıtlarının daha düşük viral yükler ve enfeksiyonun iyileşmesi ile korele olduğunu göstermiştir. Akut SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında CD8+ T hücrelerinin rolüne ilişkin araştırmalar, viral klirensi sağlamadaki ve klinik sonucu belirlemedeki önemlerini vurgulamıştır (71). CD8+ T hücreleri, makrofajlar da dahil olmak üzere diğer bağışıklık hücrelerinin aktivitesini artırarak antiviral yanıtı güçlendiren IFN-γ gibi sitokinler üretir (37).

2.11.2. Konvalesan Bireylerde Uzun Süreli Belleğin Kurulması

Enfeksiyonun iyileşmesini takiben, CD8+ T hücrelerinin bir alt grubu, uzun süreli bağışıklığın temeli olan bellek T hücrelerine dönüşerek kalıcılık kazanır. Son dönemde yapılan çalışmalar, COVID-19'dan iyileşen bireylerin, Delta ve Omicron gibi endişe verici varyantları da tanıyabilen, birkaç ay boyunca güçlü ve fonksiyonel bir CD8+ T hücresi belleğini koruduğunu ortaya koymuştur (72,73). Bu bellek havuzu, lenfoid dokularda bulunan ve CD62L ile CCR7 ekspresyonu sayesinde hızlı reaktivasyona hazır olan T_{CM} hücreleri ile periferik dokularda dolaşarak antijenle tekrar karşılaşma anında anlık efektör işlevler sergileyen T_{EM} hücreleri gibi belirgin alt popülasyonlardan oluşur.

SARS-CoV-2'ye özgü bu bellek CD8+ T hücrelerinin, farklı fenotipik özelliklere sahip olmalarına rağmen yeniden enfeksiyonlara yanıt vermede dengeli bir işlevsel kapasite sergiledikleri gösterilmiş olup (74), T hücresi bellek yanıtlarının bu dayanıklılığı, virüse karşı uzun süreli bağışıklık potansiyelinin en önemli göstergesini oluşturmaktadır.

2.11.3. Aşı Kaynaklı ve Enfeksiyon Kaynaklı T Hücre Bağışıklığı

Aşı kaynaklı T hücresi yanıtları ile doğal enfeksiyon sonucu gelişen bağışıklık, her iki yöntem de güçlü CD8+ T hücresi aktivasyonunu indükleyebilmesine rağmen, oluşturdukları immünolojik profil açısından belirgin farklılıklar göstermektedir. SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen mRNA aşılarının, güçlü hümoral bağışıklığın yanı sıra varyantlarla etkili bir şekilde savaşabilen, dayanıklı ve antijene özgü CD8+ ve CD4+ T hücresi popülasyonları oluşturduğu bilinmektedir [36,72]. Buna karşılık doğal enfeksiyon süreci, organizmanın birden fazla viral antijene maruz kalması nedeniyle tipik olarak daha geniş, heterojen ve diğer coronavirüslerle çapraz reaktiviteye olanak tanıyan, dolayısıyla sadece aşılanmış gruplara kıyasla daha kapsamlı bir T hücresi repertuvarının gelişimiyle sonuçlanmaktadır (75,76). Sonuç olarak, aşı ve enfeksiyon kaynaklı bu immün yanıtlar arasındaki özgüllük, büyüklük ve bellek alt kümelerine dair yapısal farklar; uzun vadeli koruma kapasitesi ve varyant kaçışına yatkınlık açısından farklı klinik sonuçlar doğurmaktadır (77,78).

2.11.4. Viral Varyantlara Karşı T Hücresi Çapraz Reaktivitesi

T hücresi yanıtlarının önemli özelliklerinden biri, viral varyantlara karşı gösterdikleri çapraz reaktivitedir (cross-reactivity). Çalışmalar, CD8+ T hücrelerinin SARS-CoV-2'nin farklı varyantları arasında paylaşılan korunmuş epitopları tanıyabildiğini göstermiştir; bu durum viral evrim sürecinde etkili immünolojik korumanın sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (78,79).

Çapraz reaktif T hücresi yanıtları, özellikle mevsimsel coronavirüslere karşı önceden var olan bağışıklığa sahip bireylerde gözlemlenmiştir; burada bellek T hücreleri SARS-CoV-2 peptidlerini tanıyabilmektedir. Bu durum, coronavirüsler arasında korunmuş epitopları hedefleyen aşı tasarımı için önemli bir araştırma alanını oluşturmaktadır (75,80).

Sonuç olarak, CD8+ T hücreleri SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıtın ayrılmaz bir parçasıdır ve viral temizlenme ile uzun süreli bağışıklığın sağlanmasında temel roller üstlenir. T hücresi aktivasyonunun nüanslarını, bellek oluşumunu ve aşı ile enfeksiyon yanıtlarının karşılaştırmalı dinamiklerini anlamak, gelecekteki immünizasyon stratejilerine yön verecek ve evrilmeye devam eden COVID-19'u yönetme yeteneğimizi artıracaktır.

2.12. İMMÜNOLOJİK İMPRİNTİNG VE ORİJİNAL ANTİJENİK SİN'E GENEL BAKIŞ

Sıklıkla orijinal antijenik sin olarak adlandırılan immünolojik imprinting, bir bireyin bir patojene ilk maruziyetinin, o patojenin ilişkili suşlarına veya varyantlarına karşı sonraki bağışıklık yanıtlarını nasıl şekillendirdiğini tanımlar. Bu fenomen, ilk maruziyetle başlatılan bellek bağışıklık yanıtlarının "tercihli olarak hatırlanması (preferential recall)" şeklinde tezahür eder. Bu hatırlanma gelecekteki enfeksiyonlarda veya aşılamalarda antikorların ve T hücrelerinin özgüllüğünü ve işlevselliğini etkiler.

Orijinal antijenik sin terimi, 1960 yılında influenza virüsü immünolojisi üzerine yapılan çalışmalar sırasında Francis Pease tarafından ortaya atılmıştır. Bu ilke, ilk olarak bir suşa maruz kalan bireylerin, sonraki suşlara, özellikle de farklı antijenik profillere sahip olanlara karşı daha az etkili antikorlar ürettiğinin görüldüğü influenza virüsleri bağlamında gözlemlenmiştir (81). Zamanla bu kavram influenza'nın ötesinde

incelenmiş ve başta SARS-CoV-2 olmak üzere coronavirüsler dahil çeşitli patojenlere uygulanmıştır.

2.12.1. Viral Enfeksiyonlarda OAS Mekanizmaları

Influenza gibi viral enfeksiyonlar örneğinde OAS patofizyolojisi, hümoral ve hücresel bağışıklık bileşenlerinin ilk maruziyete olan "bağlılığı" üzerinden şekillenmektedir. Bu süreçte ilk olarak, varyant bir suşla karşılaşıldığında, immün sistem yeni epitoplar yerine tercihen ilk enfeksiyondaki orijinal epitoplara özgü antikorları üreten bellek B hücrelerini devreye sokar, bu da farklılaşmış suşlara karşı savunmayı zayıflatabilir (82). B hücrelerine paralel olarak CD4+ ve CD8+ T hücreleri de benzer bir imprinting sergileyerek, başlangıç antijenlerine odaklı bellek popülasyonları oluşturur. Bu durum, sonraki enfeksiyon veya aşılamalarda sunulan yeni epitoplara karşı immün işlevselliğin bozulmasına veya etkinliğin azalmasına neden olabilir (39). Dolayısıyla OAS fenomeni, özellikle yıllık influenza aşılamaları veya yeni viral suşların ortaya çıkışı gibi durumlarda, tarihsel maruziyeti olan popülasyonlara yönelik aşı stratejilerinin belirlenmesinde ve optimize edilmesinde kritik bir faktör olarak öne çıkmaktadır.

2.12.2. SARS-CoV-2 ve COVID-19 Kapsamında Orijinal Antijenik Sin

COVID-19 pandemisi sürecinde immünolojik imprinting ve OAS fenomenleri, özellikle SARS-CoV-2'nin wild-type (Wuhan-Hu-1) suşu ile geçirilen ilk enfeksiyonun Omicron gibi yeni varyantlara verilen yanıtı nasıl şekillendirdiği noktasında kritik bir önem kazanmıştır. Wild-type suşla gerçekleşen bu ilk temas, bağışıklık sisteminin başlangıçta oluşturulan yanıtları "öncelikleme" eğilimi göstermesine neden olarak bellek B hücresi yanıtını domine etmekte, bu durum, hücrelerin varyantlara özgü yeni mutasyonlar yerine suşlar arasında korunmuş epitopları tanımasına ve dolayısıyla Omicron gibi varyantlara karşı nötralizasyon kapasitesinin düşmesine yol açmaktadır (36,72). Buna karşılık CD8+ T hücresi yanıtları daha dirençli bir profil sergilemekte olup, nötralizan antikorların hedeflediği bölgelere kıyasla daha yüksek korunmuşluk gösteren Spike proteini bölgelerini hedef alarak endişe verici varyantlara karşı işlevselliklerini ve çapraz reaktivitelerini korumaktadır (83,84). Aşılamanın etkisi değerlendirildiğinde ise, mRNA aşılarının güçlü yanıtlar oluşturduğu, ancak daha önce enfekte olmuş bireylerde aşılamanın,

önceden var olan bağışıklık üzerinden hızlı bir hatırlatma (recall) yanıtını tetikleyerek antikor üretimi ve T hücresi aktivasyonunu modüle ettiği görülmektedir (85). Sonuç olarak, OAS fenomeni nedeniyle hümoral yanıtın yeni suşları tanıma kapasitesi zayıflayarak immün koruma potansiyel olarak azalabilirken, önceki enfeksiyonlardan türetilen T hücresi yanıtları hala belirli bir düzeyde çapraz reaktivite sağlamaya devam etmektedir (86,87).

İmmünolojik imprinting ve OAS fenomenleri, SARS-CoV-2 ve varyantlarının yönetiminde hem aşı etkinliğini sınırlayan zorluklar hem de yeni nesil tasarımlar için fırsatlar sunan çift yönlü bir etkiye sahiptir. İmmün yanıtın orijinal antijene doğru kayması (skewing), Omicron gibi varyantlardaki yapısal farklılıklar nedeniyle nötralizan antikorların etkinliğini azaltarak bir dezavantaj oluştururken (88,89), bu mekanizmaların anlaşılması, çapraz reaktif T hücresi yanıtlarına ve viral genomun korunmuş bölgelerine odaklanan evrensel aşı stratejilerinin geliştirilmesi için rasyonel bir zemin sağlamaktadır (75,90). Dolayısıyla, ister doğal enfeksiyon ister aşılama kaynaklı olsun, önceden var olan bağışıklığın (pre-existing immunity) etkilerini anlamak ve imprinting'in olumsuz sonuçlarını minimize edecek yaklaşımlar geliştirmek, pandeminin gelecekteki seyrini yönetmek ve halk sağlığı politikalarını optimize etmek adına hayati bir gerekliliktir.

2.13. İMMÜNOİNFORMATİK VE EPİTOP ANALİZİ

İmmünoinformatik, immün yanıtları analiz etmek ve aşılar ile tedaviler için potansiyel hedefleri belirlemek amacıyla immünoloji ve hesaplamalı biyolojiyi birleştiren disiplinler arası bir alandır. T hücreleri ve antikorlar tarafından tanınan antijenler içindeki spesifik diziler olan epitopları tahmin etmek için hesaplamalı araçlardan yararlanır. Epitop analizi, özellikle SARS-CoV-2 gibi virüsler dahil olmak üzere çeşitli patojenlere karşı epitop tabanlı aşıların tasarlanmasında, aşı geliştirmede kritik bir rol oynar.

2.13.1. T Hücresi Epitop Tahmin Algoritmaları: NetMHCpan

İmmünoinformatik alanında T hücresi epitop tahmini için kullanılan algoritmalar arasında en yetkin araçlardan biri kabul edilen NetMHCpan; temelinde makine öğrenmesi yaklaşımlarını barındırarak, peptidlerin MHC sınıf I ve kısmen sınıf II moleküllerine bağlanma afinitelerini yapay sinir ağları (neural networks) aracılığıyla öngörür. Bilinen

peptid-MHC etkileşim veri setleri üzerinde eğitilen bu algoritma, HLA genlerinin yüksek polimorfik doğasını kapsayacak genişlikte bir allelik temsil sunarak, farklı etnik gruplar arasında tanınabilen epitopların belirlenmesine ve böylece aşıların popülasyon kapsayıcılığının artırılmasına olanak tanır (91,92). Tahmin doğruluğunu maksimize etmek adına peptid uzunluğu, amino asit bileşimi ve komşu diziler gibi biyolojik faktörleri bütünleşik bir yapıda işleyen NetMHCpan, 4.1 gibi güncel sürümleriyle yeni immünolojik veriler ışığında sürekli evrimleşmeye devam etmektedir (91).

2.13.2. HLA Polimorfizminin Popülasyon Kapsayıcılığı Açısından Oluşturduğu Zorluklar

Aşı tasarım süreçlerinde HLA polimorfizmi, popülasyon kapsayıcılığını sınırlayan çok katmanlı zorlukları beraberinde getirmektedir. İnsan popülasyonlarında gözlenen yüksek çeşitlilikteki HLA sınıf I alelleri, peptidlerin T hücrelerine sunumunu doğrudan etkileyerek, farklı etnik gruplar arasında aşıya karşı gelişen immün tanıma ve yanıtlarda belirgin değişkenliklere neden olmaktadır (93). Bu biyolojik çeşitliliğe rağmen, birçok epitop tahmin aracının tüm alelleri veya spesifik popülasyonları kapsayamaması, aşıların belirli kesimlerde immünojenik olmamasına veya düşük etkinlik göstermesine yol açarak küresel sağlıkta erişim adaletsizliği riskini doğurmaktadır (91). Dahası, SARS-CoV-2 gibi endişe verici varyantların, önceki suşlara karşı hazırlanmış (primed) T hücrelerinden kaçabilen mutasyonlar barındırması; epitop analiz süreçlerinin bu varyasyonları da kapsayacak şekilde dinamik ve evrimsel değişikliklere duyarlı tahmin algoritmalarıyla desteklenmesi gerekliliğini vurgulamaktadır (23).

2.13.3. İmmün Kaçış ve Epitop Korunumunu Analiz Etmek İçin *In Silico* Yöntemler

İmmün kaçış mekanizmalarının ve epitop korunumunun aydınlatılmasında kritik bir işlev gören *in silico* teknikler, viral genomik veriler üzerinden yürütülen derin mutasyonel tarama ve profilleme sayesinde, antijenisiteyi etkileyebilecek mutasyon kalıplarını belirleyerek potansiyel kaçış risklerini ve mevcut tedavilerin başarısızlık olasılıklarını öngörmeyi mümkün kılar (94,95). Bu hesaplamalı süreç, IEDB gibi veritabanları aracılığıyla farklı suşlar arasındaki epitop korunumunun analiz edilmesiyle derinleştirildiğinde; araştırmacılara sadece aşı etkinliğini değerlendirme imkanı sunmakla kalmaz, aynı zamanda orijinal antijenik sin fenomenini de dikkate alarak, T hücresi

popülasyonlarını etkili şekilde devreye sokan ve çapraz reaktif bağışıklığı teşvik eden yeni nesil aşıların rasyonel tasarımına olanak tanır (91,96).

İmmünoinformatik ve epitop analizi, özellikle COVID-19 gibi antijenik sapma (drift) ve kayma (shift) dinamiklerinin yoğun olduğu enfeksiyonlarda, T hücresi yanıtlarının anlaşılması için vazgeçilmez bir araçtır. HLA polimorfizminin yarattığı popülasyonel çeşitlilik zorlukları, aşıların küresel ölçekte etkinliğini sağlamak adına güçlü tahmin algoritmalarının kullanımını zorunlu kılarken, bu teknolojilerle desteklenen bilgilendirilmiş aşı tasarımları, viral enfeksiyonların yönetiminde daha kapsayıcı ve başarılı halk sağlığı stratejilerinin geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.

Sonuç olarak, SARS-CoV-2'ye karşı gelişen nötralizan antikor yanıtlarının dinamikleri ve varyantlardan nasıl etkilendiği literatürde geniş yer bulmuş olsa da; viral klirens ve uzun süreli korumada kritik rol oynayan CD8+ T hücresi yanıtlarının, özellikle Omicron ve alt varyantları bağlamındaki OAS etkisi ve çapraz reaktivite profili henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Ayrıca, HLA polimorfizminin T hücresi epitop tanıma süreçlerindeki etkisi göz önüne alındığında, farklı popülasyonlardaki hücresel immün yanıtın epitop düzeyinde ve biyoinformatik destekli analizlerle incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut literatürdeki bu veriler, SARS-CoV-2 varyantlarına karşı hücresel bağışıklığın kapsamının anlaşılmasının, gelecekteki aşı stratejileri ve immün çalışmaları için oldukça gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA KAPSAMI VE ETİK İZİN

Bu tez çalışması, TÜSEB 2023-A3-02 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında (Proje No: 37756) Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) desteği ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, COVID-19 geçirmiş bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden, SARS-CoV-2 wild-type ve Omicron varyantına özgü, bellek CD8+ T hücrelerinin frekansı ve özgüllüğü flow sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir. Araştırmaya ait çalışmaların gerçekleştirilmesi için etik kurul izni, İstanbul Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2023/431 No'lu Kurul Kararı (EK-1) ile temin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilecek katılımcıların her birinden, çalışma ile ilgili bilgi verilerek Gönüllü Onam Formu (EK-2) alınmış, hastalık ve aşılanma geçmişine yönelik bilgi edinme amacıyla Çalışma Anket Formu (EK-3) doldurulması istenmiştir.

3.2. ÇALIŞMAYA DAHİL EDİLECEK KATILIMCILARIN BELİRLENMESİ

Bu çalışmaya, 9 ay veya daha öncesinde Omicron varyantı ile enfekte olmuş COVID-19 konvalesan bireyler dahil edilmiştir. Çalışmada, tek bir zaman noktasında kan toplanarak uzun süreli CD8+ T hücre bellek yanıtları ölçülmüş ve immünfenotipleme yapılmıştır. COVID-19 enfeksiyon geçmişi SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna göre E-nabız sisteminden doğrulanarak belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilecek kişilerin enfeksiyon ve aşılama geçmişine göre sınıflandırılması yapılmış ve araştırma iki çalışma grubuna bölünmüştür.

Başlangıçta planlanan her bir grup için 51 kişilik, toplamda 102 kişilik çalışma grubu sayısına ulaşılamamıştır. Bunun yerine her bir grup için 47 kişilik, toplamda 94 kişilik çalışma grubu ile çalışılmıştır. Çalışmanın yapılacağı belirtilen merkezde, çalışma sağlık çalışanlarının gönüllü katılımıyla tamamlanmıştır.

Bu çalışmaya, 18 yaşını doldurmuş ve yazılı onam vermiş gönüllü bireyler dahil edilmiştir. Katılımcıların seçiminde; pandemi döneminde en az iki doz COVID-19 aşısı

olmuş olmaları, 9 ay veya daha uzun süre önce Omicron varyantı ile enfeksiyon geçmişi olması ve bu enfeksiyonu aşılama sonrası dönemde, spesifik olarak Ocak 2022'den sonra geçirmiş olmaları kriterleri aranmıştır. Biyolojik örnek alımına uygun olan bu gruptan; aktif enfeksiyonu, malignitesi (kanser), immün yetmezliği bulunanlar veya immünsupresif tedavi görenler ile gebelik durumu olanlar dışlanmıştır. Ayrıca klinik durumu örnek vermeye elverişsiz olan veya çalışma sırasında onamını geri çeken olgular çalışma dışı bırakılmıştır.

3.2.1. Birinci Çalışma Grubu (Grup 1, Wt (+))

Birinci çalışma grubuna 47 kişi dahil edilmiştir ve bu kişilerin tespiti için şu yol izlenmiştir:

1. 2021'de veya öncesinde COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş (SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna sahip) (2021 yılı ve öncesindeki COVID-19 enfeksiyonları Omicron öncesi varyantları veya wild-type enfeksiyondur),
2. En az 1 enfeksiyon geçmişinin ardından 2 veya 3 doz aşı olmuş,
3. Örnek toplanma zamanından minimum 9 ay öncesine kadar tekrar COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş (SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna sahip) 47 gönüllü katılımcı dahil edilmiştir. Bu grubun 2022 yılından itibaren 1'den fazla enfeksiyon geçmişi olabilir. 2022 yılından itibaren tüm COVID-19 enfeksiyonları Omicron varyantına ait olduğu bilinmektedir.

3.2.2. İkinci Çalışma Grubu (Grup 2, Wt (-))

İkinci çalışma grubuna 47 kişi dahil edilmiştir ve bu kişilerin tespiti için şu yol izlenmiştir:

1. 2021'den önce ve 2 veya 3 doz aşılanmadan önce enfeksiyon geçirmemiş (Aşılanmadan önce SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna sahip olmayan) ve
2. Örnek toplanma zamanından minimum 9 ay öncesine kadar COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş (SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna sahip) 47 gönüllü katılımcı dahil edilmiştir. Bu grubun 2022 yılından itibaren 1'den fazla enfeksiyon geçmişi olabilir.

Çalışmaya dahil edilen katılımcıların son enfeksiyonlarının üzerinden geçen sürenin minimum 9 ay, ortalama ise 15-18 ay olduğu saptanmıştır. Bu zaman dilimi, akut

ve erken bellek evrelerinin (early memory) ötesinde, stabilizasyonunu tamamlamış uzun süreli bellek (long-term memory) yanıtlarının karakterize edilmesine imkan tanımıştır. Wild-type enfeksiyon geçmişine göre 2 gruba ayrılan çalışma grubunda katılımcıların tamamı mutlaka Omicron varyantı ile enfekte olmuş kişilerden seçilmiştir.

3.3. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Çalışma kapsamında toplamda 94 kişiden kan alınmıştır. Örneklerin toplanması amacıyla, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde, Kasım 2024-Şubat 2025 tarihleri arasında, SARS-CoV-2 PCR testi pozitif olan sağlık çalışanı veya sağlık çalışanı olmayan gönüllü olabilecek kişilerle iletişime geçilmiş ve örnek toplama amacıyla çağrılmışlardır. Gönüllü katılımcılardan toplanan kan örnekleri, Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarında ve SBÜ Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölüm laboratuvarında taze bir şekilde hemen çalışılmıştır. Kan örnekleri alınmadan önce gönüllü katılımcılardan Gönüllü Onam Formu alınmıştır. Kan örnekleri, Greiner Bio-One Vacuette 9 ml LH Lithium Heparin (yeşil kapaklı) tüplerine toplandıktan sonra aynı gün içerisinde taze bir şekilde çalışılmıştır ve çalışma zamanına kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.4. PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU

PKMH izolasyonu sürecine, lityum-heparinli tüplere alınan 8 ml kanın 50 ml'lik falcon tüplerine boşaltılmasıyla başlandı. Kan, 1:1 oranında PBS ile dilüe edildi ve pastör pipetiyle iyice karıştırılarak süspansiyon haline getirildi. Daha sonra, bu dilüe edilmiş kan örneği, 4 ml Ficoll içeren 15 ml'lik bir falcon tüpünün tamamını dolduracak şekilde dikkatlice yüklendi. Hazırlanan bu tüpler, 1459 x g (2600 RPM) kuvvetinde 20 dakika boyunca santrifüj edildi (santrifüj cihazının hızlanma ayarı: 0, yavaşlama ayarı: 0). Santrifüj işlemi sonucunda oluşan ve lenfositler bakımından zengin olan ortadaki beyaz katman (PKMH), yavaşça bir pastör pipeti kullanılarak yeni bir 15 ml'lik falcon tüpüne aktarıldı. Aktarılan hücre süspansiyonu, PBS ile 9 ml'ye tamamlanarak homojenize edildi ve 779 x g (1900 RPM) kuvvetinde 5 dakika süreyle santrifüj edildi (Hızlanma/Yavaşlama ayarı: 9). Süpernatantın uzaklaştırılmasının ardından, lenfositleri içeren peletin üzerine 5 ml PBS eklendi ve hücreler 624 x g (1700 RPM) kuvvetinde tekrar santrifüj edildi (Hızlanma/Yavaşlama ayarı: 9). Bu adımda süpernatant tekrar

döküldü; eğer lenfosit peleti çok fazla eritrosit içeriyorsa bu yıkama adımı tekrarlandı, ancak çok fazla yıkamanın hücre kaybına neden olabileceği göz önünde bulundurularak yıkama en fazla bir kere daha tekrarlandı. Son olarak, tüp içinde kalan hücre peletinin üzerine hücre sayımı için hazırlanan medyum (%10'luk RPMI kültür medyum) eklenerek hücre sayımı gerçekleştirildi.

Çalışma kapsamında izole edilen hücrelerin çözdürülmesi, sayımı, transferi ve sonraki tüm deneysel aşamalarında hücre canlılığını ve fonksiyonunu desteklemek amacıyla standardize edilmiş zenginleştirilmiş kültür ortamı kullanıldı. Kullanılan %10'luk RPMI kültür medyumu; RPMI-1640 içerisinde, %10 Fetal Bovin Serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 Penicillin içerecek şekilde hazırlandı.

3.5. SARS-CoV-2 PEPTİD HAVUZLARI İLE T HÜCRE STİMÜLASYONU

SARS-CoV-2 B.1.1.529 (Omicron) varyantının Spike proteinine özgü T hücre yanıtlarını değerlendirmek amacıyla, peptit havuzları kullanılarak *in vitro* T hücre stimülasyonu gerçekleştirildi. Kullanılan peptit havuzları, 11 amino asit örtüşmeleri içeren 15-mer dizilerinden oluşan liyofilize peptitlerden hazırlandı. Bu peptit havuzları, Omicron varyantına ait Spike protein mutasyonlarını içeren alt varyantlara özgü T hücre yanıtlarını indüklemek üzere tasarlandı.

3.5.1. T Hücre Stimülasyonu için Kullanılan Peptit Havuzları

3.5.1.1. Wild Type referans havuzu: Miltenyi Biotec PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete (6 nmol/peptid) Wild Type Referans Havuzu olarak kullanıldı. Bu havuz, Wuhan soyuna ait Spike protein bölgelerini kapsayan peptit dizilerini içermektedir. PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete, SARS Coronavirus 2'nin yüzey ya da spike glikoproteininin ("S") tamamını kodlayan protein dizisini (amino asit 5–1273 arası) kapsayan liyofilize peptit havuzudur (GenBank MN908947.3, Protein QHD43416.1).

3.5.1.2. Mutasyon referans havuzu: Mutasyon Havuzu olarak ise Miltenyi Biotec PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.2 Mutation Pool ve PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.5 Mutation Pool eşit oranlarda karıştırılarak kullanıldı. Bu şekilde oluşturulan kombinasyon havuzu, 2022–2023 yıllarında dolaşımda olan Omicron varyantlarının başlıca Spike protein mutasyonlarını

kapsayacak şekilde stimülasyon yapılmasını sağlamıştır. B.1.1.529/BA.2 soyuna (Omicron varyantı) ait yüzey ya da spike glikoproteininde ("S"), Wuhan varyantına kıyasla toplam 31 mutasyon bulunmaktadır. PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.2 Mutasyon Havuzu, yalnızca mutasyona uğramış bölgeleri hedef alır ve her biri 15 amino asit uzunluğunda 68 peptitten oluşur. PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.5 Mutasyon Havuzu, yalnızca mutasyona uğramış bölgeleri hedef alır ve her biri 15 amino asit uzunluğunda 76 peptitten oluşur. B.1.1.529/BA.4 ve B.1.1.529/BA.5 (Omicron varyantları) için, Wuhan varyantı ile karşılaştırıldığında yüzey ya da spike glikoproteininde ("S") toplam 34 aynı mutasyon bulunmaktadır.

Peptit havuzlarıyla gerçekleştirilen antijen spesifik T hücre stimülasyonu, efektör sitokinlerin salınımını ve aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonunu artırarak, T hücrelerinin antijen spesifik yanıtlarını değerlendirme imkânı sağladı. Karşılaştırma amacıyla, Wuhan suşundan türetilmiş 83 adet 15-mer peptit havuzuyla stimüle edilen T hücreleri referans (wild type) kontrol grubunu oluşturdu.

Negatif kontrol olarak stimülasyon uygulanmamış örnekler hazırlandı. Pozitif kontrol olarak, Miltenyi Biotec CytoStim™ human kullanıldı. CytoStim, insan efektör/bellek T hücrelerinin hızlı ve etkili şekilde stimülasyonu için geliştirilmiştir. Bu ajan, T hücre reseptörüne (TCR) bağlanarak onu bir antijen sunan hücrenin (APC) MHC molekülüyle çapraz bağlamak suretiyle T hücrelerini aktive eder.

3.5.2. T Hücre Stimülasyon Protokolü

Periferik kan mononükleer hücreleri izole edilip sayıldıktan sonra, 1×10^6 hücre/0.15 mL %10'luk RPMI kültür medyum ortamında 96 oyuklu U tabanlı steril plakalara yerleştirildi. Her bir katılımcı örneği için stimülasyon aşağıdaki gruplarla yapıldı:

1. Wild Type Referans Havuzu (Wuhan kökenli, 6 nmol/peptid)
2. Mutasyon Havuzu (Omicron B.1.1.529/BA.2 + BA.5 karışımı, her havuz 6 nmol/peptid)
3. Negatif kontrol (stimüle edilmemiş örnek)
4. Pozitif kontrol (CytoStim™ human)

Tüm gruplar, 1 µg/mL peptit konsantrasyonunda 12 saat boyunca (overnight) 37 °C'de ve %5 CO_2 şartlarında inkübe edildi. Stimülasyonun ardından T hücre bellek ve aktivasyon belirteçleri ölçülerek antijen-spesifik T hücre yanıtları değerlendirildi.

Bir gecelik (overnight) inkübasyon ve stimülasyon süreci tamamlanan PBMC örneklerinin, immünofenotipleme analizi için Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı Flow Sitometri Ünitesi'ne transferi aşamasında, hücre canlılığının (viability) korunması amacıyla bir ön optimizasyon çalışması yürütülmüştür. Bu besiyeri içerisinde süspanse edilen hücreler için üç farklı taşıma ortamı karşılaştırmalı olarak test edilmiştir:

1. 37°C Taşıma Ortamı: Hücrelerin inkübatörden çıkarıldıktan sonra transfer süresince 37°C sabit sıcaklıkta tutulduğu koşul.
2. Buz Üzerinde (0–4°C) Taşıma Ortamı: Hücrelerin buz üzerine yerleştirilerek soğuk zincir (0–4°C) koşullarında transfer edildiği koşul.
3. Oda Sıcaklığı (20–25°C) Taşıma Ortamı: Hücrelerin oda sıcaklığında tüplere alındığı ve strafor izolasyonlu kutular içerisinde oda sıcaklığında (20–25°C) transfer edildiği koşul.

Yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, tanımlanan %10'luk RPMI kültür medyumu içerisinde ve oda sıcaklığında (20–25°C) gerçekleştirilen transferin, hücre stresini minimize ederek canlılık oranını >%60 seviyesinde tuttuğu ve en iyi sonucu verdiği saptanmıştır. Bu bulgu doğrultusunda, çalışmadaki tüm örneklerin transferi için bu besiyeri ve oda sıcaklığında strafor kutu izolasyonu içeren protokol standart yöntem olarak belirlenmiştir.

3.6. BELLEK CD8+ T HÜCRELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN İMMÜNOFENOTİPLEME

Çeşitli bellek T hücre alt tiplerinin fenotipik özelliklerini belirlemek amacıyla immünofenotipleme çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla, izole edilen ve SARS-CoV-2 spesifik peptit havuzları ile *in vitro* olarak stimüle edilen PKMH'ler, akan hücre ölçer yöntemiyle analiz edildi. Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Birimi, Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı/ Flow Sitometri Laboratuvarı'nda gerçekleştirilen immünofenotipleme çalışmasında Beckman Coulter Navios 10-Color Flow Sitometri cihazı kullanılmıştır.

Yüzey boyamaları için CD3, CD4, CD8, CD45, CD69, CD137, CD45RA, CCR7 ve CD27 antijenlerine özgü floresan işaretli antikorlar içeren bir panel kullanıldı. Her bir örnek için 4 µL'lik antikor hacmi kullanıldı. Canlı/ölü hücre ayrımı için, çalışmaya başlamadan önce DMSO ile çözdürülmüş Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit ile, 1 x 10^6 hücre miktarı için 1:100 oranında seyreltilerek canlılık boyaması gerçekleştirildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Akan hücre ölçer ile T hücre immünfenotipleme çalışması için kullanılan antikor paneli

Antikor	**Klon**	**Boya/Konjugat**	**Marka**
APC/Cyanine7 anti-human CD27 Antibody	O323	APC/Cyanine7	BioLegend
APC anti-human CD45RA Antibody	HI100	APC	BioLegend
Alexa Fluor® 700 anti-human CD8 Antibody	SK1	Alexa Fluor® 700	BioLegend
Brilliant Violet 421™ anti-human CD137 (4-1BB) Antibody	4B4-1	Brilliant Violet 421™	BioLegend
FITC anti-human CD45 Antibody	HI30	FITC	BioLegend
PE/Cyanine7 anti-human CD197 (CCR7) Antibody	G043H7	PE/Cyanine7	BioLegend
PE/Dazzle™ 594 anti-human CD69 Antibody	FN50	PE/Dazzle™ 594	BioLegend
PE anti-human CD4 Antibody	OKT4	PE	BioLegend
PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD3 Antibody	OKT3	PerCP/Cyanine5.5	BioLegend
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	-	Zombie Aqua™	BioLegend

Öncelikle lenfosit popülasyonu, hücrelerin boyut (FSC) ve granülaritesine (SSC) göre kapılanarak tanımlandı. Ardından, canlı CD3+ T hücreleri ayrıştırıldı ve bu hücreler CD4+ ve CD8+ T hücreleri olarak alt gruplara ayrıldı. CD8+ T hücreleri üzerinden aktivasyon ve farklılaşma belirteçlerine göre daha ileri alt sınıflandırmalar yapıldı. Akan hücre ölçer yöntemi kullanılarak yapılan immün fenotiplemeye ait kapılama stratejisi Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

CD8+ T hücre alt popülasyonları, aşağıdaki fenotiplere göre tanımlanmıştır:

Naive T hücreleri (T_{NAIVE}): CD45RA+CCR7+CD27+

Merkezi bellek T hücreleri (T_{CM}): CD45RA–CCR7+CD27+

Efektör bellek T hücreleri (T_{EM1}): CD45RA–CCR7–CD27+

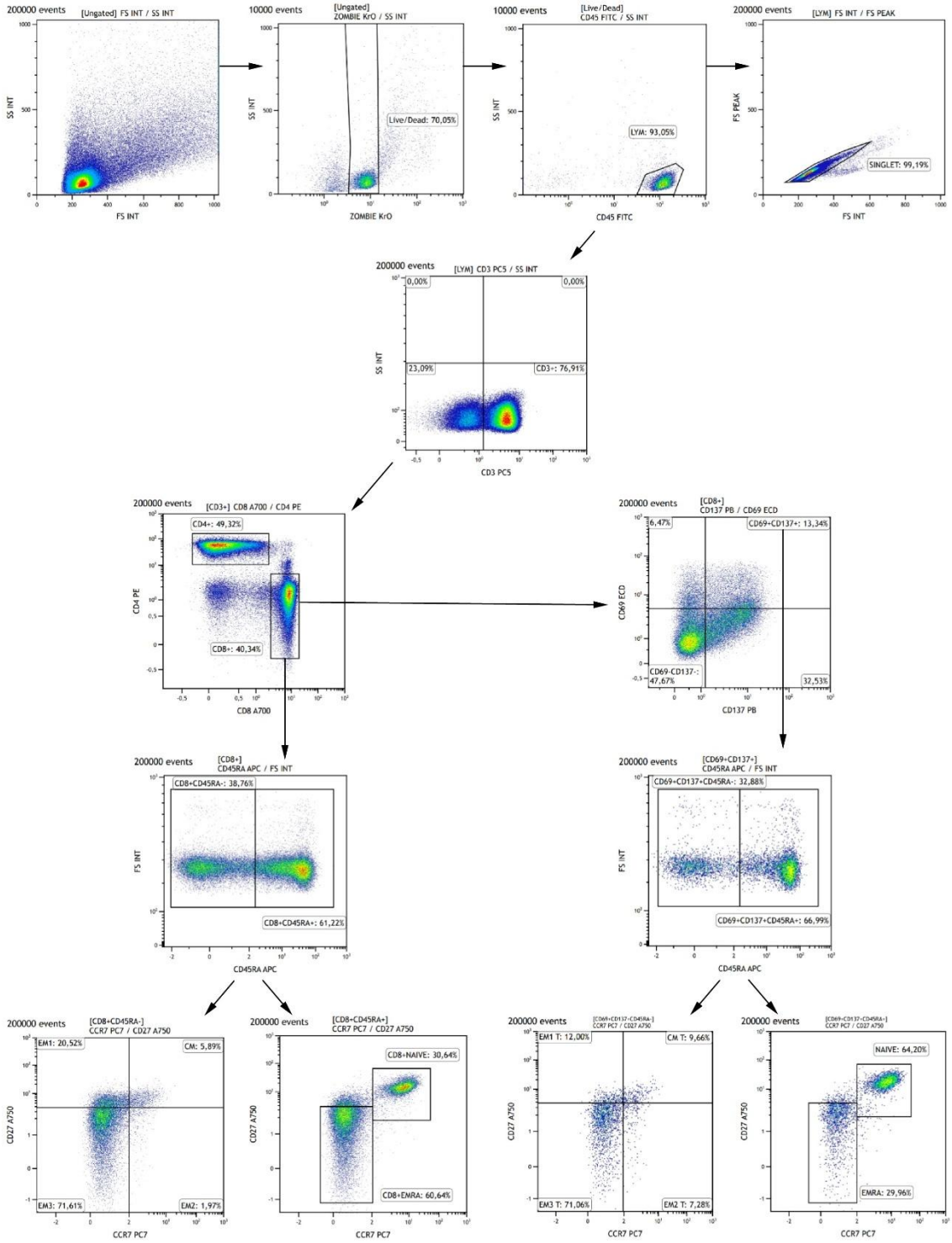
Efektör bellek T hücreleri (T_{EM2}): CD45RA–CCR7+CD27–

Efektör bellek T hücreleri (T_{EM3}): CD45RA–CCR7–CD27–

Terminal farklılaşmış efektör bellek T hücreleri (T_{EMRA}): CD45RA+CD27–CCR7–

T hücre aktivasyonuna ilişkin erken aktivasyon belirteçlerinden CD69 ve geç aktivasyon belirteçlerinden CD137 (4-1BB) ekspresyonları da analiz edilerek stimülasyon sonrası hücre aktivitesi değerlendirildi.

Tüm hücre alt popülasyonlarının yüzde dağılımları, akan hücre ölçer cihazı kullanılarak kantitatif olarak belirlendi. Her bir çalışmaya dahil edilen örnekte, peptit havuzu ile stimüle edilmemiş (unstimüle) negatif kontrol, wild type-spesifik (referans peptit havuzu ile stimüle edilen) bellek CD8+ T hücre popülasyonları ile mutasyon-spesifik (Omicron) bellek CD8+ T hücre popülasyonları karşılaştırmalı olarak analiz edildi.



Şekil 3.1: T hücre aktivasyonu ve bellek T hücreleri immün fenotiplemesine ait kapılama stratejisi gösterilmiştir

Çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar, sarf malzemeler ve yazılımlara ait bilgi Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler, cihazlar, yazılım ve algoritmalara ait bilgiler

Kimyasal İsmi	**Markası**
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, Modified, Without Calcium Chloride And Magnesium Chloride, Sterile-Filtered	Sigma Aldrich, D8537
Ficoll® Paque Plus Cytiva, pack of 6 × 100 mL GE	Sigma Aldrich, GE17-1440-02
RPMI-1640 Medium – With Sodium Bicarbonate, Without L-Glutamine, Liquid, Sterile-Filtered	Sigma Aldrich, R0883
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher
L-Glutamine solution 200 mM, sterile-filtered	Sigma Aldrich, G7513
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich, F7524
PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete (6 nmol/peptid)	Miltenyi Biotec
PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.2 Mutation Pool	Miltenyi Biotec
PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.5 Mutation Pool	Miltenyi Biotec
CytoStim, human (200µL)	Miltenyi Biotec
OptiLyse C Lysing solution	Beckman Coulter, A11895
IsoFlow Sheath Fluid	Beckman Coulter, 8417170-AD
Malzeme ismi	**Markası**
Vacuette Tube 9 ml LH Lithium Heparin	Greiner Bio-One GmbH
Santrfüj tüpü – vidalı kapaklı – 15 ml ve 50 ml– DNA/RNA free – gamma steril (ve non-steril)	Isolab
Steril hücre kültürü – U tabanlı-0,2 ml-96 kuyulu plak	Isolab
Counting chambers, Thoma lamı	Thoma new
Cihaz ismi	**Markası**
1580R Multi-Purpose (High-Speed) Refrigerated Centrifuge 15000 rpm	Gyrozen
Leica LCD Ekranlı Yarı Otomatik Inverted Floresan Mikroskop	Leica DM IL FED Fluo, 11521265
CO2 İnkübatörü HF90 ve 2 adet CO2 Tankı	Heal Force CO2 Incubator
BIOBASE Sınıf II A2 Biyolojik Güvenlik Kabini	BIOBASE BSC-1300IIA2-X
Beckman Coulter Navios 10 Color Flow Cytometer	Beckman Coulter, AY08109

Tablo 3.2 (devam)

Yazılım ve Algoritmalar	Bağlantı
Kaluza	https://kaluzasoftware.com
IEDB	https://www.iedb.org
GISAID	(https://gisaid.org/hcov19-variants/
NetMHCpan EL 4.1	http://tools.iedb.org/mhci/help/
Google colab	https://colab.google/
Python 3.14	https://www.python.org/
GraphPad Prism 8.0.2	https://www.graphpad.com
Adobe Illustrator 2025	https://www.adobe.com/
Github	https://github.com/aylinseheruzunoglu/SARS-CoV-2-Omicron-CD8-T-cell-Epitope-Analysis.git

3.7. ORİGİNAL ANTİJENİK SİN'NİN SARS-CoV-2 CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİ ARAŞTIRILMASI

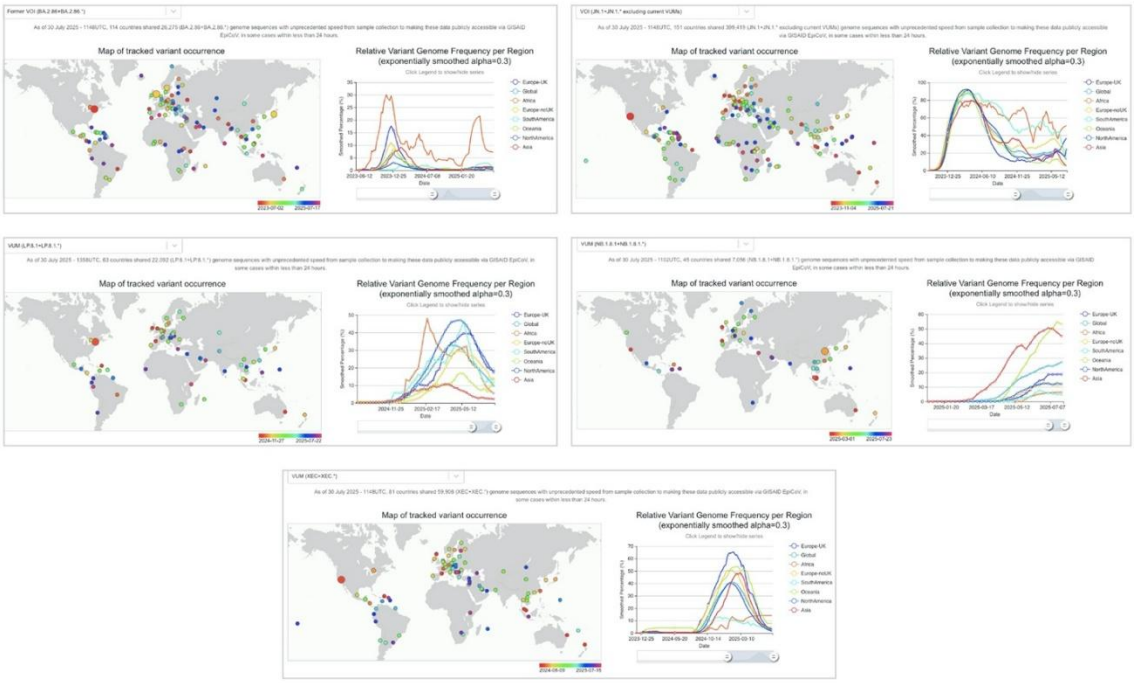
Çalışmanın bu aşamasında, OAS fenomeninin SARS-CoV-2 varyantlarına ait Spike (S) proteinlerinin CD8+ T hücreleri tarafından tanınmasını etkileyip etkilemediği, hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Ayrıca immünodominant ve immünojenik CD8+ T hücre epitopları belirlenmiş ve SARS-CoV-2'nin varyantları arasında cross-reaktivite gösteren epitoplar tanımlanmıştır. İmmünodominant ve immünojenik CD8+ T hücre epitoplarının popülasyonda yaygın olan HLA tipleriyle olan ilişkisi ve HLA-kısıtlama türleri incelenmiştir.

3.8. BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1, VE XEC VARYANTLARININ DENEYSEL OLARAK TANIMLANMIŞ CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ANALİZİ

CD8+ T hücrelerine yönelik epitop tahmin analizleri için, SARS-CoV-2 pandemisinin başlangıç ve güncel dönemlerini temsil eden iki farklı zaman aralığında ortaya çıkmış varyantlara ait spike protein sekansları kullanılmıştır.

Pandeminin başlangıç dönemini (2019-2020) temsil etmek üzere Wild-type spike glikoproteini için UniProt: P0DTC2 referans sekansı esas alınmıştır. Çalışma kapsamında, SARS-CoV-2'nin evrimsel sürecini ve immün kaçış potansiyeli yüksek olan

güncel varyantları temsil etmek amacıyla, NCBI veritabanından geniş bir zaman projeksiyonunu kapsayan Spike (S) protein dizileri seçilmiştir. Bu doğrultuda; pandeminin farklı evrelerini ve rekombinant soyları yansıtan BA.2.86 (Erişim No: WPF43847.1, 29.10.2023), JN.1 (Erişim No: XAF39075.1, 2023), XEC (Erişim No: XYC76357.1, 22.12.2024) ile en güncel dolaşımda bulunan NB.1.8.1 (Erişim No: XTZ48487.1, 30.04.2025) ve LP.8.1 (Erişim No: XWN56510.1, 14.05.2025) varyantlarına ait sekanslar analize dahil edilmiştir. 2023 son çeyreğinden 2025 yılının ortasına kadar uzanan bu veri seti, *in silico* epitop öngörülerinin sadece statik bir dönemle sınırlı kalmamasının, aksine virüsün antijenik sürüklenme (antigenic drift) neticesinde kazandığı en güncel mutasyonel profillerin ve bağışıklık sisteminden kaçış stratejilerinin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini mümkün kılmıştır.



Şekil 3.2: Temmuz 2025 GISAID verilerine göre SARS-CoV-2 varyantlarının küresel yayılımı ve bölgesel sıklık değişimleri. Sol taraftaki paneller, ilgili varyantlara ait genom dizilerinin tespit edildiği ülkelerin coğrafi dağılımını göstermektedir. Sağ taraftaki paneller ise varyantların kıtalara göre zaman içindeki göreli frekans değişimlerini yansıtmaktadır. Çizgi grafikler, üstel düzeltmeli hareketli ortalama (α=0,3) yöntemi kullanılarak pürüzsüzleştirilmiştir (97).

Çalışmaya dahil edilen varyantlar, güncel dolaşımdaki Omicron varyantlarının temsil gücü göz önünde bulundurularak iki grupta seçilmiştir: son dönemde tanımlanan yeni varyantlar (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) ve daha önce baskın hale gelmiş varyantlar (JN.1 ve BA.2.86) (Şekil 3.2). Bu sınıflama, GISAID Lineage Frequency veritabanı ve NextStrain analiz aracı (98) üzerinden elde edilen varyant sıklığına dayalı olarak yapılmıştır.

İlgili spike protein dizileri, NCBI Virus Veritabanı'ndan SARS-CoV-2 Data Hub arayüzü kullanılarak elde edilmiştir. Her bir varyant için şu sorgu kriterleri uygulanmıştır: Pango soy ismi (ör. NB.1.8.1, LP.8.1, vb.), protein türü olarak "surface glycoprotein", ve mümkün olan en erken koleksiyon tarihine sahip örnekler tercih edilmiştir. Her bir varyant grubundan 40'tan fazla spike dizisi alınmış, NCBI'nin Çoklu Hizalama aracı ile hizalanmış, ve eksik ya da çerçeve dışı kalıntı içermeyen, biyolojik açıdan temsili en iyi sekans seçilerek FASTA formatında dışa aktarılmıştır.

Varyantlara özgü spike mutasyonları ise, GISAID referans genomu olan hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124) dizisi ile karşılaştırmalı analiz yoluyla belirlenmiştir. Bu işlem, GISAID platformundaki CoVsurver aracı üzerinden gerçekleştirilen Mutation Analysis of hCoV-19 variants modülü ve Outbreak.info (98) verileri kullanılarak tespit edilmiştir.

NB.1.8.1, LP.8.1, XEC, JN.1 ve BA.2.86 varyantlarının wild-type T hücre epitopları üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla, CD8+ T hücre epitopları IEDB veritabanından (99,100) (1 Temmuz 2025) aşağıdaki sorgu kriterleri kullanılarak elde edilmiştir: Organizma: SARS-CoV-2 (ID: 2697049), Antijen: Spike glikoproteini (UniProt: PODTC2), yalnızca pozitif test sonuçları dahil edilmiştir; B hücrelerine ve MHC testlerine ait veriler hariç tutulmuştur (101). Konak organizma olarak Homo sapiens (insan) seçilmiş, MHC sınırlaması ise Sınıf I (Class I) ile sınırlandırılmıştır. Epitop uzunluğu, Sınıf I epitopları için 8–12 amino asit aralığında olacak şekilde belirlenmiştir. Bu sorgu sonucunda Spike glikoproteinine ait deneysel olarak tanımlanmış toplam 383 adet Sınıf I epitopu elde edilmiştir.

Elde edilen epitoplar, IEDB analiz kaynakları içerisinde yer alan ImmunomeBrowser aracı kullanılarak, hedef proteinin tam uzunluğu boyunca hizalanmış şekilde analiz edilmiştir. Her bir varyant için FASTA dizileri kullanılarak yapılan bu analizde, yalnızca wild-type Spike protein dizisiyle %100 örtüşen (tam korunmuş)

epitoplar seçilmiştir. Bu analiz sonucunda, NB.1.8.1 varyantı için 262, LP.8.1 için 253, XEC için 258, JN.1 için 270 ve BA.2.86 için 269 adet örtüşen (korunmuş) epitop belirlenmiştir.

SARS-CoV-2 T hücre epitoplarının ve ilgili varyantlardan türetilmiş peptitlerin öngörülen HLA Sınıf I alellerine bağlanma kapasiteleri, IEDB analiz platformu üzerinde uygulanmış olan NetMHCpan EL 4.1 aracı kullanılarak tahmin edilmiştir (102). Bu tahminler, IEDB tarafından sağlanan ve dünya genelinde en sık görülen ve temsil niteliği yüksek olan 27 HLA Sınıf I alelinden oluşan referans allel seti temel alınarak gerçekleştirilmiştir. İlgili referans setin, HLA sınıf I A ve B lokuslarını kapsayarak %97'dan fazla küresel popülasyon temsili sağladığı bilinmektedir.

3.8.1. Seçilen HLA Sınıf I allelleri

HLA-A*01:01, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01, HLA-A*23:01, HLA-A*24:02, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*30:02, HLA-A*31:01, HLA-A*32:01, HLA-A*33:01, HLA-A*68:01, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-B*40:01, HLA-B*44:02, HLA-B*44:03, HLA-B*51:01, HLA-B*53:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01

Sınıf I epitop analizi kapsamında, bağlanma tahminleri yüzde (percentile) skorlarıyla değerlendirilmiştir. Analizlerde yalnızca güçlü bağlayıcı peptitler dikkate alınmış; bu kapsamda, 9 ve 10 amino asit uzunluğundaki Sınıf I peptit dizileri, bağlandıkları HLA alleline göre yüzde skorları ≤1 olanlar şeklinde filtrelenmiştir. Her epitop–varyant eşleşmesi için bağlanma afinitesindeki farklılığı göstermek amacıyla kat değişim (fold-change, FC) değeri hesaplanmıştır (varyantın değeri / wild-type [WT] değeri).

3.9. NİCEL ANALİZ VE KARŞILAŞTIRMALAR

Bu çalışmada, SARS-CoV-2'nin farklı varyantlarına ait Spike (S) proteini üzerindeki CD8+ T hücresi epitoplarının korunumu ve mutasyonlardan etkilenme düzeyleri, Python programlama dili (sürüm 3.14.0) kullanılarak geliştirilen özel bir hesaplamalı analiz süreci ile incelenmiştir. Veri işleme, analiz ve manipülasyon işlemleri için pandas kütüphanesi temel alınmıştır. Analiz sonuçlarının görselleştirilmesi amacıyla matplotlib, seaborn ve kümeler arası kesişimleri göstermede kullanılan upsetplot kütüphanelerinden yararlanılmıştır.

Analizin ilk aşamasında, farklı SARS-CoV-2 varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) arasında paylaşılan ve her birine özgü olan CD8+ T hücresi epitop setleri arasındaki kesişimler incelenmiştir. Bu amaçla, çoklu setler arasındaki ortak elemanları kantitatif olarak görselleştiren bir UpSet grafiği oluşturulmuştur (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 1). Ayrıca, varyantlar arasındaki epitop paylaşım düzeyleri, her bir varyant çifti için ortak epitop sayısını gösteren bir ısı haritası (heatmap) ile de görselleştirilmiştir. Bu analizler, hem sadece varyantlar arasında hem de wild type (referans) dahil edilerek iki farklı senaryoda tekrarlanmış ve varyantlar arası epitop repertuvarının evrimi değerlendirilmiştir. İkinci aşamada, her bir varyantın epitop setinin, wild type suşun epitoplarına kıyasla korunma oranı belirlenmiştir. Her varyant için, wild type suşta da bulunan epitopların sayısı ve yüzdesi hesaplanmıştır. Bu sayede, hangi epitopların varyantlar boyunca korunduğu ve hangi varyantların wild type epitop repertuvarından ne ölçüde saptığı kantitatif olarak ortaya konulmuştur. Ayrıca, wild type suşta bulunmayan, varyanta özgü (neo-epitop potansiyeli taşıyan) epitoplar da bu analizle tespit edilmiştir. Üçüncü aşamada, varyantları tanımlayan Spike proteini mutasyonlarının, wild type CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki doğrudan etkisi analiz edilmiştir. Her bir varyantın tanımlayıcı mutasyonlarının genomik pozisyonları, wild type epitopların başlangıç ve bitiş koordinatları ile karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma sonucunda, her bir epitop "mutasyona uğramış" (en az bir mutasyon epitopun kodlandığı bölgeye isabet eden) veya "korunmuş" (mutasyondan etkilenmeyen) olarak sınıflandırılmıştır. Her varyant için mutasyona uğrayan ve korunan epitopların toplam sayıları ve yüzdeleri hesaplanmış ve sonuçlar, yığılmış bir çubuk grafik (stacked bar chart) ile sunularak mutasyonların epitop repertuvarı üzerindeki kümülatif etkisi gösterilmiştir. Son olarak, epitopların Spike proteini üzerindeki konumsal dağılımı ve mutasyonlar sonucu akıbetleri, bütüncül bir görselleştirme ile haritalanmıştır. Bu analizde, her bir epitop üç kategoride sınıflandırılmıştır: (1) Korunmuş: Mutasyondan etkilenmemiş ve varyantta varlığı deneysel olarak saptanmış epitoplar. (2) Mutasyona Uğramış Ancak Varlığını Sürdüren: Mutasyondan etkilenmesine rağmen varyantta hâlâ tespit edilebilen epitoplar. (3) Mutasyona Uğramış ve Kaybolan: Mutasyon nedeniyle varyantta artık saptanamayan ve potansiyel bir immün kaçış mekanizmasına işaret eden epitoplar. Bu üç durum, farklı renklerle kodlanarak Spike proteinin amino asit dizilimi üzerinde gösterilmiş ve özellikle immünolojik açıdan kritik olan RBD vurgulanmıştır. Bu

görsel analiz, mutasyonların epitoplar üzerindeki etkisini hem konumsal hem de fonksiyonel bir bağlamda değerlendirme imkanı sunmuştur.,

Bu çalışmada, wild type SARS-CoV-2 suşu ile BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC gibi Omicron alt varyantları arasındaki peptit-MHC sınıf I alel bağlanma afinitesi profillerini karşılaştırmalı olarak analiz etmek amacıyla Python programlama dili ve ilişkili bilimsel kütüphaneler kullanılmıştır. Veri işleme ve manipülasyon işlemleri için pandas, sayısal hesaplamalar için numpy, verilerin görselleştirilmesi için ise matplotlib ve seaborn kütüphanelerinden yararlanılmıştır.

Analizin temelini, NetMHCpan aracından elde edilen peptit-MHC bağlanma tahmin sonuçlarını içeren tabüler veri setleri oluşturmaktadır. Analizde, bir peptidin potansiyel bir T-hücresi epitopu olarak kabul edilmesi için bağlanma gücü persentil sıralamasının ≤1 olması kriteri belirlenmiştir. Bu eşik değerini sağlayan peptitler "güçlü bağlayıcı" olarak sınıflandırılmıştır. Hem wild type hem de varyant veri setleri, yalnızca bu güçlü bağlayıcıları içerecek şekilde filtrelenmiştir. Analizin temel birimi olan her bir özgün peptit-alel etkileşimini tanımlamak için, peptit sekansı ve alel ismi birleştirilerek benzersiz "peptit-alel çiftleri" oluşturulmuştur.

Varyantlardaki mutasyonların immünolojik potansiyel üzerindeki etkisini kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla, her bir varyant ile wild type arasında bağlanma afinitesindeki kat değişimi (fold-change) analizi yapılmıştır. Bu analiz, sadece hem wild type hem de ilgili varyantta güçlü bağlayıcı olarak tespit edilen ortak peptit-alel çiftleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bağlanma afinitesindeki kat değişimi, varyant suşa ait persentil değerinin wild type ait persentil değerine bölünmesiyle hesaplanmıştır. Elde edilen oranın 1'den büyük olması bağlanma afinitesinde bir azalmaya (daha yüksek persentil değeri), 1'den küçük olması ise bir artışa (daha düşük persentil değeri) işaret etmektedir. Değişimin simetrik olarak yorumlanabilmesi ve görselleştirilebilmesi için bu oranların 2 tabanında logaritmik dönüşümü (log2) alınmış ve her bir varyant için histogram grafikleri ile dağılımları incelenmiştir.

Bağlanma afinitesindeki değişimler, etki büyüklüklerine göre üç kategoride sınıflandırılmıştır: persentil oranının 1'e yakın (1.0 ± 0.1 tolerans aralığında) olduğu durumlar "Değişmemiş", 1'den anlamlı derecede küçük olduğu durumlar "Artmış" (afinite artışı) ve 1'den anlamlı derecede büyük olduğu durumlar "Azalmış" (afinite azalması) olarak kategorize edilmiştir. Her bir varyant için

bu üç kategorideki peptit-alel çifti sayıları hesaplanarak özetlenmiş ve varyantlar arası karşılaştırmalı bir çubuk grafik ile sunulmuştur.

Son olarak, wild type suş ve incelenen tüm varyantlarda ortak olarak korunan, yani her bir suşta güçlü bağlayıcı özelliğini sürdüren korunmuş peptit-alel çiftleri tespit edilmiştir (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 2). Bu çekirdek epitop setinin toplam sayısı, incelenen tüm veri setlerindeki toplam benzersiz (unique) peptit-alel çifti sayısıyla karşılaştırılarak, epitop profilindeki korunma ve çeşitlilik düzeyi görsel bir grafikle ortaya konmuştur.

Bu çalışmada, SARS-CoV-2 varyantlarına (Ancestral, BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) ait CD8 T hücresi epitop repertuvarlarını karşılaştırmak ve varyanta özgü mutasyonların bu epitoplar üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek amacıyla bir biyoinformatik analiz pipeline'ı geliştirilmiştir. Analiz, Python programlama dili ve temel bilimsel hesaplama kütüphaneleri kullanılarak yürütülmüştür. Veri işleme, manipülasyon ve analiz süreçleri için pandas kütüphanesi temel alınmıştır. Görselleştirmeler, matplotlib, seaborn ve paylaşılan epitop-HLA çiftlerinin kesişim kümelerini göstermek için upsetplot kütüphaneleri aracılığıyla oluşturulmuştur. Analizin ilk aşamasında, her bir varyant için epitop tahminlerini içeren .tsv formatındaki veri setleri yüklenmiştir. Bu veri setleri, netmhcpan_el percentile (NetMHCpan EL %Percentile) skoruna göre filtrelenmiştir; burada %Percentile skoru ≤1 olan peptitler "güçlü bağlayıcı" (strong binder) olarak kabul edilmiştir. Analizin temel birimi, 'peptit' ve 'HLA aleli' kombinasyonundan oluşan 'peptit-HLA çifti' olarak tanımlanmıştır. Varyantlar arasındaki paylaşılan ve varyanta özgü olan bu çiftlerin dağılımı, bir UpSet diyagramı kullanılarak görselleştirilmiştir. Bu diyagram, hangi peptit-HLA çiftlerinin hangi varyant kombinasyonları tarafından paylaşıldığını kantitatif olarak ortaya koymaktadır. Varyantların epitop sunum profillerini karşılaştırmak için iki düzeyli bir analiz yapılmıştır. İlk olarak, her bir varyant için HLA alelleri başına düşen benzersiz epitop sayıları hesaplanmış ve bu dağılım bireysel bar grafikler (histogramlar) ile gösterilmiştir. İkinci olarak, tüm varyantlardan elde edilen veriler birleştirilerek, HLA alelleri bazında güçlü bağlayıcı epitop sayılarının varyantlar arası doğrudan karşılaştırılmasını sağlayan gruplandırılmış bir bar grafik oluşturulmuştur. Ek olarak, tüm varyant veri setlerinde (Ancestral referans suşu dahil) ortak olarak bulunan, yani korunmuş (preserved) peptit-HLA çiftlerini belirlemek amacıyla bir kesişim analizi (set

intersection) gerçekleştirilmiş ve bu korunmuş çiftlerin listesi dışa aktarılmıştır. Pipeline'ın son aşaması, mutasyon etki analizine odaklanmıştır. Bu amaçla, variant_mutations.xlsx dosyasından her bir varyanta özgü (Ancestral hariç) mutasyon listeleri yüklenmiştir. Her bir güçlü bağlayıcı epitopun genomik koordinatları (başlangıç ve bitiş pozisyonları), ilgili varyantın mutasyon pozisyonları ile çakışıp çakışmadığı açısından değerlendirilmiştir. Bir mutasyon pozisyonu, epitopun genomik aralığı içinde yer alıyorsa, o peptit-HLA çifti "etkilenmiş" (affected/MutationOverlap=True) olarak sınıflandırılmıştır. Her varyant için "etkilenmiş" ve "etkilenmemiş" epitop çiftlerinin oranları pasta grafikler (pie charts) ile görselleştirilmek üzere kod eklenmiştir (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 3). Son olarak, hangi spesifik peptit-HLA çiftlerinin hangi varyantlardaki mutasyonlardan etkilendiğini özetleyen heatmap oluşturmak için kod yazılmıştır. Tüm analiz çıktıları ve ara veriler, ileri analizler için kaydedilmiştir.

Analizin devamında, SARS-CoV-2 Spike proteinine özgü CD8+ T hücresi epitop-HLA allel çiftlerinin farklı varyantlar arasındaki değişimini ve kaybını analiz etmek amacıyla bir biyoinformatik analiz hattı (pipeline) geliştirilmiştir. Analiz hattı, Python programlama dili kullanılarak oluşturulmuş; veri işleme, manipülasyon ve analiz süreçleri için Pandas kütüphanesi, biyoinformatik dizi verilerinin okunması ve işlenmesi için Biopython (SeqIO modülü) ve elde edilen verilerin görselleştirilmesi için Matplotlib ve Seaborn kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Analizin temel girdileri, altı farklı SARS-CoV-2 varyantı ("Ancestral", "BA.2.86", "JN.1", "LP.8.1", "NB.1.8.1" ve "XEC") için önceden hesaplanmış epitop-HLA alel çiftlerini içeren dosyalardır. Ayrıca, pozisyonel haritalama ve domain analizi için "JN.1_reference.fasta" ve "spike_reference.fasta" olmak üzere iki adet referans Spike protein sekansı (FASTA formatında) kullanılmıştır.

Analiz metodolojisi, varyantlar arası epitop setlerinin karşılaştırmalı analizine dayanmaktadır. İlk olarak, her bir varyanta ait epitop-HLA çiftleri (peptit ve alel bilgisi birleştirilerek) Python 'set' (küme) veri yapılarına yüklenmiştir. Bu yapılar, varyantlar arasında verimli küme operasyonlarının (birleşim, kesişim ve fark) yürütülmesine olanak tanımıştır. Pipeline'ın temel analizlerinden biri, "JN.1" veya "BA.2.86" varyant setlerinin birleşiminde (union) bulunan, ancak daha yeni olan "LP.8.1", "NB.1.8.1" ve "XEC" varyantlarının tümünde (intersection of complements) bulunmayan (kaybolan) epitop-HLA çiftlerini spesifik olarak tanımlamaktır. Bu kayıp seti, lost_in_all_newer.tsv adıyla

bir çıktı dosyasına kaydedilmiş ve bu setin tüm varyantlardaki varlık/yokluk profili bir heatmap ile görselleştirilmiştir. Ek olarak, "JN.1" ve "BA.2.86" setlerinin her ikisinde de (kesişim) korunup daha yeni varyantlarda kaybolan çiftler için alternatif bir doğrulama analizi ve heatmap üretilmiştir.

Tanımlanan bu spesifik kayıp setlerinin (JN.1 veya BA.2.86'da korunup yenilerde kaybolanlar) Spike proteini üzerindeki fiziksel ve fonksiyonel konumlarını belirlemek için iki aşamalı bir haritalama prosedürü uygulanmıştır (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 4). İlk aşamada, bu kayıp çiftlerin pozisyonel koordinatları, ancestral.tsv ve ba286.tsv dosyalarından oluşan birleşik bir referans tablosundan alınmıştır. Bu koordinatlar kullanılarak, kayıp epitopların JN.1 reference.fasta dizisi üzerindeki konumlarını gösteren bir harita oluşturulmuş ve koordinat listesi Lost_Epitopes_Positions_JN1.xlsx dosyasına kaydedilmiştir. İkinci aşamada, aynı kayıp epitop listesi (lost_in_all_newer.tsv dosyasından okunarak) spike_reference.fasta dizisine ve önceden tanımlanmış kanonik Spike domainlerine (örn. NTD, RBD, RBM) göre haritalanmıştır. Bu analiz, kayıp epitopların başlangıç pozisyonlarının dağılımını gösteren bir histogram ve her bir fonksiyonel domaine isabet eden kayıp epitop sayısını özetleyen bir sütun grafiği üretmiştir.

Wild type (Ancestral) suşuna kıyasla varyantlara özgü epitop kaybını (epitope loss) kantitatif olarak belirlemek amacıyla bir analiz gerçekleştirilmiştir. Bu analiz, Python programlama dili ve pandas ile glob kütüphaneleri kullanılarak yürütülmüştür. İlk olarak, ancestral.tsv dosyası referans veri seti olarak yüklenmiş ve bu dosyadan tüm "peptit" ve "alel" kombinasyonlarını içeren bir referans kümesi (set) oluşturulmuştur. Takiben, glob modülü aracılığıyla dizindeki diğer tüm varyantlara ait .tsv dosyaları (örn. jn1.tsv, ba286.tsv) otomatik olarak taranmış ve her biri için ayrı ayrı peptit-allel kümesi oluşturulmuştur. Wild type suşunun referans kümesi ile her bir varyant kümesi arasında küme farkı (set difference) işlemi (ancestral_pairs - variant_pairs) uygulanarak, wild type suşunda var olan ancak ilgili varyantta bulunmayan "kayıp" peptit-alel çiftleri izole edilmiştir. Bu kayıp çiftler, her bir varyant için [VaryantAdı]_lost_pairs.tsv formatında (örn. jn1_lost_pairs.tsv) yeni .tsv dosyaları olarak dışa aktarılmıştır.

Analizin ikinci aşamasında, ilk adımda oluşturulan *_lost_pairs.tsv dosyaları pandas kütüphanesi kullanılarak okunmuştur (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 5). Her bir varyant için, kaybedilen toplam peptit-alel çifti sayısı (dosyadaki

toplam satır sayısı) hesaplanmıştır. Bu kantitatif veriler, "Varyant" ve "Kayıp Çift Sayısı" sütunlarını içeren bir veri çerçevesinde (DataFrame) toplanmıştır. Son olarak, matplotlib kütüphanesi aracılığıyla, X ekseninde varyantların, Y ekseninde ise wild type suşuna kıyasla kaybedilen toplam peptit-alel çifti sayısının gösterildiği bir çubuk grafik (bar chart) oluşturulmuştur. Bu görselleştirme ile varyantların epitop profili kaybı karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Bu çalışmada, çoklu viral varyantlar (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasında korunan CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerini tanımlamak ve karakterize etmek amacıyla Python programlama dili tabanlı bir biyoinformatik analiz hattı (pipeline) kullanılmıştır. Analiz süreci, veri yönetimi ve manipülasyonu için pandas kütüphanesini temel almıştır. Görselleştirme aşamaları için matplotlib.pyplot ve seaborn kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Analiz, öncelikle os kütüphanesi aracılığıyla tüm girdi dosyalarının (varyant başına bir TSV dosyası) varlığını doğrulayan bir ön kontrol adımı ile başlamıştır. Analizin ilk aşaması, bağlanma afinitesi için ≤1% filtresi uygulanarak tüm varyantlarda mutlak korunum gösteren epitop–HLA çiftlerinin belirlenmesini kapsamaktadır. Bu süreçte, her bir varyanta ait TSV dosyasından peptide ve allele verileri okunmuş ve her varyant için özgün (unique) epitop–HLA çiftlerini içeren bir set (küme) veri yapısı oluşturulmuştur. Tüm varyant setlerinin matematiksel kesişimi (set intersection) hesaplanarak, yalnızca incelenen varyantların tamamında ortak olarak bulunan "katı korunmuş" çiftler tanımlanmıştır. Ayrıca, korunan bu epitopların HLA allelleri ve HLA lokusları (örn. HLA-A, HLA-B) bazında dağılımını gösteren bar grafikler üretilerek sonuçlar görselleştirilmiştir.

Analizin ikinci aşaması, epitopların öngörülen bağlanma afinitelerini dikkate alan bir filtreleme metodolojisi içermektedir (EK-4. Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 6). Bu aşamada, girdi dosyalarındaki netmhcpan_el percentile (NetMHCpan Eluted Ligand Percentile Rank) sütunu referans alınmıştır. Her bir varyant veri seti, epitop–HLA çiftlerini tanımlamak için kesişim analizine tabi tutulmadan önce, belirlenen bir yüzdelik sıralama eşik değerine (threshold) göre filtrelenmiştir. Bu filtreleme, yalnızca eşik değerden düşük veya eşit skora sahip olan, yani güçlü bağlayıcı (strong binder) olduğu öngörülen çiftleri korumuştur. Bu filtreli analiz süreci, giderek artan bir katılıkta (stringency) olmak üzere dört farklı eşik değeri (sırasıyla ≤0.5, ≤0.2, ≤0.1 ve ≤0.05) için ayrı ayrı tekrarlanmıştır. Her bir eşik değeri için, yalnızca filtrelenmiş setlerin kesişiminde

yer alan, yani hem tüm varyantlarda korunan hem de belirlenen bağlanma gücü kriterini karşılayan epitop–HLA çiftleri nihai sonuç olarak kabul edilmiştir. Ek olarak, en katı eşik değerleri (0.1 ve 0.05) için, en güçlü bağlayıcı olarak tanımlanan korunmuş çiftlerin tüm varyantlardaki varlığını görsel olarak doğrulamak amacıyla heatmap grafikleri oluşturulmuştur.

3.10. HESAPLAMALI ANALİZ VERİLERİ VE KOD ERİŞİLEBİLİRLİĞİ

Bu çalışmada SARS-CoV-2 Omicron alt varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki evrimsel ve yapısal etkilerini incelemek amacıyla özgün bir hesaplamalı analiz hattı (pipeline) geliştirilmiştir. Python tabanlı bu analiz platformu, "Test-Driven Development" (Test Odaklı Geliştirme) prensiplerine sadık kalınarak inşa edilmiş; kodun iç geçerliliği ve doğruluğu üç aşamalı bir validasyon süreciyle sağlanmıştır:

1. Konumsal Doğrulama: Spike proteini üzerindeki mutasyon koordinatlarının referans protein dizileriyle %100 uyumu algoritmik olarak teyit edilmiştir.
2. Deneysel Çapraz Kontrol: *in silico* tahminler, Immune Epitope Database (IEDB) üzerindeki deneysel olarak doğrulanmış epitop listeleriyle karşılaştırılarak yazılımın tahmin başarısı test edilmiştir.
3. Görsel Tutarlılık Analizi: Elde edilen sayısal verilerin UpSet grafikleri, ısı haritaları (heatmap) ve dağılım grafikleri gibi farklı görselleştirme teknikleriyle tutarlılığı kontrol edilmiştir.

Analitik tekrarlanabilirliği (reproducibility) garanti altına almak adına, çalışmada kullanılan tüm kütüphane versiyonları sabitlenmiş ve veri işleme süreci uçtan uca otomatize edilmiştir. Bu standardizasyon, analizlerin aynı veri seti ve parametrelerle tekrarlandığında birebir aynı sonuçları üretmesini sağlamaktadır.

Şeffaflık ve "Açık Bilim" (Open Science) ilkeleri doğrultusunda; geliştirilen tüm hesaplama algoritmaları, veri işleme protokolleri ve kaynak kodları, bağımsız araştırmacıların denetimine ve kullanımına sunulmak üzere GitHub platformunda açık kaynaklı bir depo (repository) olarak arşivlenmiştir (https://github.com/aylinseheruzunoglu/SARS-CoV-2-Omicron-CD8-T-cell-Epitope-Analysis.git). Bu yaklaşım, metodolojinin benzer viral evrim çalışmalarında yeniden

uygulanabilirliğini (reproducibility) ve varyantlar arası korunmuşluk analizlerinin denetlenebilirliğini sağlamaktadır.

Çalışma kapsamında kullanılan beş ana analiz modülü, veri setleri ve ilgili görselleştirme araçlarını içeren GitHub deposuna ait bağlantıda ulaşılabilir olarak, hesaplamalı biyoloji analizlerine ait oluşturulmuş Python pipline'ları gruplandırılarak verilmiştir.

Açık erişime sunulan bu bütünleşik hesaplamalı analiz süreci şu temel aşamaları kapsamaktadır:

1. Mutasyonel Epitop Haritalaması: Varyant spesifik mutasyonların, wild-type epitopların fiziksel ve konumsal bütünlüğü üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.
2. Bağlanma Afinitesi Analizi: NetMHCpan 4.1 algoritması kullanılarak peptit-MHC (pMHC) çiftlerinin HLA Sınıf I bağlanma afinitelerindeki kantitatif değişimlerin (fold-change) ve stabilite farklarının hesaplanması.
3. Kesişim ve Korunum Analizi: Varyantlar arası epitop örtüşmelerinin, "universal" epitopların ve immünolojik çekirdek bölgelerin (conserved core immunome) istatistiksel ve görsel analizi.
4. Yapısal Kayıp Haritalaması: Spike proteini üzerindeki fonksiyonel domainlerde (NTD, RBD, vb.) yoğunlaşan epitop kayıplarının (attrition) konumsal olarak haritalandırılması.
5. Genetik Dağılım ve Hedef Belirleme: Farklı bağlanma eşik değerlerine (bind-level thresholds) göre filtrelenmiş evrensel korunmuş epitopların izole edilmesi ve bunların HLA allel/lokus (A, B, C) bazlı dağılımları analiz edilerek, varyantlardan etkilenmeyen stabil immünolojik hedeflerin tanımlanması.

Sonuç olarak, bu bölümde detaylandırılan hesaplamalı metodoloji, SARS-CoV-2 viral evriminin hücresel bağışıklık üzerindeki izlerini araştırmak adına yüksek çözünürlüklü, doğrulanabilir ve tekrarlanabilir bir analitik metodoloji sunmaktadır. Geliştirilen beş aşamalı pipeline mimarisi, epitop kaybını veya korunumu sayısal olarak ifade etmesinin yanında, aynı zamanda bu değişimlerin yapısal ve immünolojik sonuçlarını bütüncül bir yaklaşımla haritalandırmış ve GitHub veri havuzunda açık erişim olarak paylaşılmıştır.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmanın örneklem büyüklüğü, G*Power (v3.1.9.7) yazılımı kullanılarak çalışma öncesinde (a priori) analiz edildi. İki bağımsız grup (Wt(+) ve Wt(-)) arasındaki ortalamaların karşılaştırılması (t-test for independent means) planlandı; bu doğrultuda etki büyüklüğü d=0.60, anlamlılık düzeyi α=0.05 ve hedeflenen istatistiksel güç 1-β=0.85 olarak belirlendi. Yapılan analiz sonucunda, bu parametreleri sağlamak için her bir grupta 51, toplamda ise 102 katılımcının çalışmaya dahil edilmesi gerektiği hesaplandı. Çalışma sürecinde, gönüllü katılımındaki kısıtlılıklar ve dahil edilme kriterlerinin titizlikle uygulanması nedeniyle her iki grupta 47'şer katılımcıya (Toplam N=94) ulaşılabildi. Ulaşılan bu örneklem sayısı (n1=47, n2=47) ve başlangıçta öngörülen etki büyüklüğü (d=0.60) üzerinden gerçekleştirilen *post-hoc* güç analizi sonucunda, çalışmanın nihai istatistiksel gücü %82 olarak hesaplandı.

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.0.2 sürümü kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin dağılımı Shapiro–Wilk testi ile değerlendirildi. Veriler normal dağılmadığı için parametrik olmayan testler kullanıldı. Aynı bireylerde üç farklı stimülasyon koşulunun (stimüle edilmemiş, S^{WT}, Wild type ile stimüle edilmiş ve S^{O}, Omicron, ile stimüle edilmiş) karşılaştırılması için Friedman testi, ardından Dunn'un çoklu karşılaştırma testi uygulandı. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Pearson Chi-Square testi veya uygun görüldüğünde (beklenen frekansların <5 olduğu durumlarda) Fisher's Exact testi kullanıldı. İki bağımsız gruba ait eşleşmeyen verilerin karşılaştırılması için two-tailed Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Bağımsız gruplar (Wt(+) ve Wt(−)) arasında WT-stimülasyonlu ve Omicron-stimülasyonlu yanıtların karşılaştırılması için Wilcoxon matched-pairs signed rank testi kullanıldı. Parametreler arası korelasyonu ölçmek için Spearman korelasyon testi uygulandı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Wild-type enfeksiyon geçmişine göre 2 gruba ayrılan çalışma grubunda, katılımcıların tamamı mutlaka Omicron varyantı ile enfekte olmuş ve COVID-19 aşılarından 2 veya daha fazla doz aşılanmış kişilerden seçilerek çalışma tamamlanmıştır. Wild-type enfeksiyon geçmişi olan kişiler Grup 1, Wt (+) olarak adlandırılırken wild-type enfeksiyon geçmişi olmayan kişiler ise Grup 2, Wt (-) olarak isimlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplam 94 katılımcının demografik ve klinik özellikleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışma grubuna dahil edilen toplam 94 katılımcının demografik ve klinik parametreleri

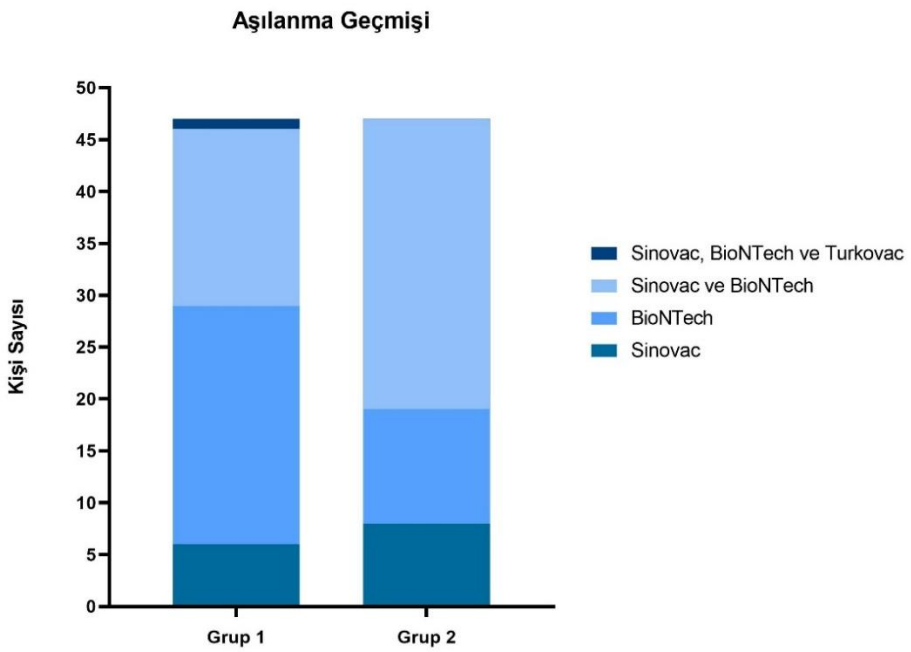
Parametreler	Grup 1 Wt (+)	Grup 2 Wt (-)	p
Kişi sayısı (n)	n=47	n=47	
Yaş (Medyan, IQR)	37 (30-45)	38 (28-45)	0,913 [a]
Cinsiyet			
Kadın (n, %)	34 (%72,3)	36 (%76,6)	0,636 [b]
Erkek (n, %)	13 (%27,7)	11 (%23,4)	
Aşılanma Geçmişi			
Sinovac (n, %)	6 (%12,8)	8 (%17,0)	0,028 [c]
BioNTech (n, %)	23 (%48,9)	11 (%23,4)	
Sinovac ve BioNTech (n, %)	17 (%36,2)	28 (%59,6)	
Sinovac, BioNTech ve Türkovac (n, %)	1 (%2,1)	0	
Aşı Dozu (Medyan, Min-Max)	2 (1-5)	3 (1-7)	0,056 [a]
Geçirilen en son enfeksiyon			
Son 6 ay içerisinde (n, %)	3 (%6,4)	3 (%6,4)	1,000 [c]
Son 9 ay içerisinde (n, %)	1 (%2,1)	0	
9 aydan daha uzun süre önce (n, %)	43 (%91,5)	44 (%93,6)	

Tablo 4.1 (devam)

2022'de COVID-19 enfeksiyon geçmişi			
Var (n, %)	43 (%91,5)	42 (%89,4)	0,726[b]
Yok (n, %)	4 (%8,5)	5 (%10,6)	
2023'de COVID-19 enfeksiyon geçmişi			
Var (n, %)	22 (%46,8)	10 (%21,3)	0,009[b]
Yok (n, %)	25 (%53,2)	37 (%78,7)	

[a]Mann-Whitney U, [b]Pearson Chi-Square, [c]Fisher's Exact testi

Çalışmaya dahil edilen kişilerden çoğunun, en son enfeksiyon geçmişi 9 aydan daha uzun süre önce olmasından dolayı çalışma sadece bir zaman noktasında uygulanmıştır. Uzun süreli SARS-CoV-2 wild type-spesifik ve Omicron-spesifik bağışıklık yanıtları ölçülmüştür. Şekil 4.1'de Gruplar arası katılımcıların aşılanma geçmişine göre dağılımları gösterilmektedir.



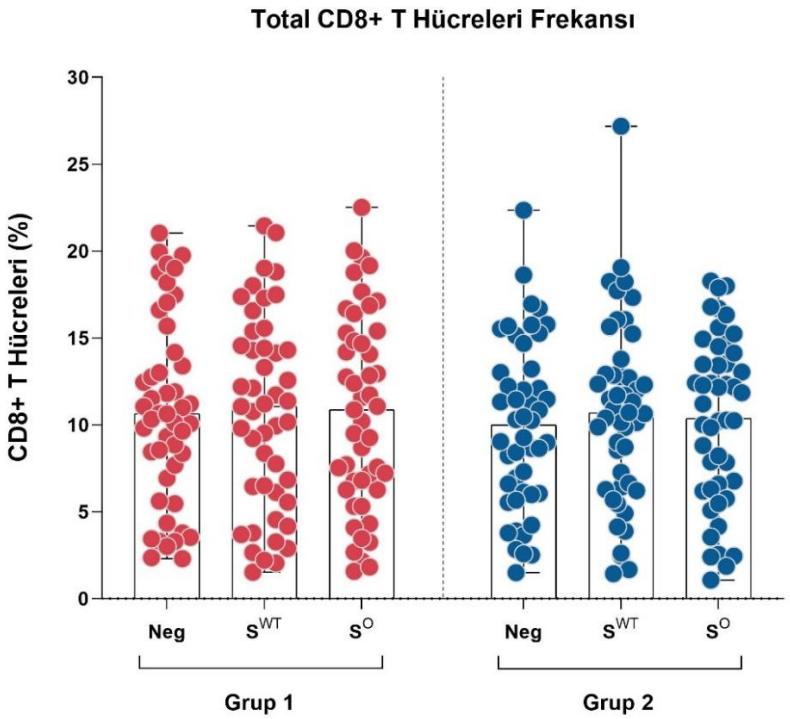
Şekil 4.1: Katılımcıların aşılanma geçmişlerinin gruplar arasındaki dağılımı

Her iki gruptaki katılımcıların çoğu, ya iki doz BioNTech aşısı olmuş ya da üç ve üzeri dozda Sinovac ve BioNTech aşılarını kombine şekilde almıştır.

4.2. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE SPIKE-SPESİFİK CD8+ T HÜCRE POPÜLASYONLARININ ÖLÇÜLMESİ

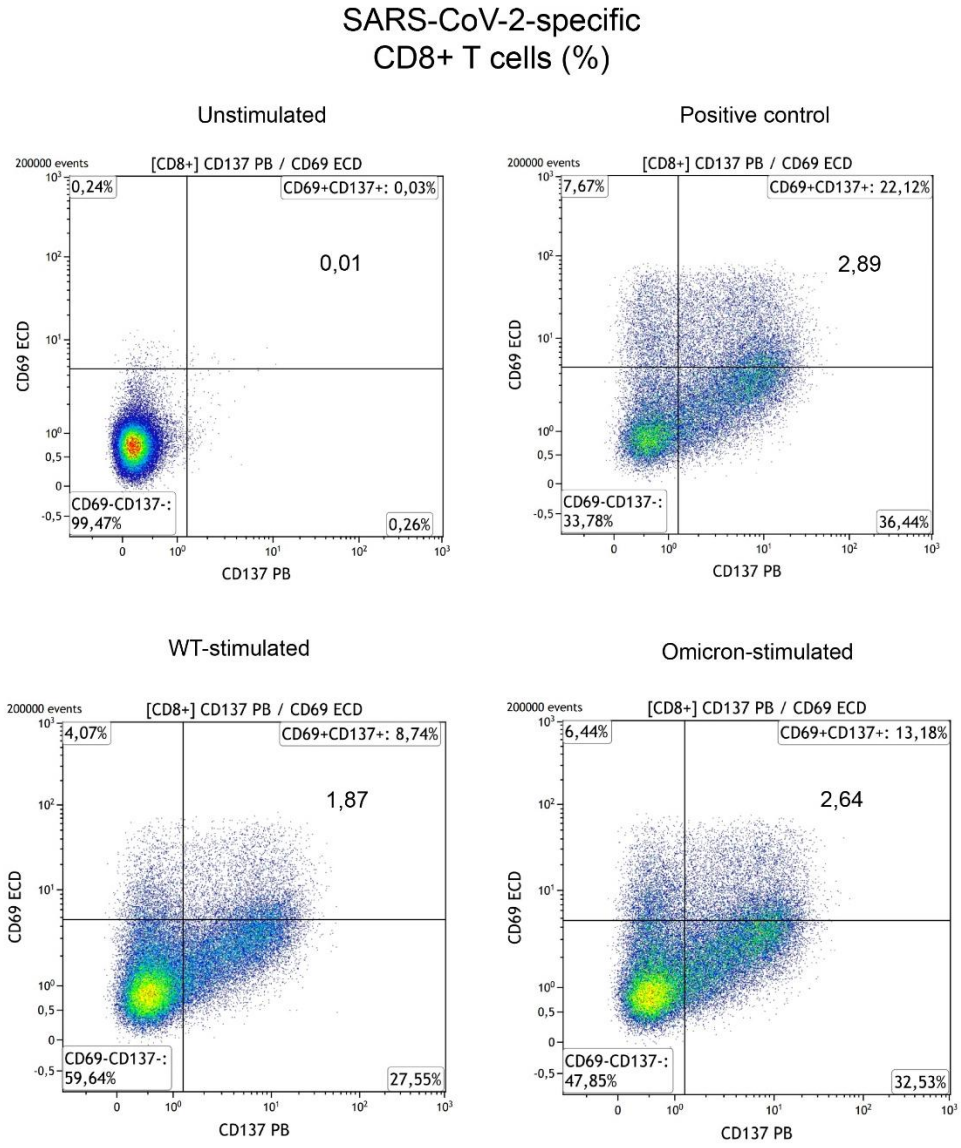
Akan hücre ölçer ile yapılan analizlerde, SARS-CoV-2 peptid havuzları ile stimüle edilen CD8+ T hücrelerinin aktivasyon ve bellek alt tiplerine ait yüzdesel dağılımlar başarıyla belirlendi. Wild type (Wuhan suşu) ve mutasyon (Omicron varyantı) havuzlarıyla stimülasyon sonrası, bellek CD8+ T hücre alt popülasyonlarında farklı yanıt profilleri gözlendi. Aktivasyon belirteçleri olan CD69 ve CD137 ekspresyonları, antijen-spesifik T hücre yanıtlarının değerlendirilebilmesini sağladı. Bu bulgular, uzun süreli T hücre belleğinin varyanta bağlı farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Katılımcıların tamamı COVID-19 konvalesan bireylerden oluştuğu için ve çalışmaya dahil edilme sırasında sağlıklı kişiler olmaları sebebiyle, total CD8+ T hücre frekansları, wild type enfeksiyon geçmişi olan Wt(+) ve olmayan Wt(-) gruplar arasında benzer bulunmuştur. Her üç stimülasyon koşulunda da gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Total CD8+ T hücre popülasyonu, antijen-spesifik yanıtları değil, genel T hücre yüzdesini yansıtmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Wt(+) ve Wt(-) gruplarında total CD8+ T hücre frekansları. Katılımcıların PKMH'leri, stimüle edilmemiş (Neg), SARS-CoV-2 wild type spike peptid havuzu (S^{WT}) veya Omicron spike peptid havuzu (S^{O}) ile 12 saat süreyle inkübe edilmiştir. Akan hücre ölçer analizi ile toplam $CD8^+$ T hücre yüzdeleri belirlenmiştir. Kutu grafiği medyan ve çeyrekler arası aralığı (IQR) göstermektedir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. İstatistiksel analizler Wilcoxon matched-pairs signed rank testi ile gerçekleştirilmiştir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) grupları arasında antijen-spesifik CD8+ T hücre frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

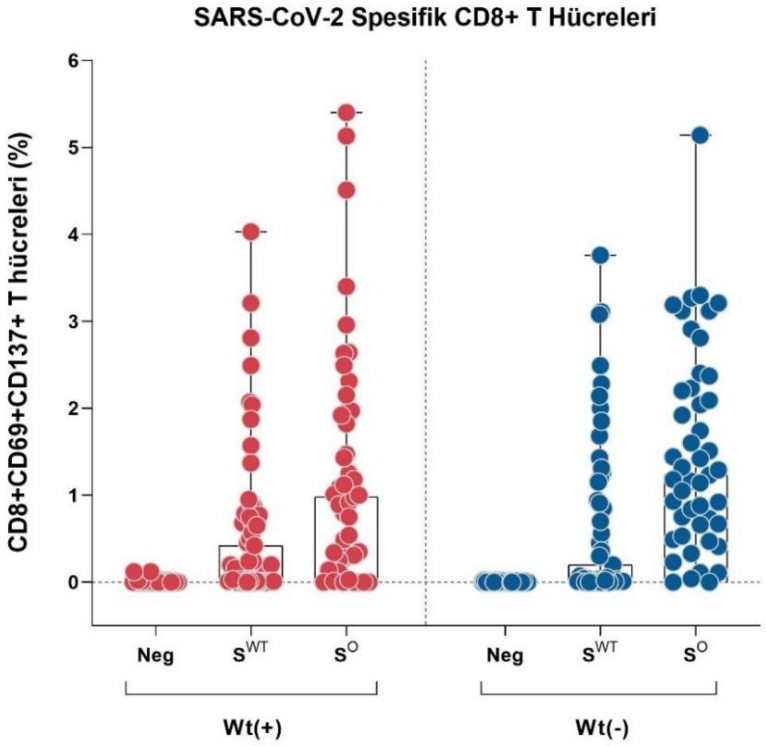
Aşılama veya enfeksiyon sonrası gelişen hücresel bağışıklık yanıtı, CD8+ T hücrelerinin antijene özgü aktivasyonu ölçülerek analiz edilmiştir (Şekil 4.3). Stimüle edilmemiş örneklerde bazal aktivasyon seviyesi (%0,01) oldukça düşük seyrederken, SARS-CoV-2 peptit havuzları ile inkübasyon, CD69+CD137+ hücre popülasyonunda belirgin bir artışa neden olmuştur. Temsili verilerde görüldüğü üzere, S^{WT} (Wild Type) havuzu ile stimülasyon sonucu antijene özgü CD8+ T hücresi oranı %1,87; Omicron (S^{O}) havuzu ile stimülasyon sonucu ise %2,64 olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, bellek T hücrelerinin her iki varyant antijenini de tanıyabildiğini ve efektör fonksiyon (aktivasyon) gösterebildiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3: SARS-CoV-2-spesifik CD8+ T hücreleri stimüle edilmemiş örnekte, pozitif kontrolde, wild type havuzu (S^{WT}) ve omicron havuzu (S^{O}) ile stimüle edilmiş örneklerdeki hücre popülasyonları gösterilmektedir. CD69+CD137+ hücre popülasyonu aktive olmuş CD8+ T hücrelerini göstermektedir. Stimüle edilmemiş (unstimulated) hücre popülasyonu ile karşılaştırıldığında S^{WT} (WT-stimulated) ve S^{O} (Omicron-stimulated) örneklerdeki hücre popülasyonu oranları görülmektedir.

Peptit havuzu ile yapılan stimülasyonlar, negatif kontrolle karşılaştırıldığında antijen-spesifik CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunu tetiklemiştir. Wt(+) ve Wt(−) grupları arasında bu yanıtlar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Negatif

kontrollerde her iki grupta da CD69+CD137+ hücre frekansı beklenildiği gibi çok düşük ya da sıfıra yakın tespit edilmiştir (Şekil 4.4).

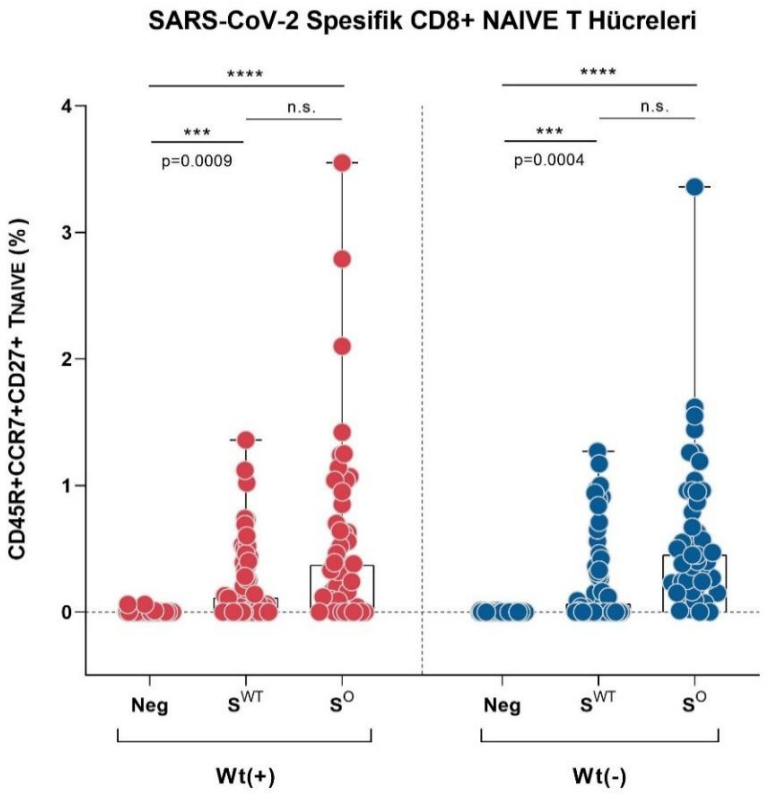


Şekil 4.4: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında CD8+CD69+CD137+ T hücre frekansları. Katılımcıların PKMH'leri stimüle edilmemiş (Negatif), SARS-CoV-2 wild type spike peptid havuzu (S^{WT}) veya Omicron spike peptid havuzu (S^{O}) ile 12 saat inkübe edilmiştir. Akan hücre ölçer ile değerlendirilen CD69+CD137+ aktivasyon belirteçlerini taşıyan CD8+ T hücre frekansları, antijen-spesifik yanıtları göstermektedir. Her iki grupta da negatif kontrolde frekans %0'a yakınken, S^{WT} ve S^{O} stimülasyonları ile antijen-spesifik aktivasyon belirginleşmiştir. Kutu grafiği medyan ve çeyrekler arası aralığı (IQR) göstermektedir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. İstatistiksel analizler Wilcoxon matched-pairs signed rank testi ile gerçekleştirilmiştir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(-) (n = 47) grupları arasında antijen-spesifik CD8+ T hücre yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Akan hücre ölçer analizi ile, peptit havuzlarıyla stimülasyon sonrası T_{NAIVE} hücre popülasyonlarının yüzdelik frekansları tespit edilmiştir. Gruplar arası, aktivasyon sonrası CD8+ T hücrelerinin, farklı antijen stimülasyonlarına (Neg, S^{WT}, S^{O}) yanıt olarak

aktivasyon sonrası CD69+CD137+ kapısından alınmış naive (CD45RA+CCR7+CD27+) alt popülasyonunun hücre frekansları Şekil 4.5'de gösterilmştir.

T_{NAIVE} hücre popülasyonlarının Neg gruplarında (negatif kontrol – stimülasyon yapılmamış), her iki grup için de naive CD8+ T hücrelerinde aktivasyon sinyali beklendiği gibi oldukça düşüktür. S^{WT} (wild-type spike) ve S^{O} (Omicron spike) stimülasyonları sonrasında her iki grupta da naive CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu artmıştır. Aynı bireylerdeki, S^{WT} ve S^{O} stimülasyonlarının Negatif kontrol ile karşılaştırılmasında, stimüle edilmiş örneklerin frekanslarının anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde CD8+ T hücrelerinde antijen-spesifik aktivasyonundan sonra naive (CD45RA+CCR7+CD27+) hücre popülasyonunun karşılaştırılması. Katılımcıların PKMH'leri, stimülasyonsuz kontrol (Neg), SARS-CoV-2 wild type spike peptid havuzu (S^{WT}) veya Omicron spike peptid havuzu (S^{O}) ile 12 saat inkübe edilmiştir. CD8+ T hücrelerinin naif alt popülasyonu içinde aktivasyon belirteçleri CD69 ve CD137 pozitif olan hücreler akan hücre ölçer ile analiz edilmiştir. Kutu grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Her bir nokta bireysel

bir katılımcıyı temsil etmektedir. Aynı bireydeki 3 veya daha fazla koşulun karşılaştırılması için Friedman testi, ardından Dunn'un çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bağımsız grupların karşılaştırılması için istatistiksel analizler, Wilcoxon matched-pairs signed rank testi ile gerçekleştirilmiştir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) grupları arasında naive CD8+ T hücre frekanslarında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). n.s. $p>0,05$; *$p<0,05$ **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ****$p<0,0001$.

4.3. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE CD8$^+$ T HÜCRELERİNİN BELLEK ALT POPÜLASYONLARININ DAĞILIMI VE GRUP KARŞILAŞTIRMALARI

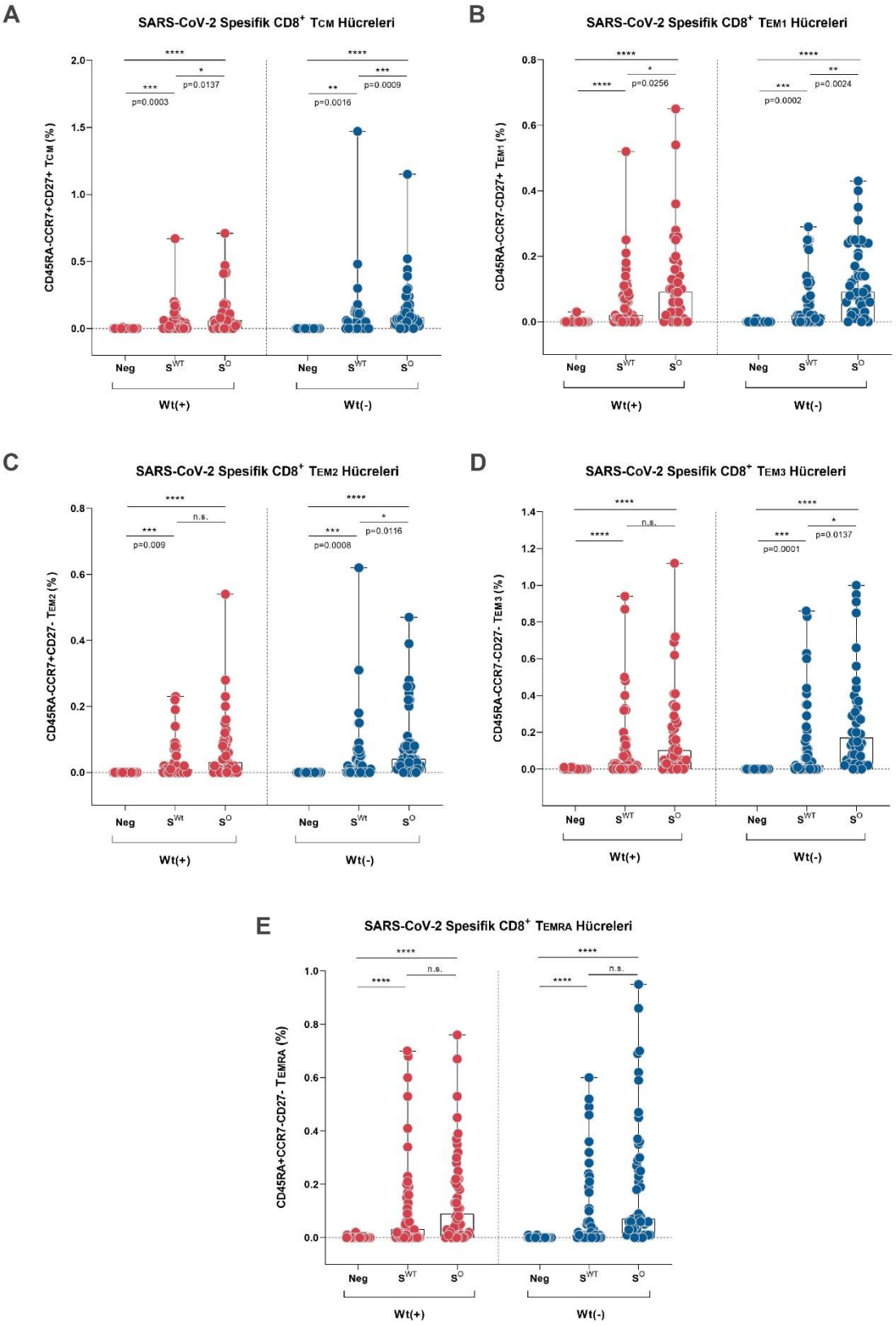
SARS-CoV-2 spike peptitleri ile *in vitro* stimülasyonun ardından, akan hücre ölçer analizi ile aktive olmuş (CD69+CD137+) CD8+ T hücreleri içerisindeki farklı bellek alt gruplarının yüzdelik frekansları belirlenmiştir ve Wt(+) ile Wt(−) grupları arasında karşılaştırılmıştır. Bellek CD8+ T hücreleri, yüzey belirteçlerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

- Merkezi bellek T hücreleri (T_{CM}): CD45RA–CCR7+CD27+
- Efektör bellek T hücreleri 1 (T_{EM1}): CD45RA–CCR7–CD27+
- Efektör bellek T hücreleri 2 (T_{EM2}): CD45RA–CCR7+CD27–
- Efektör bellek T hücreleri 3 (T_{EM3}): CD45RA–CCR7–CD27–
- Terminal farklılaşmış efektör bellek T hücreleri (T_{EMRA}): CD45RA+CD27–CCR7–

Bu analiz, antijen-spesifik CD8+ T hücre aktivasyonunun fonksiyonel bellek profili hakkında ayrıntılı bilgi sunarak, Wt(+) ve Wt(−) bireylerde farklı bellek T hücresi alt tiplerinin bağışıklık yanıtındaki rolünü değerlendirmemizi sağlamıştır. Yapılan fenotipik analizler sonucunda, bellek CD8+ T hücre havuzunun heterojen bir dağılım sergilediği ve farklı maturasyon aşamalarını temsil eden alt gruplara ayrıldığı saptanmıştır. Bu alt gruplar içerisinde özellikle T_{EM2} (CD45RA–CCR7+CD27–) popülasyonu, sahip olduğu özgün yüzey belirteçleri nedeniyle vurgulanması gereken bir noktadır. Literatürde tanımlanan lineer farklılaşma modellerine göre, merkezi bellek (T_{CM}) hücrelerinin efektör fonksiyon kazanma sürecinde CCR7 ekspresyonunu korurken CD27 molekülünü kaybetmesi, bu hücrelerin 'geçişsel efektör bellek' (transitional

effector memory) fazında olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda saptanan T_{EM2} frekansları, hücrelerin lenfoid dokulara homeing (geri dönüş) yeteneğini sağlayan CCR7 reseptörünü henüz yitirmeden, terminal farklılaşma yoluna girdiklerini ve efektör programa geçiş yaptıklarını göstermektedir. Bu geçişsel fenotip, SARS-CoV-2 stimülasyonuna yanıt olarak T_{CM} havuzundan efektör hücre tipine doğru gerçekleşen aktif bir hücre akışının ve dinamik bir immün farklılaşmanın göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Akan hücre ölçer analizleri ile, peptit havuzlarıyla stimülasyon sonrası T_{CM}, T_{EM1}, T_{EM2}, T_{EM} ve T_{EMRA} hücre popülasyonlarının yüzdelik frekansları tespit edilmiştir. Gruplar arası, aktivasyon sonrası bellek CD8+ T hücre alt popülasyonlarının, farklı antijen stimülasyonlarına (Neg, S^{WT}, S^{O}) yanıt olarak aktivasyon sonrası CD69+CD137+ kapısından alınmış hücre frekansları Şekil 4.6'da gösterilmştir. Bu analiz ile, peptit stimülasyonuyla aktive olmuş CD8+ T hücre yanıtları (S^{WT}ve S^{O}) hem birbirleriyle hem de Neg hücre grubu ile karşlaştırılmıştır. Böylece, peptit stimülasyonu sonucunda CD8+ T hücrelerinin aktivasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.6: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında, SARS-CoV-2 spike antijenlerine yanıt olarak aktive olan (CD69+CD137+) CD8+ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının yüzdelik frekansları. Akan hücre ölçer ile **(A)** T_{CM}: CD45R−CCR7+CD27+, **(B)** T_{EM1}:

CD45RA−CCR7−CD27+, **(C)** T_{EM2}: CD45RA−CCR7+CD27−, **(D)** T_{EM3}: CD45RA−CCR7−CD27− ve **(E)** T_{EMRA}: CD45RA+CD27–CCR7– hücre popülasyonları, stimüle edilmemiş kontrol (Neg), SARS-CoV-2 wild type spike peptid havuzu (S^{WT}) ve Omicron spike peptid havuzu (S^{O}) ile stimüle edilmiş PKMH'lerde ölçülmüştür. Kutu grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Aynı bireydeki 3 veya daha fazla koşulun karşılaştırılması için Friedman testi, ardından Dunn'un çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. İki ayrı grubu karşılaştırmak için Wilcoxon matched-pairs signed rank testi yapılmıştır. $p<0,05$ düzeyinde anlamlı farklılıklar yıldızlarla gösterilmiştir. n.s. $p>0,05$; *$p<0,05$ **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ****$p<0,0001$.

Her iki grupta da, stimülasyona yanıt olarak merkezi bellek CD8+ T hücrelerinin (T_{CM}: CD45RA−CCR7+CD27+) frekanslarında anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. Dunn'un çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre, Wt(+) grubunda hem SARS-CoV-2 wild type spike (S^{WT}) hem de Omicron spike (S^{O}) peptid havuzları ile stimülasyon, stimüle edilmemiş negatif kontrole (Neg) kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir (S^{WT} vs. Neg, $p=0,0003$; S^{O} vs. Neg, $p<0,0001$). Ayrıca, S^{O} stimülasyonunun S^{WT}'ye kıyasla da daha yüksek yanıt oluşturduğu saptanmıştır ($p=0,0137$). Benzer şekilde, Wt(–) grubunda da S^{WT} ve S^{O} stimülasyonları Neg hücre grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir (sırasıyla, $p=0,0016$ ve $p<0,0001$). S^{O}'nun S^{WT}'ye göre daha güçlü bir yanıt indüklediği bu grupta da belirgin olarak gözlenmiştir ($p=0,0009$). Bu bulgular, hem daha önce wild type virüsle doğal enfeksiyon yoluyla karşılaşmış Wt(+) hem de karşılaşmamış Wt(–) bireylerde Omicron spike peptidlerinin merkezi bellek ve efektör bellek CD8+ T hücrelerini etkili şekilde aktive ettiğini ve bellek hücre alt popülasyonunun varyantlara karşı çapraz reaktivite potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Her iki çalışma grubunda da $T_{EM1-2-3}$ bellek alt gruplarının S^{WT} ve S^{O} stimülasyon yanıtları Neg grubundan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Omicron spike peptidlerinin (S^{O}), wild type peptidlere (S^{WT}) kıyasla genellikle daha yüksek frekansta hücre uyarımı yaptığı tespit edilmiştir.

T_{EMRA} hücre popülasyonlarının Neg gruplarında (negatif kontrol – stimülasyon yapılmamış), her iki grup için de aktivasyon sinyali beklendiği gibi oldukça düşüktür. S^{WT} (wild-type spike) ve S^{O} (Omicron spike) stimülasyonları sonrasında her iki grupta da

T_{EMRA} hücrelerinin aktivasyonu artmıştır. Aynı bireydeki, S^{WT} ve S^{O} stimülasyonlarının Negatif kontrol ile karşılaştırılmasında anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$).

CD8+ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının farklı peptit stimülasyonlarına göre ölçülen yanıtların kantitatif değerlendirmesini yapmak için, SARS-CoV-2 S^{WT} ve S^{O} peptit uyarımları sonrasında ölçülen frekansların medyan değerleri Wt(+) ve Wt(-) gruplarında karşılaştırılmıştır (Tablo 4.2). Veriler, popülasyon içi varyasyonu temsil etmek amacıyla Medyan (IQR) olarak verilmiştir. S^{WT} ve S^{O} grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık Mann-Whitney testi ile ölçülmüştür.

Tablo 4.2: Bellek CD8+ T hücre alt tiplerinin gruplar arası kantitatif karşılaştırılması

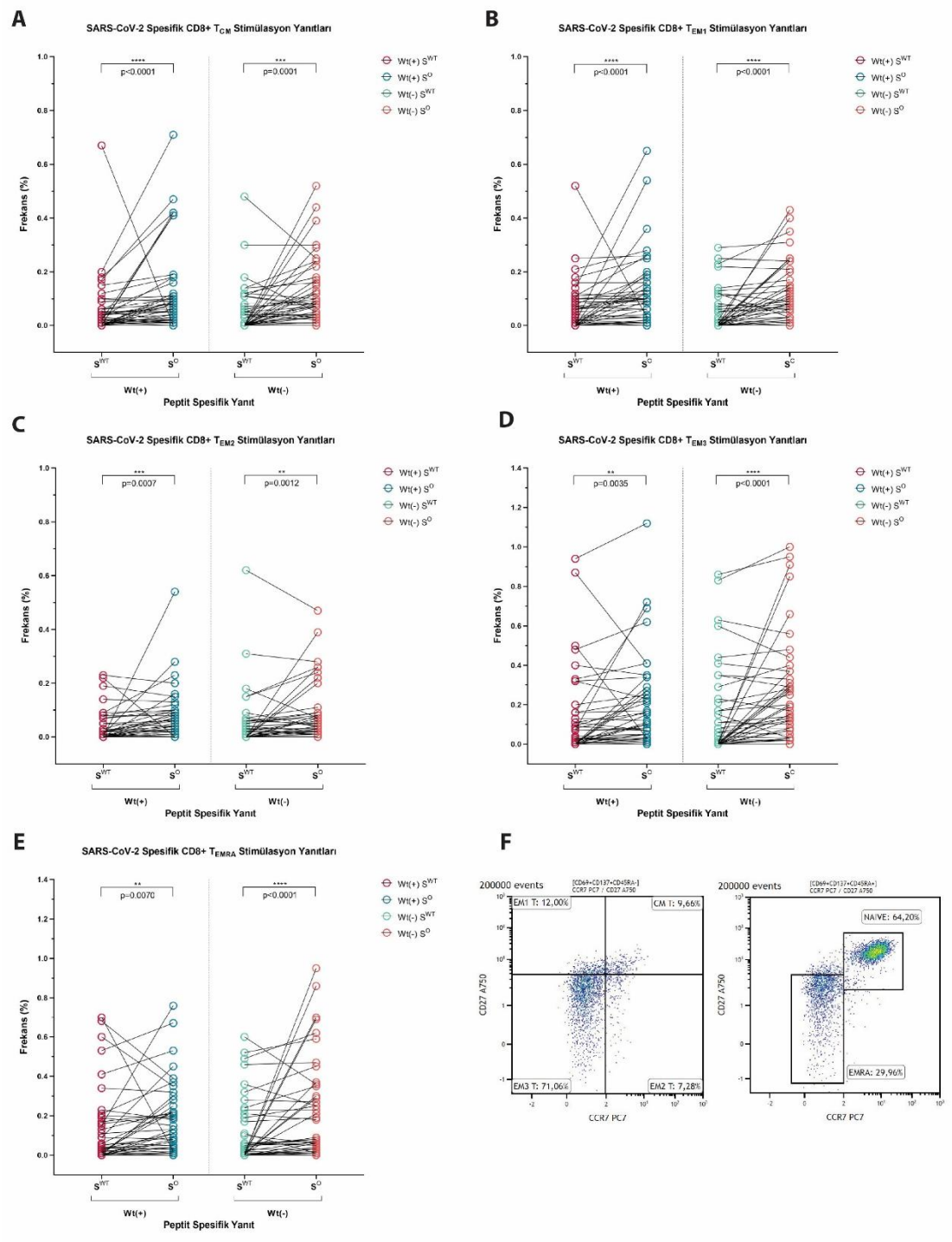
	S^{WT} Medyan (IQR)		**p**	**S^{O} Medyan (IQR)**		**p**
	Wt(+)	**Wt(-)**		**Wt(+)**	**Wt(-)**	
T_{CM} (%)	0,020 (0,00-0,060)	0,010 (0,00-0,110)	0,7767	0,060 (0,010-0,110)	0,080 (0,040-0,180)	0,096
T_{EM1} (%)	0,020 (0,00-0,090)	0,020 (0,00-0,110)	0,8337	0,090 (0,010-0,160)	0,090 (0,050-0,210)	0,1927
T_{EM2} (%)	0,010 (0,00-0,050)	0,010 (0,00-0,050)	0,9952	0,030 (0,000-0,090)	0,040 (0,020-0,090)	0,2316
T_{EM3} (%)	0,030 (0,00-0,160)	0,020 (0,00-0,170)	0,6917	0,100 (0,020-0,250)	0,170 (0,050-0,330)	0,0786
T_{EMRA} (%)	0,030 (0,00-0,160)	0,010 (0,00-0,170)	0,6265	0,090 (0,010-0,220)	0,070 (0,030-0,300)	0,3967

Two-tailed Mann-Whitney testi

Farklı immünolojik geçmişe sahip bireylerde (Wt(+) ve Wt(-)), SARS-CoV-2 Wild-type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) varyantlarıyla gerçekleştirilen stimülasyona verdikleri yanıtların büyüklüğünü karşılaştırmak amacıyla yapılan analizlerde, tüm bellek alt popülasyonlarında (T_{CM}, T_{EM1}, T_{EM2}, T_{EM3} ve T_{EMRA}) Wt(+) ve Wt(-) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Omicron peptid stimülasyonu sonrasında, gruplar arası bellek hücre alt tiplerinde anlamlı bir fark saptanmamakla

birlikte omicron uyarımına karşı oluşturulan yanıtların daha yüksek olduğu görülmektedir.

SARS-CoV-2 spesifik CD8+ T hücresi yanıtlarının kalitesi ve büyüklüğü, her bir bellek alt tipinin farklı antijen stimülasyonlarına (S^{WT} ve S^{O}) verdiği bireysel yanıtlar üzerinden analiz edilmiştir (Şekil 4.7). Akan hücre ölçer analizi ile Wt(+) ve Wt(–) katılımcılarında, SARS-CoV-2 wild-type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) peptid havuzlarına yanıt olarak aktive olan (CD69+CD137+) CD8+ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının frekans değişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4.7: Bellek CD8+ T hücre alt popülasyonlarının antijen spesifik yanıt dinamikleri. **(A)** TCM, **(B)** TEM1, **(C)** TEM2, **(D)** TEM3 ve **(E)** TEMRA hücre popülasyonlarının antijen spesifik yanıtları gösterilmiştir. Hizalanmış nokta grafikleri (alignment plots), her bir bireyin farklı iki antijen uyarımına verdiği yanıtın değişimini eşleştirilmiş (pairwise) olarak göstermektedir. Aynı bireydeki iki spesifik uyarım arasındaki (S^{WT} vs S^{O}) farkların analizi için Wilcoxon matched-pairs signed rank testi kullanılmıştır. **(F)** panelinde, bellek

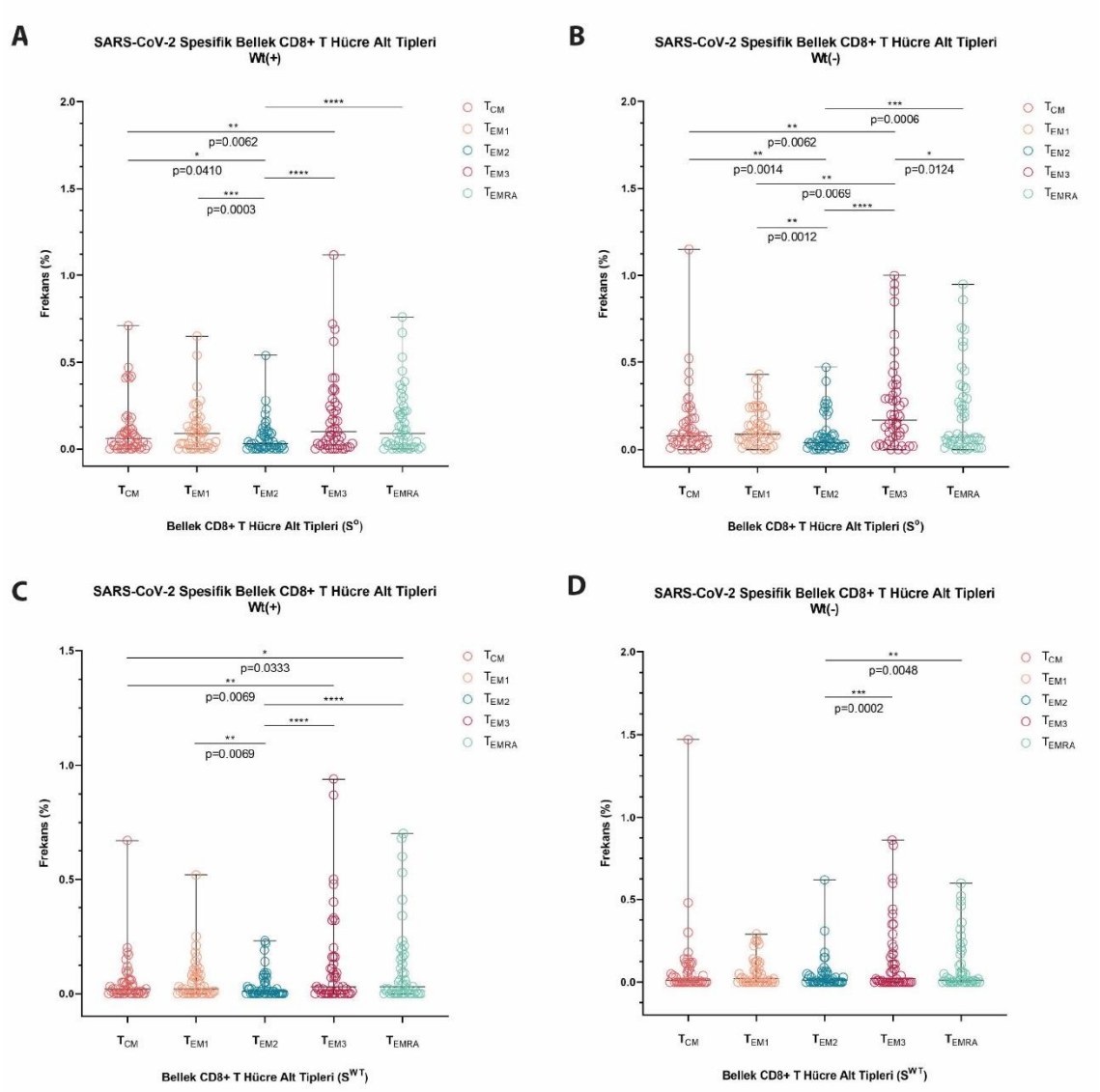
alt tiplerinin belirlenmesinde kullanılan kapılama (gating) stratejisine ait örnek dot-plot görüntüleri yer almaktadır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Eşleştirilmiş (pairwise) analiz sonuçlarına göre, Wt(+) ve Wt(-) gruplarındaki bireylerin büyük çoğunluğunda, Omicron (S^{O}) stimülasyonuna verilen yanıtın, wild type (S^{WT}) stimülasyonuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Özellikle merkezi bellek (T_{CM}) ve efektör bellek ($T_{EM1-2-3}$) alt tiplerinde her iki grupta da $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. T_{EMRA} popülasyonunda da benzer bir artış eğilimi izlenmiş, Wt(+) grubunda $p=0.0070$, Wt(-) grubunda ise $p < 0.0001$ düzeyinde anlamlı farklar tespit edilmiştir. Bu durum, bellek hücrelerinin varyant epitoplarını tanıma ve efektör fonksiyonlarını dinamik bir şekilde yönlendirme kapasitesinin korunduğunu göstermektedir.

Hem doğal enfeksiyon geçmişi olan hem de olmayan bireylerde, Omicron (S^{O}) peptid uyarımına karşı gelişen CD8+ T hücresi yanıtlarının, wild type (S^{WT}) uyarımına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek frekanslar sergilediği saptanmıştır. Bu bulgu, CD8+ T hücresi epitoplarının varyantlar arasında yüksek oranda korunduğunu ve bellek havuzunun yeni varyantları tanıma noktasında geniş bir çapraz reaktivite kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde tartışılan, bağışıklık sisteminin, bir virüsün yeni varyantlarıyla karşılaştığında, yanıtını tercihen (ve bazen kısıtlayıcı bir şekilde) ilk karşılaştığı suşa (original strain) ait epitoplara yöneltmesi olarak bilinen OAS hipotezinin aksine, verilerimiz Wt(+) grubunda Omicron yanıtlarının baskılanmadığını ortaya koymaktadır. Aksine, her iki grupta da S^{O} stimülasyonunun S^{WT}'den daha güçlü bir aktivasyon indüklemesi, hücresel bağışıklığın antijenik değişimlere adapte olabildiğini ve OAS'in CD8+ T hücresi düzeyinde sınırlayıcı bir etki oluşturmadığını kanıtlamaktadır. Her ne kadar wild type enfeksiyonu bağışıklık sisteminde bir 'imprinting' oluşturmuş olsa da, CD8+ T hücre havuzunun geniş çapraz reaktivite kapasitesi, OAS'ın getirebileceği olası kısıtlamalardan etkilenmemiş ve varyant spesifik (Omicron) yanıtların baskılanmasını engellemiştir.

Çalışma kapsamında, SARS-CoV-2 spesifik CD8+ T hücre havuzunun kompozisyonu, merkezi bellek (T_{CM}), efektör bellek alt grupları ($T_{EM1-2-3}$) ve CD45RA'yı

yeniden kazanan terminal efektör bellek (T_{EMRA}) fenotipleri açısından incelenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8: Wt(+) ve Wt(–) gruplarında, SARS-CoV-2 wild type (S^{WT}) veya Omicron (S^{O}) spesifik CD8+ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı dağılımları. Hücreler Omicron varyantı (S^{O}) (**A, B**) ve wild type (S^{WT}) (**C, D**) peptit havuzları ile uyarıldıktan sonra fenotiplerine göre sınıflandırılmıştır. Grafikler, her bir hafıza fenotipinin toplam spesifik yanıt içindeki frekansını ve alt gruplar arasındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir. Saçılım grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) gruplarının her birinde Friedman testi ile anlamlı fark saptanmış, çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizlerde gruplar

arası anlamlılık p değerleri ile belirtilmiştir (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$).

Omicron (S^O) uyarımına karşı bellek dağılımı incelendiğinde, Wt(+) (Şekil 4.8-A) ve Wt(-) (Şekil 4.8-B) gruplarında, Omicron varyantına özgü yanıtın büyük oranda ileri derecede farklılaşmış efektör bellek fenotiplerine kaydığı gözlemlenmiştir. Özellikle T_{EM3} alt grubu, her iki kohortta da en baskın popülasyon olarak tespit edilmiştir. Wt(+) grubunda, T_{EM3} frekansı, daha erken evre bellek hücreleri olan T_{CM} ($p=0.0003$) ve T_{EM1}, ($p=0.0410$) fenotiplerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir. Wt(-) grubunda, benzer bir patern gözlemlenmiştir. T_{EM3} ve T_{EMRA} havuzları belirginleşirken, T_{EM3} ile T_{CM} arasındaki farkın anlamlılığı ($p=0.0012$) bu grupta da korunmuştur. Wild type (S^{WT}) uyarımına karşı bellek dağılımında, orijinal wild type spike proteinine karşı gelişen yanıtta da efektör fenotipe doğru bir kayma tespit edilmiştir. Wt(+) grubunda (Şekil 4.8-C), T_{EM3} popülasyonu, T_{CM} ($p=0.0069$) ve T_{EM1} ($p=0.0333$) gruplarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek frekansta bulunmuştur. Wt(-) grubunda (Şekil 4.8-D), efektör dominansı daha belirgin olup, T_{EM3} fenotipi T_{CM}'ye kıyasla çok yüksek anlamlılıkta ($p=0.0002$) fark yaratmıştır.

Bellek CD8+ T hücresi alt popülasyonlarının (T_{CM}, T_{EM1}, T_{EM2}, T_{EM3} ve T_{EMRA}) varyant spesifik aktivasyon profilleri Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Negatif kontrol (Neg), S^{WT} ve S^O stimülasyonları sonrası elde edilen T_{CM}, T_{EM1}, T_{EM2} ve T_{EM3} frekansları karşılaştırılmıştır. S^{WT}, S^O sıralamaları ve bu sıralamalar arasındaki fark gösterilmiştir. Wt(+) ve Wt(–) gruplarının her birinde Friedman testi ile anlamlı fark saptanmış, çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile değerlendirilmiştir. Beklendiği üzere, uyarılmamış negatif kontrollere kıyasla hem wild type (S^{WT}) hem de Omicron (S^O) havuzları, tüm bellek alt tiplerinde ve her iki çalışma grubunda güçlü aktivasyon indüklemiştir ($p<0,001$). Merkezi bellek (T_{CM}) yanıtları incelendiğinde, her iki grup da Omicron varyantına karşı wild type yanıtına kıyasla daha yüksek aktivasyon göstermiş olsa da, bu yanıt Wt(-) grubunda (Sıra toplamı farkı=35,00), Wt(+) grubuna (Sıra toplamı farkı=27,50) kıyasla daha belirgin ve istatistiksel olarak daha güçlüdür. Efektör bellek (T_{EM}) yanıtları incelendiğinde, T_{EM1} alt kümesi T_{CM} ile benzer bir patern izlerken; daha ileri farklılaşmış efektör bellek hücrelerinde (T_{EM2} ve T_{EM3}) gruplar arasında kesin bir ayrışma gözlenmiştir. Wt(-) grubunda, T_{EM2} ($p=0,0345$) ve T_{EM3} ($p=0,0161$) hücrelerinde Omicron spesifik

aktivasyon üstünlüğünü korurken; Wt(+) grubunda bu alt kümelerin varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ayrım olmadığı (sırasıyla p=0,1501 ve p=0,2664) saptanmıştır.

Tablo 4.3: Wt(+) ve Wt(–) bireylerde, wild type (S^{WT}), Omicron (S^{O}) stimülsyonları ve stimüle edilmemiş (Neg) gruplarında bellek hücre frekanslarının karşılaştırmalı analizi

Wt(+), TCM	**S^{O} Rank sum 1**	**S^{WT} Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	97,50	59,50	38,00	0,0003**
S^{O} vs. Neg	125,0	59,50	65,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	125,0	97,50	27,50	0,0137*
Wt(-), TCM				
S^{WT} vs. Neg	93,50	60,00	33,50	0,0016*
S^{O} vs. Neg	128,5	60,00	68,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	128,5	93,50	35,00	0,0009**
Wt(+), TEM1	**S^{O} Rank sum 1**	**S^{WT} Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	99,00	58,50	40,50	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	124,5	58,50	66,00	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	124,5	99,00	25,50	0,0256*
Wt(-), TEM1				
S^{WT} vs. Neg	96,00	57,50	38,50	0,0002**
S^{O} vs. Neg	128,5	57,50	71,00	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	128,5	96,00	32,50	0,0024**
Wt(+), TEM2	**S^{O} Rank sum 1**	**S^{WT} Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	102,0	59,00	43,00	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	121,0	59,00	62,00	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	121,0	102,0	19,00	0,1501
Wt(-), TEM2				
S^{WT} vs. Neg	99,50	58,50	41,00	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	124,0	58,50	65,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	124,0	99,50	24,50	0,0345*
Wt(+), TEM3	**S^{O} Rank sum 1**	**S^{WT} Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	105,0	55,50	49,50	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	121,5	55,50	66,00	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	121,5	105,0	16,50	0,2664

Tablo 4.3 (devam)

Wt(-), TEM3				
S^{WT} vs. Neg	100,5	54,00	46,50	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	127,5	54,00	73,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	127,5	100,5	27,00	0,0161*
Wt(+), TEMRA	**S^{O} Rank sum 1**	**S^{WT} Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	103.0	58.00	45.00	<0.0001***
S^{O} vs. Neg	121.0	58.00	63.00	<0.0001***
S^{O} vs. S^{WT}	121.0	103.0	18.00	0.1901
Wt(-), TEMRA				
S^{WT} vs. Neg	57.00	97.00	-40.00	0.0001***
S^{O} vs. Neg	57.00	128.0	-71.00	<0.0001***
S^{O} vs. S^{WT}	97.00	128.0	-31.00	0.0042*

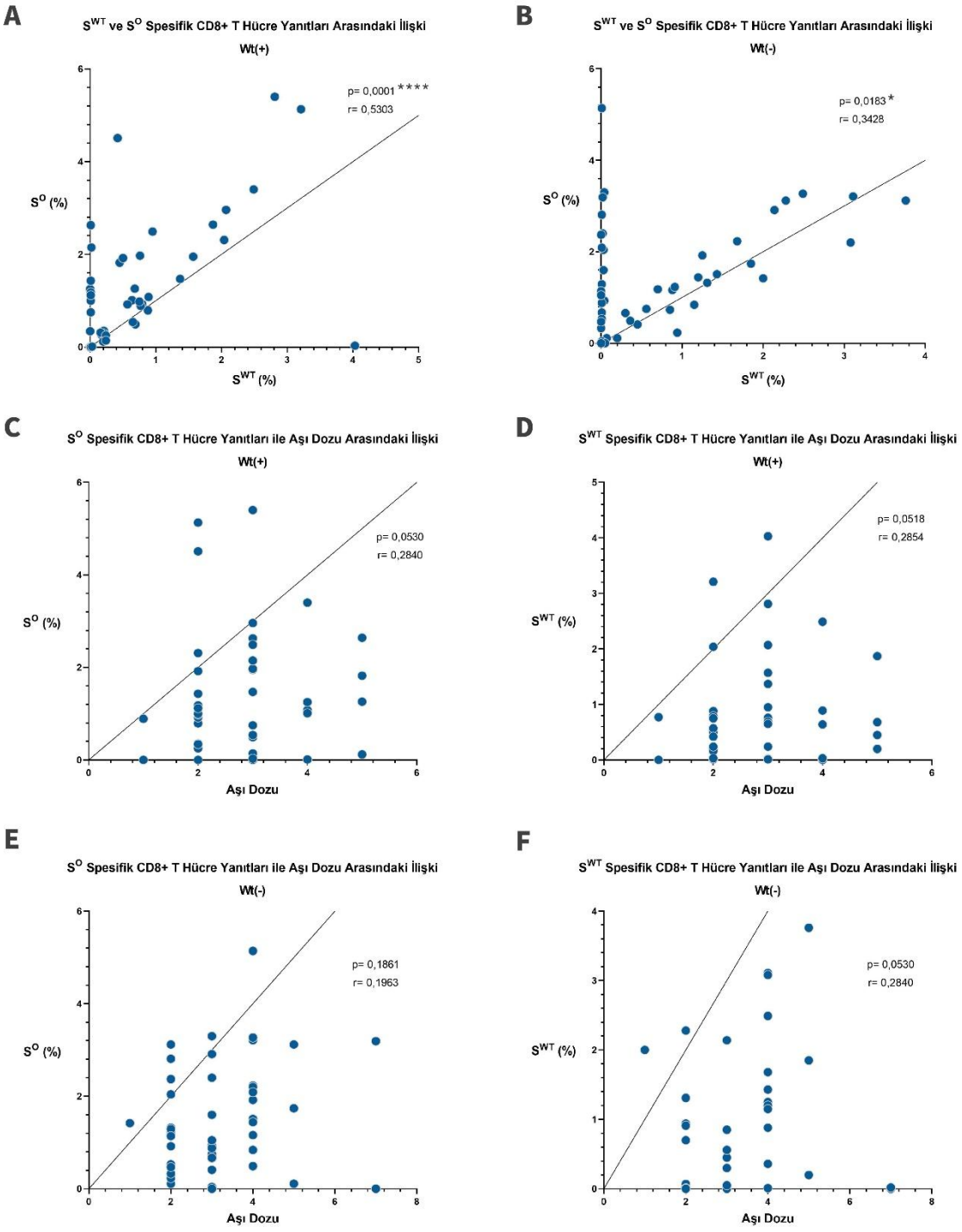
*p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001

Wt(+) ve Wt(–) bireylerde merkezi bellek ve efektör bellek $CD8^+$ T hücre yanıtlarının karşılaştırılması, SARS-CoV-2 Omicron varyantına karşı geliştirilen bağışıklığın enfeksiyon geçmişinden etkilenebileceğini göstermektedir. Bu detaylı analize göre, wild type enfeksiyon geçmişinin (Wt+), efektör bellek aşamalarında yeni varyanta özgü yanıtın büyüklüğünü modüle ettiğini ve varyant ayrım kapasitesini azalttığını göstermektedir.

4.4. KORELASYON ANALİZLERİ

SARS-CoV-2 wild type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) varyantlarına karşı gelişen CD8+ T hücresi yanıtları arasındaki çapraz reaktivite (cross-reactivity), korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.9). Analiz sonucunda, her iki çalışma grubunda da varyantlara özgü yanıtlar arasında pozitif yönlü ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmiştir.

Aşı doz sayısı ile indüklenen CD8+ T hücresi yanıtlarının büyüklüğü arasında doğrudan bir ilişki olup olmadığı Spearman korelasyon analizi ile test edilmiştir (Şekil 4.9). Analiz sonucunda, hem Wt(+) hem de Wt(-) gruplarında aşı dozu ile varyant spesifik T hücresi frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edilmemiştir (p>0,05).



Şekil 4.9: Wt(+) **(A)** ve Wt(-) **(B)** çalışma gruplarında Wild type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) varyantlarına özgü CD8+ T hücresi yanıtları arasındaki ilişkinin analizi. Her iki grupta da varyantlar arası çapraz reaktivite potansiyeli, Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. S^{WT} ve S^{O} yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönlü bir ilişki saptanmıştır (sırasıyla; r=0,5303, p=0,0001 ve r=0,3428, p=0,0183). İlgili p ve r değerleri grafikler üzerinde belirtilmiştir. Wt(+) ve Wt(-) çalışma gruplarında uygulanan aşı dozu sayısı ile varyantlara özgü CD8+ T hücresi yanıtları arasındaki ilişkinin analizi.

Wt(+) grubunda **(C)** S^O ve **(D)** S^{WT} yanıtları; Wt(-) grubunda **(E)** S^O ve **(F)** S^{WT} yanıtları ile aşı dozu arasındaki ilişki Spearman korelasyon testi ile değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda aşı dozu ile T hücresi frekansları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamış ($p>0,05$) olup, p ve r değerleri ilgili panellerde sunulmuştur. Düz çizgiler, doğrusal regresyon eğrilerini temsil etmektedir.

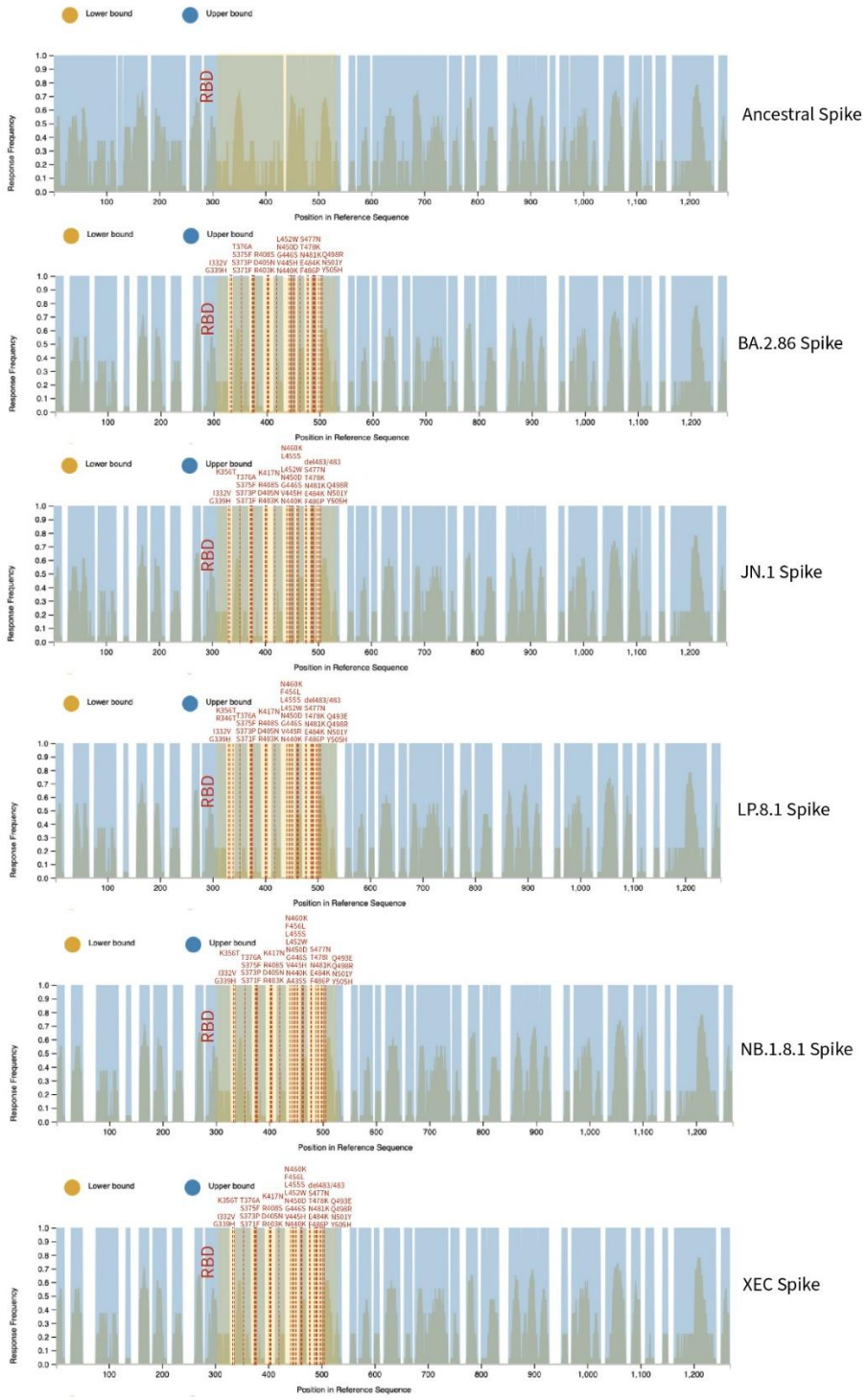
Özellikle Wt(+) grubunda, S^{WT} yanıtı ile S^O yanıtı arasında oldukça güçlü bir korelasyon tespit edilmiştir ($r=0,5303$; $p=0,0001$). Bu durum, wild type antijenine karşı gelişen güçlü T hücresi yanıtının, Omicron varyantını tanıma kapasitesiyle (çapraz reaktivite) paralel ilerlediğini göstermektedir. Wt(-) grubunda da benzer şekilde pozitif bir korelasyon ($r=0,3428$; $p=0,0183$) saptanmış olsa da, ilişkinin gücü Wt(+) grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur.

4.5. VARYANT-SPESİFİK MUTASYONLARIN DENEYSEL CD8+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Spike glikoproteine ait deneysel olarak tanımlanmış 383 adet Sınıf I epitopu elde edildi. Elde edilen epitopların, ImmunomeBrowser aracı ile her bir varyant sekansı boyunca hizalanmasıyla wild type Spike protein dizisiyle %100 örtüşen (tam korunmuş) epitoplar bulundu. Bu analiz sonucunda,NB.1.8.1 varyantı için 262, LP.8.1 için 253, XEC için 258, JN.1 için 270 ve BA.2.86 için 269 adet örtüşen (korunmuş) epitop tespit edildi.

Wild type ve Omicron alt varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) Spike proteinlerine özgü CD8 T hücresi epitop yanıtlarının frekans dağılımı, IEDB ImmunomeBrowser aracı kullanılarak haritalandırılmıştır (Şekil 4.10). Her panelde, spike proteini boyunca CD8 T hücre epitoplarının dağılımı gösterilmektedir. Y-ekseni, belirli bir epitopun tanındığı deneklerin veya testlerin oranını temsil eden yanıt frekansını gösterirken X-ekseni, Spike proteini referans sekansı boyunca amino asit pozisyonu göstermektedir. Mavi gölgeli bölgeler yanıt frekansının %95 güven aralığının üst sınırını, yeşil gölgeli bölgeler alt sınırını göstermektedir. Beyaz boşluklar, CD8 epitopları haritalanmamış veya bağışıklık yanıtı verisi bulunmayan bölgeleri ifade etmektedir. Spike proteininin reseptör bağlama bölgesi (RBD; 319–541. amino asitler), nötralizan antikorlar ve CD8 yanıtları için başlıca hedef olma özelliğinden dolayı sarı renkle vurgulanmıştır. RBD içerisindeki kırmızı çizgiler, Omicron alt varyantlarına özgü amino

asit değişimlerini ve bunların CD8 T hücre epitoplarıyla çakıştığı noktaları göstermektedir.



Şekil 4.10: IEDB ImmunomeBrowser veritabanı kullanılarak, wild type ve seçili Omicron alt varyantlarına (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) ait Spike proteinleri

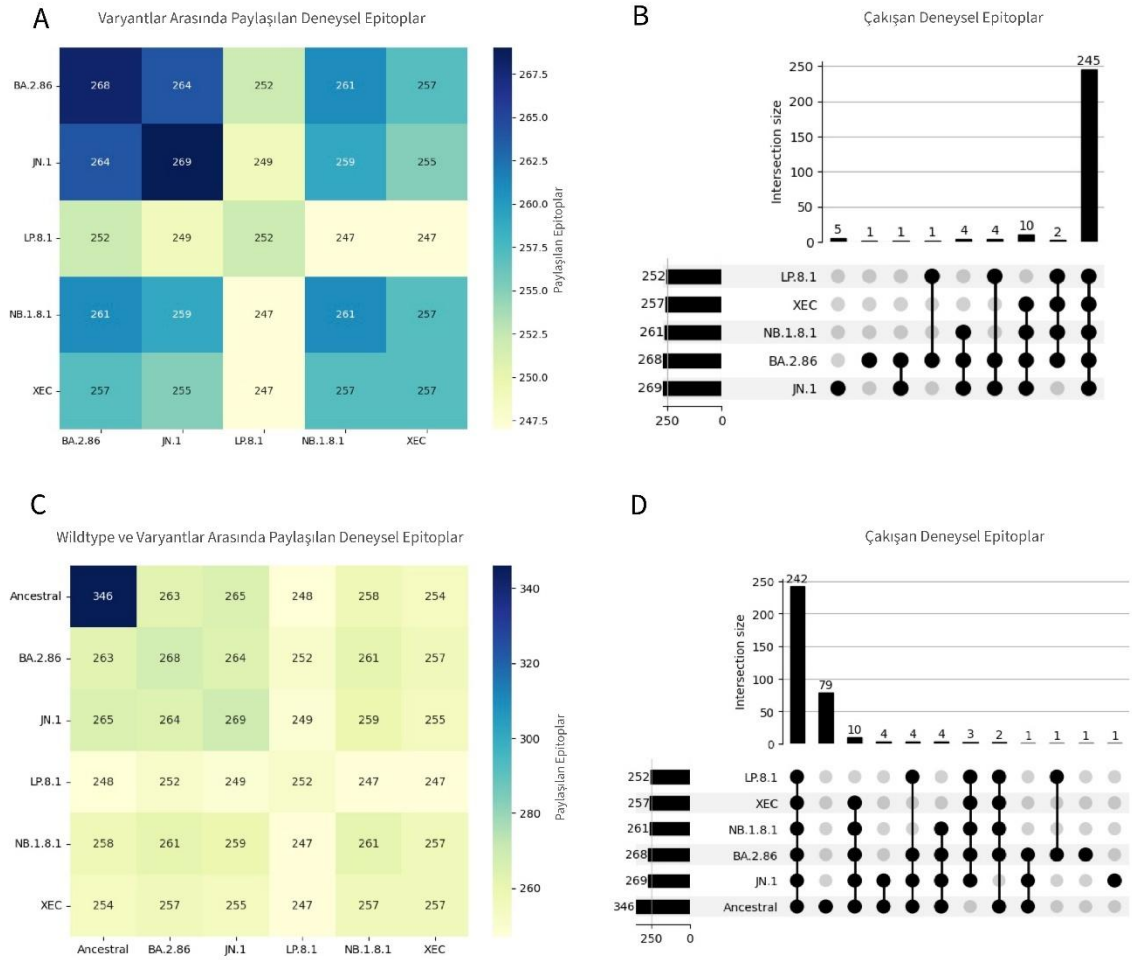
üzerindeki immünojenik bölgeler taranmış ve CD8 T hücresi epitop yanıt sıklıklarının görselleştirilmesi

Wild type spike proteininde CD8 epitopları geniş ölçüde dağılım göstermektedir. Buna karşılık, Omicron alt varyantlarında (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) epitop tanınması daha parçalı bir görünüm sergilemekte, özellikle RBD'de kapsamanın kaybolması sık görülmektedir. RBD bölgesi çok sayıda mutasyon (ör. K356T, N460K, S477N, E484K, F486P, N501Y, Y505H) içermekte olup, bunların pek çoğu doğrudan CD8 epitopları içinde veya yakınında yer almakta ve bu durum epitop tanınmasının değişmesine, bağışıklık kaçışına veya CD8 T hücre bağlanma afinitesinin azalmasına katkıda bulunmaktadır. RBD içerisindeki yüksek değişkenliğe rağmen, RBD dışındaki bazı bölgeler (örneğin 600–900 ve 1100–1200. amino asitler) varyantlar arasında sürekli CD8 epitop tanınması göstermeye devam etmekte, bu da çapraz reaktif epitopların varlığını ve farklı varyantlara karşı hücresel bağışıklığın sürdürülebilirlik durumuna bir kanıt sunmaktadır.

Çalışmada, öncelikle güncel SARS-CoV-2 Omicron alt varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) tarafından tanınan CD8+ T hücresi epitop repertuvarlarının ne ölçüde ortak olduğunu belirlemek amacıyla karşılaştırmalı bir analiz gerçekleştirilmiştir. Varyantlar arası paylaşılan epitop sayıları bir heatmap ile incelendiğinde, tüm varyant çiftleri arasında yüksek düzeyde bir epitop ortaklığı olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11A). Özellikle JN.1 ve BA.2.86 varyantları arasında 269 epitopun paylaşıldığı, diğer varyant çiftlerinde ise bu sayının 247 ile 264 arasında değiştiği saptanmıştır. SARS-CoV-2 varyantları arasındaki ve wild type suşa kıyasla epitop repertuvarlarının kesişim dinamiklerini derinlemesine incelemek amacıyla UpSet grafikleri kullanılmıştır (Şekil 4.11B ve 4.12D). Bu grafikler, çoklu setler arasındaki kesişimleri geleneksel Venn şemalarından daha etkin bir şekilde görselleştirerek, hem paylaşılan hem de sete özgü elemanların kantitatif olarak analiz edilmesini sağlamaktadır. Grafiğin sol panelindeki yatay çubuklar, her bir varyantın sahip olduğu toplam epitop sayısını ("Set Size") göstermektedir. Üst paneldeki dikey çubuklar, belirli bir kesişim grubunda yer alan epitopların sayısını ("Intersection Size") ifade eder. Alt paneldeki matris ise, hangi varyantların ilgili dikey çubuktaki kesişime dahil olduğunu gösterir; matristeki birbirine bağlı siyah noktalar, o kesişim grubunu oluşturan varyantları temsil

eder. Şekil 4.11B'de sunulan ilk UpSet grafiği, yalnızca beş Omicron alt varyantı (JN.1, BA.2.86, NB.1.8.1, XEC, LP.8.1) arasındaki epitop kesişimlerini göstermektedir. Sol paneldeki verilere göre, JN.1 varyantının toplam 269, BA.2.86'nın 268, NB.1.8.1'in 261, XEC'nin 257 ve LP.8.1'in 252 adet CD8+ T hücresi epitopuna sahip olduğu görülmektedir. Grafiğin üst panelindeki en belirgin bulgu, en sağda yer alan ve 245 değerine sahip olan dikey çubuktur. Alttaki matriste bu çubuğa karşılık gelen sütunda beş varyantın da noktasının işaretli olması, 245 adet epitopun bu beş varyantın tamamında ortak olduğunu göstermektedir. Bu, varyantlar arasında oldukça büyük bir çekirdek epitop repertuvarının korunduğuna işaret eder. Diğer çubuklar ise daha küçük alt küme kesişimlerini veya varyanta özgü epitopları temsil etmektedir. Örneğin, matriste yalnızca LP.8.1 noktasının işaretli olduğu sütun, bu varyanta özgü 5 adet epitop olduğunu; yalnızca JN.1, BA.2.86, NB.1.8.1 ve XEC'nin bağlı olduğu sütun ise bu dört varyantta ortak olan ancak LP.8.1'de bulunmayan 10 adet epitop olduğunu göstermektedir.

Analizin ikinci aşamasında, bu varyantların epitop repertuvarlarının evrimsel değişimini anlamak amacıyla wild type suş ile karşılaştırması yapılmıştır. Wild type suşun, 346 adet ile varyantlardan (252-269 aralığında) daha zengin bir epitop havuzuna sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.11C). Buna rağmen, wild type suş ile varyantlar arasındaki epitop paylaşımının yüksek olduğu görülmüştür; örneğin, wild type suş ile JN.1 varyantı 265 ortak epitop paylaşmaktadır. Şekil 4.11D'deki ikinci UpSet grafiği, analize wild type suşun da dahil edilmesiyle epitopların evrimsel değişimine dair daha derin bir bakış açısı sunmaktadır. Bu analizdeki en önemli iki bulgu, grafiğin sol tarafında yer alan en yüksek iki çubuk ile temsil edilmektedir. Bu çubuklardan ilki, değeri 70 olan ve alt matriste yalnızca "Ancestral" setinin işaretli olduğu kesişim grubudur. Bu, wild type suşta var olan 70 adet epitopun, incelenen beş Omicron alt varyantının hiçbirinde bulunmadığını ortaya koymaktadır. Bu durum, virüsün evrimi sırasında T hücresi tanıma bölgelerinde bir epitop kaybı yaşandığının kanıtıdır. İkinci en yüksek çubuk ise 242 değerine sahiptir ve matriste wild type suş dahil olmak üzere altı setin tamamının birbirine bağlı olduğu kesişimi göstermektedir. Bu bulgu, 242 adet epitopun wild type suştan itibaren tüm alt varyantlar boyunca kararlı bir şekilde korunduğunu ifade eder. Bu iki temel bulgu, SARS-CoV-2'nin CD8+ T hücresi yanıtından kaçış mekanizmalarının hem belirli epitopların kaybı hem de büyük bir çekirdek epitop setinin korunumu üzerinden ikili bir dinamik sergilediğini göstermektedir.



Şekil 4.11: SARS-CoV-2 varyantları ve wild type suş arasındaki CD8+ T hücresi epitop repertuvarlarının karşılaştırmalı analizi. Bu şekil, farklı SARS-CoV-2 varyantları tarafından tanınan deneysel CD8+ T hücresi epitoplarının paylaşım ve korunma düzeylerini göstermektedir. **(A)** Varyantlar arası paylaşılan epitop sayısını gösteren heatmap. **(B)** Yalnızca varyantlar arasındaki epitop kesişimlerini gösteren UpSet grafiği. Grafiğin solundaki yatay çubuklar her varyantın toplam epitop sayısını, üstteki dikey çubuklar ise kesişim kümelerindeki epitop sayısını gösterir. Alttaki matris, hangi varyantların kesişime dahil olduğunu belirtir (siyah noktalar). En sağdaki çubuk, beş varyantın tamamında ortak olan 245 çekirdek epitopu göstermektedir. **(C)** Wild type suş ve varyantlar arasındaki paylaşılan epitop sayılarını karşılaştıran heatmap. **(D)** Wild type suşun dahil edildiği UpSet analizi. Grafikteki en soldaki çubuk, wild type suşa özgü olan ancak incelenen beş varyantta da kaybolmuş 70 epitopu temsil ederken, ikinci çubuk wild type suştan itibaren tüm varyantlar boyunca korunan 242 epitopluk çekirdek seti göstermektedir.

SARS-CoV-2 varyantlarının CD8+ T hücresi epitop repertuvarlarının wild type suşa kıyasla ne ölçüde korunduğunu belirlemek amacıyla kantitatif bir karşılaştırma yapılmıştır (Tablo X). Analiz sonuçları, incelenen beş Omicron alt varyantında (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) saptanan epitopların çok büyük bir çoğunluğunun, wild type suşta da mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Epitop korunum oranlarının tüm varyantlarda %98'in üzerinde olduğu saptanmıştır. En yüksek korunum oranı %98.85 ile NB.1.8.1 varyantında gözlemlenirken (261 epitoptan 258'i wild type suşta mevcut), en düşük korunum oranı %98.13 ile BA.2.86 varyantında (268 epitoptan 263'ü wild type suşta mevcut) tespit edilmiştir. Benzer şekilde, JN.1 varyantı %98.51, LP.8.1 varyantı %98.41 ve XEC varyantı %98.83 oranında wild type epitoplarla örtüşen bir repertuvara sahiptir. Bu bulgular, varyantlarda T hücresi tarafından tanınan epitopların büyük çoğunluğunun yeni (*de novo*) oluşmadığını, aksine wild type suştan itibaren güçlü bir şekilde korunduğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, analiz her varyantta az sayıda "atayla eşleşmeyen" (unmatched) epitopun varlığını da ortaya koymuştur. Bu epitoplar, wild type suşta bulunmayan, ancak bu varyantlarda saptanan ve potansiyel "neo-epitop" olarak değerlendirilebilecek dizilerdir. Bu eşleşmeyen epitopların sayısı oldukça düşük olup, varyant başına 3 (NB.1.8.1 ve XEC) ila 5 (BA.2.86) arasında değişmektedir. Eşleşmeyen epitop listeleri incelendiğinde; NIADYNYKL, IYKTPPIKYF ve SRRRARSVA dizilerinin incelenen beş varyantın tamamında ortak olduğu görülmüştür. Bu durum, bu spesifik epitopların Omicron soyunda ortaya çıktığını ve bu soyun devamında da korunduğunun bir göstergesi olabilir.

Tablo 4.4’de, beş Omicron alt varyantının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) her biri için saptanan toplam CD8+ T hücresi epitop sayısı, bu epitoplardan kaçının ve yüzde kaçının wild type suşta da bulunduğunu gösteren korunum analizi sonuçları özetlenmiştir. "Unmatched epitopes" (Wild type ile Eşleşmeyen Epitoplar) başlığı altında listelenen diziler, ilgili varyantta tespit edilen ancak wild type suşun epitop repertuvarında bulunmayan potansiyel neo-epitopları ifade etmektedir.

Tablo 4.4: SARS-CoV-2 varyantlarında saptanan CD8+ T hücresi epitoplarının wild type suş ile korunum düzeyleri ve eşleşmeyen epitoplar

Varyant	Toplam Epitop Sayısı	Wild type suş ile Ortak Epitop Sayısı	Korunma Oranı (%)	Wild type Suşta Bulunmayan Epitoplar
BA.2.86	268	263	98.13	NIADYNYKL; NYDYWYRLF; SRRRARSVA; IYKTPPIKYF; LTQDLFLPFF
JN.1	269	265	98.51	IYKTPPIKYF; NIADYNYKL; SRRRARSVA; NYDYWYRSF
LP.8.1	252	248	98.41	IYKTPPIKYF; NIADYNYKL; LTQDLFLPFF; SRRRARSVA
NB.1.8.1	261	258	98.85	IYKTPPIKYF; NIADYNYKL; SRRRARSVA
XEC	257	254	98.83	IYKTPPIKYF; NIADYNYKL; SRRRARSVA

Omicron alt varyantlarında tanımlanan spike proteini mutasyonları. BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının her birinde tespit edilmiş aminoasit değişiklikleri Tablo 4.5'te göstermektedir.

Tablo 4.5: Omicron alt varyantlarının varyant belirleyici spike proteini mutasyonları

BA.2.86	**JN.1**	**LP.8.1**	**NB.1.8.1**	**XEC**
T19I	T19I	T19I	T19I	T19I
R21T	R21T	R21T	R21T	R21T
L24S	L24S	L24S	T22N	T22N
del25/27	del25/27	del25/27	L24S	L24S
S50L	S50L	del31/31	del25/27	del25/27
del69/70	del69/70	S50L	S50L	S50L
V127F	V127F	del69/70	F59S	F59S
G142D	G142D	V127F	del69/70	del69/70
del144/144	del144/144	G142D	V127F	V127F
F157S	F157S	del144/144	G142D	G142D
R158G	R158G	F157S	del144/144	del144/144
N211I	N211I	R158G	F157S	F157S
del212/212	del212/212	F186L	R158G	R158G
V213G	V213G	R190S	G184S	N211I
L216F	L216F	N211I	N211I	del212/212
H245N	H245N	del212/212	del212/212	V213G
A264D	A264D	V213G	V213G	L216F
I332V	I332V	L216F	L216F	H245N
G339H	G339H	H245N	H245N	A264D
K356T	K356T	A264D	A264D	I332V
S371F	S371F	I332V	I332V	G339H
S373P	S373P	G339H	G339H	K356T
S375F	S375F	R346T	K356T	S371F
T376A	T376A	K356T	S371F	S373P
R403K	R403K	S371F	S373P	S375F
D405N	D405N	S373P	S375F	T376A
R408S	R408S	S375F	T376A	R403K
K417N	K417N	T376A	R403K	D405N
N440K	N440K	R403K	D405N	R408S
V445H	V445H	D405N	R408S	K417N
G446S	G446S	R408S	K417N	N440K
N450D	N450D	K417N	A435S	V445H
L452W	L452W	N440K	N440K	G446S
N460K	L455S	V445R	V445H	N450D
S477N	N460K	G446S	G446S	L452W
T478K	S477N	N450D	N450D	L455S

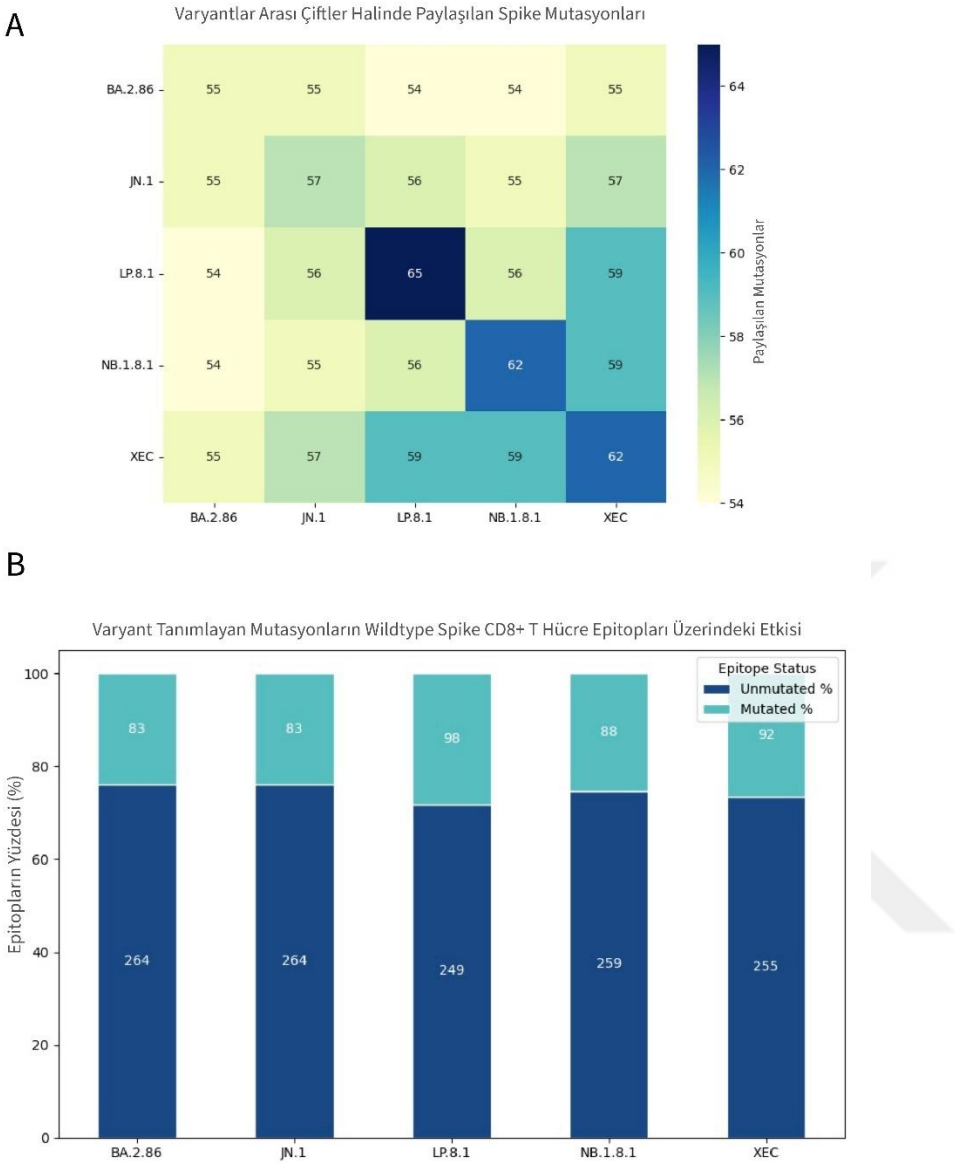
Tablo 4.5 (devam)

N481K	T478K	L452W	L452W	F456L
E484K	N481K	L455S	L455S	N460K
F486P	del483/483	F456L	F456L	S477N
Q498R	E484K	N460K	N460K	T478K
N501Y	F486P	S477N	S477N	N481K
Y505H	Q498R	T478K	T478I	del483/483
E554K	N501Y	N481K	N481K	E484K
A570V	Y505H	del483/483	E484K	F486P
D614G	E554K	E484K	F486P	Q493E
P621S	A570V	F486P	Q493E	Q498R
H655Y	D614G	Q493E	Q498R	N501Y
N679K	P621S	Q498R	N501Y	Y505H
P681R	H655Y	N501Y	Y505H	E554K
N764K	N679K	Y505H	E554K	A570V
D796Y	P681R	E554K	A570V	D614G
S939F	N764K	A570V	D614G	P621S
Q954H	D796Y	D614G	P621S	H655Y
N969K	S939F	P621S	H655Y	N679K
P1143L	Q954H	H655Y	N679K	P681R
	N969K	N679K	P681R	N764K
	P1143L	P681R	N764K	D796Y
		N764K	D796Y	S939F
		D796Y	S939F	Q954H
		S939F	Q954H	N969K
		Q954H	N969K	V1104L
		N969K	P1143L	P1143L
		K1086R		
		V1104L		
		P1143L		

Çalışmanın bu aşamasında, incelenen beş Omicron alt varyantının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) Spike (S) proteini üzerindeki mutasyon profilleri ve bu mutasyonların wild type CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki potansiyel etkileri araştırılmıştır. Her bir varyantın varyant belirleyici mutasyonları paylaşılmıştır. İlk olarak, varyantlar arasındaki evrimsel yakınlığı değerlendirmek amacıyla, her bir varyant çifti arasında paylaşılan S proteini mutasyonlarının sayısı bir heatmap ile

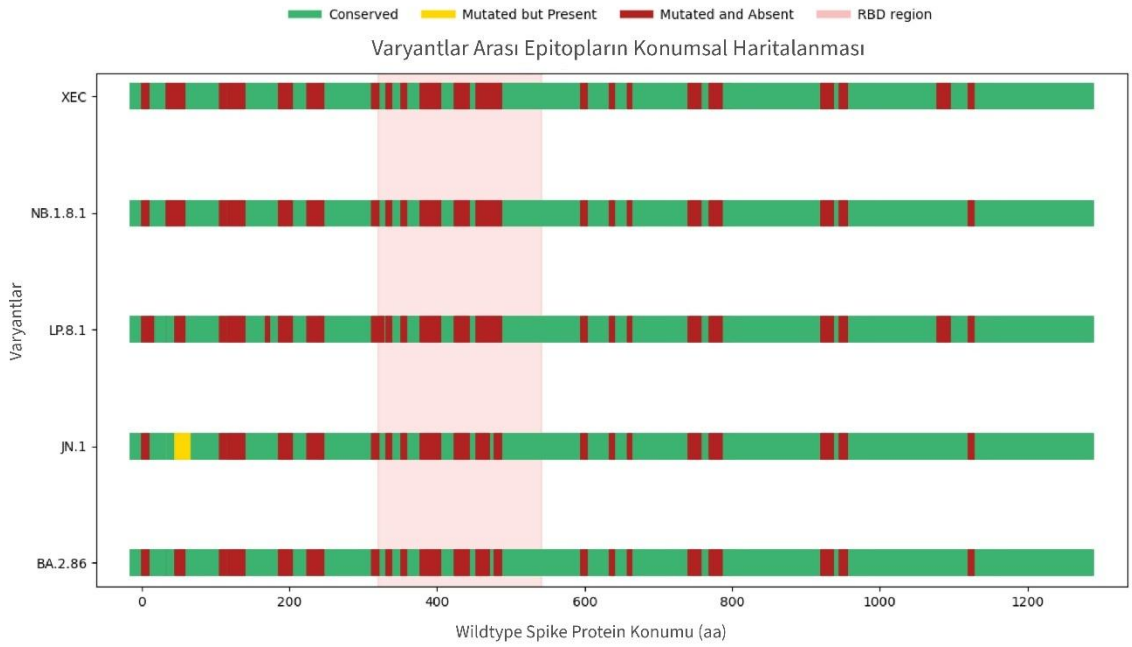
karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12A). Analiz sonucunda, varyantların yüksek oranda ortak mutasyona sahip olduğu görülmüştür. Örneğin, JN.1 ve XEC varyantları 57 ortak mutasyon paylaşırken, LP.8.1 varyantı 65 mutasyon ile en fazla mutasyona sahip varyant olduğu görülmüştür.

Bu varyant tanımlayıcı mutasyonların, wild type S proteinine özgü CD8+ T hücresi epitop repertuvarı üzerindeki fonksiyonel etkisi kantitatif olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.12). Toplam 347 wild type CD8+ T hücresi epitopunun, her bir varyantın mutasyon setinden ne ölçüde etkilendiği hesaplanmıştır. Şekil 4.12B'de sunulan yığılmış çubuk grafik, bu analizin sonuçlarını göstermektedir. Bulgular, incelenen tüm varyantlarda wild type CD8+ T hücresi epitoplarının çok büyük bir kısmının mutasyonlardan etkilenmediğini ve korunduğunu ortaya koymuştur. BA.2.86 ve JN.1 varyantlarında, wild type epitopların 264'ünün (%76.1) korunduğu (unmutated), yalnızca 83'ünün (%23.9) ise mutasyona uğradığı saptanmıştır. Benzer şekilde, diğer varyantlarda da korunan epitop oranı %71.8 (LP.8.1) ile %76.1 (BA.2.86 ve JN.1) arasında değişmektedir. Toplamda en çok mutasyona sahip olan LP.8.1 varyantının, 98 epitopu etkileyerek CD8+ T hücresi epitoplarını en çok değiştiren varyant olduğu görülmüştür. Sonuçlar, Omicron alt varyantlarının S proteininde meydana gelen mutasyonların, wild type suşa karşı oluşmuş CD8+ T hücresi epitop repertuvarının büyük bir çoğunluğunu etkilemediğini göstermektedir. Bu durum, CD8+ T hücresi bağışıklık yanıtının önemli bir bölümünün bu varyantlara karşı da tanıma potansiyelini sürdürebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.12: Varyantlar arası spike mutasyon profillerinin karşılaştırılması ve mutasyonların wild type CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki etkisi. Beş Omicron alt varyantının mutasyonel özelliklerini ve bu mutasyonların CD8+ T hücresi epitopları üzerindeki etkisini özetlemektedir. **(A)** İncelenen beş varyant arasındaki ortak Spike proteini mutasyonlarının sayısını gösteren heatmap. Köşegen üzerindeki değerler her varyantın kendi toplam mutasyon sayısını, diğer hücreler ise ilgili varyant çiftinin paylaştığı ortak mutasyon sayısını göstermektedir. **(B)** Varyant tanımlayıcı mutasyonların, 347 adet wild type CD8+ T hücresi epitopu üzerindeki etkisini gösteren yığılmış çubuk grafik. Açık mavi (turkuaz) alanlar mutasyondan etkilenen (Mutated), koyu mavi alanlar ise etkilenmeyen (Unmutated) epitopların yüzdesini ve mutlak sayısını ifade etmektedir.

Varyantların S proteinindeki mutasyonların T hücresi epitopları üzerindeki etkisini daha derinlemesine anlamak amacıyla, her bir epitopun S proteini üzerindeki konumu ve durumu (korunmuş, mutasyona uğramış ancak mevcut, mutasyona uğramış ve kayıp) haritalanmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Varyantlar arası CD8+ T hücresi epitoplarının konumsal haritalanması ve durum analizi

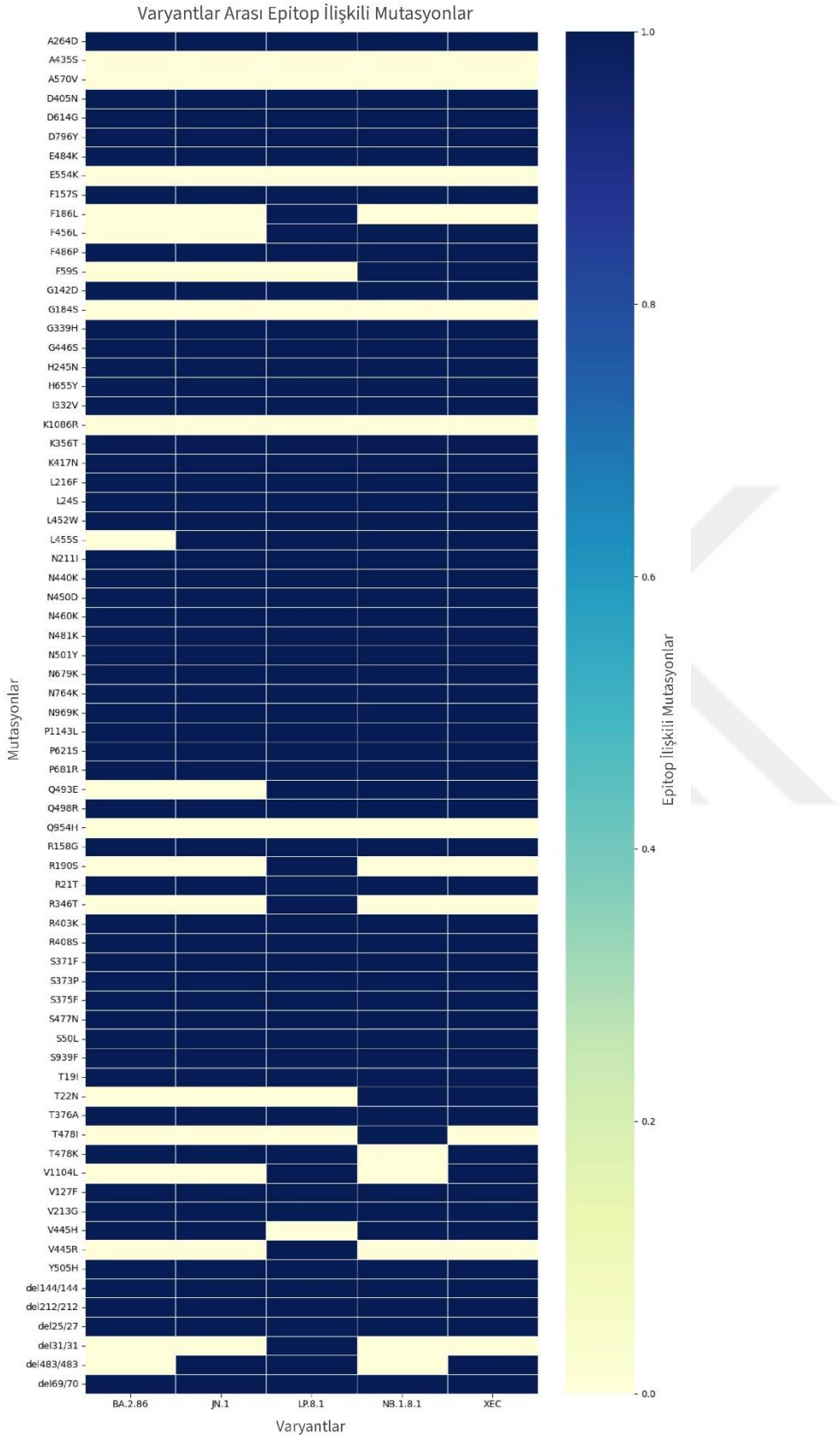
Grafik, beş farklı SARS-CoV-2 varyantı için wild type Spike proteini dizisi (X ekseni, amino asit konumu) üzerindeki CD8+ T hücresi epitoplarının konumunu ve durumunu göstermektedir. Her bir yatay çubuk bir varyantı temsil eder. Yeşil renkli bölgelerkorunmuş (Conserved), sarı renkli bölgeler mutasyona uğramış ancak varlığını sürdüren (Mutated but Present) ve kırmızı renkli bölgeler ise mutasyona uğramış ve kaybolmuş (Mutated and Absent) epitopları belirtir. Arka plandaki açık pembe gölgeli alan, immünolojik açıdan önemli olan RBD bölgesini vurgulamaktadır. Grafikte, epitop kayıplarının (kırmızı) özellikle RBD içinde yoğunlaştığı görülmektedir.

Bu analiz, immün kaçışın proteinin hangi bölgelerinde yoğunlaştığını ve varyantlar arasında ortak bir kaçış paterni olup olmadığını ortaya koymaktadır. Genel olarak, incelenen beş varyantın tamamında epitop profilinin büyük bir kısmının korunmuş

(Conserved, yeşil renk) olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, S proteininin geniş bir bölümünde T hücresi tanıma potansiyelinin devam ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, mutasyona uğramış ve T hücresi tarafından tanınması beklenen epitopların kaybolduğu (Mutated and Absent, kırmızı renk) bölgelerin S proteini boyunca rastgele dağılmayıp belirli "sıcak noktalarda" (hotspots) kümelendiği görülmüştür. Özellikle, immünolojik tanıma açısından kritik bir bölge olan RBD (kırmızı ile gölgelenmiş alan) incelenen beş varyantın tamamında yoğun bir şekilde epitop kaybına uğradığı görülmektedir. Bu bölgedeki tutarlı epitop kaybı paterni, virüsün hem antikor hem de T hücresi yanıtından kaçmak için bu fonksiyonel bölge üzerinde güçlü bir evrimsel baskı altında olduğunu düşündürmektedir. RBD dışındaki bölgelerde de (örneğin, N-terminal domain ve S2 alt birimi) varyantlar arasında benzer konumlarda epitop kayıplarının yaşanması, ortak immün kaçış stratejilerine işaret etmektedir. Analizde ayrıca, mutasyona uğramasına rağmen T hücresi tarafından tanınmaya devam eden (Mutated but Present, sarı renk) bir epitopun varlığı da incelenmiştir. Bu duruma, özellikle JN.1 varyantının N-terminal bölgesinde (yaklaşık 50. amino asit pozisyonunda) rastlanmıştır. Bu bulgu, her mutasyonun T hücresi tanınırlığını tamamen ortadan kaldırmadığını, bazı amino asit değişikliklerinin epitopun bağlanma ve sunulma yeteneğini koruyabildiğini göstermesi açısından önemlidir. Sonuç olarak, konumsal haritalama analizi, Omicron alt varyantlarının hem T hücresi yanıtının büyük bir kısmını koruduğunu hem de özellikle RBD gibi kritik bölgelerde odaklanmış bir immün kaçış profili sergilediğini ortaya koymuştur.

Önceki analizlerde gözlemlenen T hücresi epitop profillerindeki değişimlerin altında yatan spesifik genetik mekanizmaları aydınlatmak amacıyla, her bir varyantta epitop bölgelerine isabet eden S proteini mutasyonları belirlenmiş ve bir varlık-yokluk heatmap üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.14). Bu analiz, hangi spesifik mutasyonların epitop kaybından veya değişiminden sorumlu olduğunu ve bu mutasyonların varyantlar arasındaki dağılımını yüksek çözünürlükte ortaya koymaktadır. Analizin en belirgin bulgusu, incelenen beş Omicron alt varyantının tamamında ortak olarak bulunan ve T hücresi epitoplarını etkileyen büyük bir çekirdek mutasyon setinin varlığıdır. Heatmap tüm varyantlar için koyu mavi ile işaretlenmiş olan bu mutasyonlar arasında D405N, E484K, N440K, Q493R, N501Y ve Y505H gibi özellikle RBD yer alan kilit mutasyonlar bulunmaktadır. Bu ortak mutasyonel imza, önceki şekillerde gözlemlenen varyantlar arası benzer epitop kaybı ve korunma paternlerinin temel genetik nedenini oluşturmaktadır.

Heatmap aynı zamanda, varyantları birbirinden veya belirli alt gruplardan ayıran kritik mutasyonları da net bir şekilde ortaya koymaktadır. Örneğin, F456L mutasyonu BA.2.86 ve JN.1 varyantlarında bulunmazken (açık sarı), bu mutasyonun LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarında ortak olarak bulunduğu görülmektedir (koyu mavi). Analiz, ayrıca varyanta özgü (private) mutasyonları da başarılı bir şekilde tespit etmiştir; örneğin, V445H mutasyonu yalnızca LP.8.1'ye özgüyken, L455S mutasyonu ise sadece BA.2.86 varyantında bulunmaktadır. Sonuç olarak, bu detaylı haritalama, her bir varyantın T hücresi epitop profilini şekillendiren hem ortak hem de kendine özgü mutasyonel olayları tanımlayarak, varyantların immünolojik karakterizasyonu için temel bir genetik profil sunmaktadır.



Şekil 4.14: İncelenen SARS-CoV-2 varyantlarında T hücresi epitopları ile ilişkili mutasyonların varlık-yokluk haritası

Heatmap, beş Omicron alt varyantında (X ekseni) T hücresi epitoplarının dizileriyle kesişen S proteini mutasyonlarının (Y ekseni) varlığını veya yokluğunu göstermektedir. Koyu mavi renk, ilgili mutasyonun o varyantta bulunduğunu ve bir epitop bölgesini etkilediğini gösterir. Açık sarı renk ise mutasyonun o varyantta bulunmadığını belirtir. Grafik, varyantlar arasında ortak olan ve epitopları etkileyen çekirdek mutasyon setini (tüm sütunlarda koyu mavi olan sıralar) ve her bir varyantı veya varyant alt grubunu ayıran spesifik mutasyonları (farklılaşan renk paternleri) net bir şekilde görselleştirmektedir.

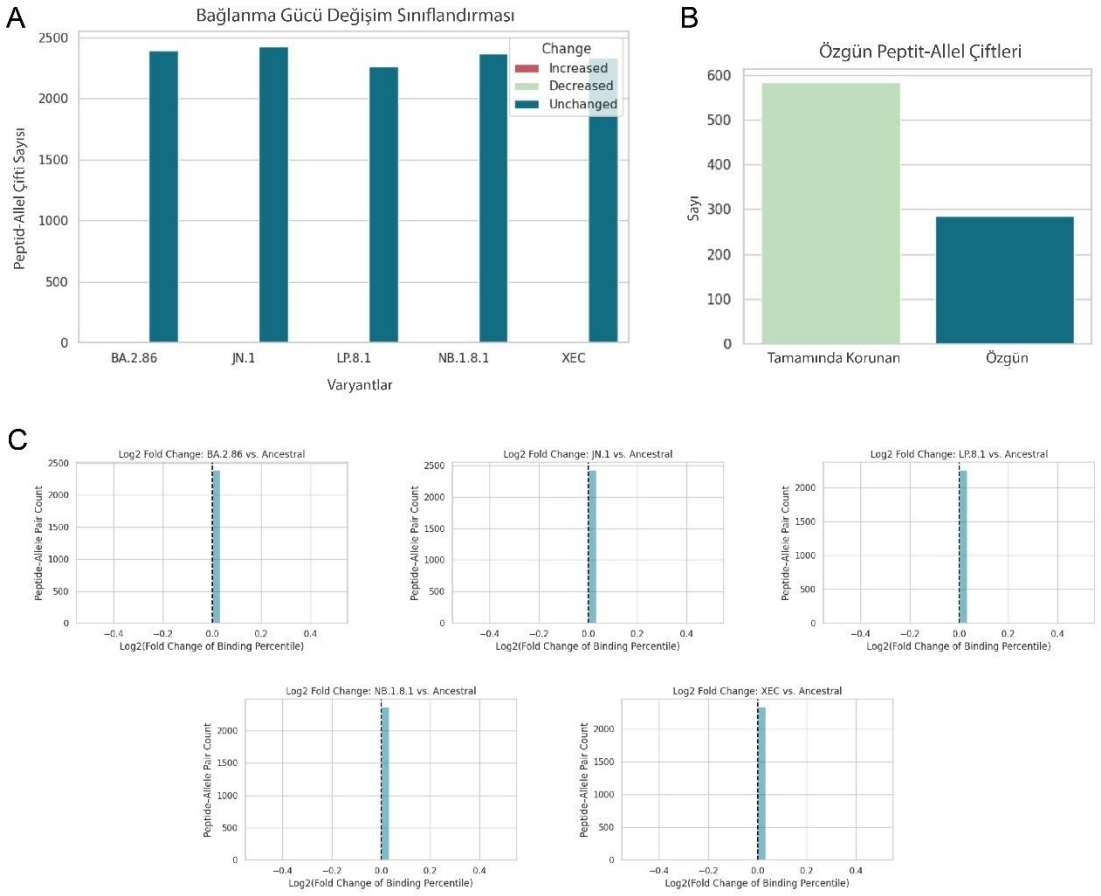
4.6. OMİCRON ALT VARYANTLARINA AİT İMMÜNOJENİK VE İMMÜNODOMİNANT EPİTOPLARIN HLA SINIF I BAĞLANMA ANALİZİ

Wild type SARS-CoV-2 suşu ile BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantları arasında, NetMHCpan EL persentil sıralaması ≤1 olan güçlü bağlayıcı peptit-MHC sınıf I alel çiftlerinin karşılaştırmalı analizi, epitop karşılaştırmasında dikkate değer bir stabilite olduğunu ortaya koymuştur. İlk olarak, atalık suş ile her bir varyant arasında ortak olarak bulunan güçlü bağlayıcı çiftlerin bağlanma afinitelerindeki değişimler incelenmiştir (Şekil 4.15). Analiz sonuçları, bu ortak peptit-alel havuzunda bağlanma gücü afinitesinde neredeyse hiçbir değişiklik olmadığını kantitatif olarak göstermektedir (Şekil 4.15A). İncelenen beş varyantın tamamı için, ortak çiftlerin %100'e yakınının "Değişmemiş" (Unchanged) kategorisinde sınıflandırıldığı, "Artmış" (Increased) veya "Azalmış" (Decreased) afiniteye sahip çiftlerin sayısının ise ihmal edilebilir düzeyde olduğu tespit edilmiştir.

Bağlanma gücündeki bu çarpıcı korunum, her bir varyant için hesaplanan Log2-kat değişimi (Log2 Fold Change) histogramları ile de teyit edilmiştir (Şekil 4.15C). Beş varyantın tümü için elde edilen dağılım grafikleri, peptit-alel çifti sayısının neredeyse tamamen '0' (sıfır) değeri üzerinde yoğunlaştığını göstermektedir. Bu bulgu, varyant ve wild type persentil değerleri arasındaki oranın 1 olduğunu, yani ortak epitopların bağlanma afinitelerini varyantlardaki mutasyonlara rağmen koruduğunu açıkça göstermektedir.

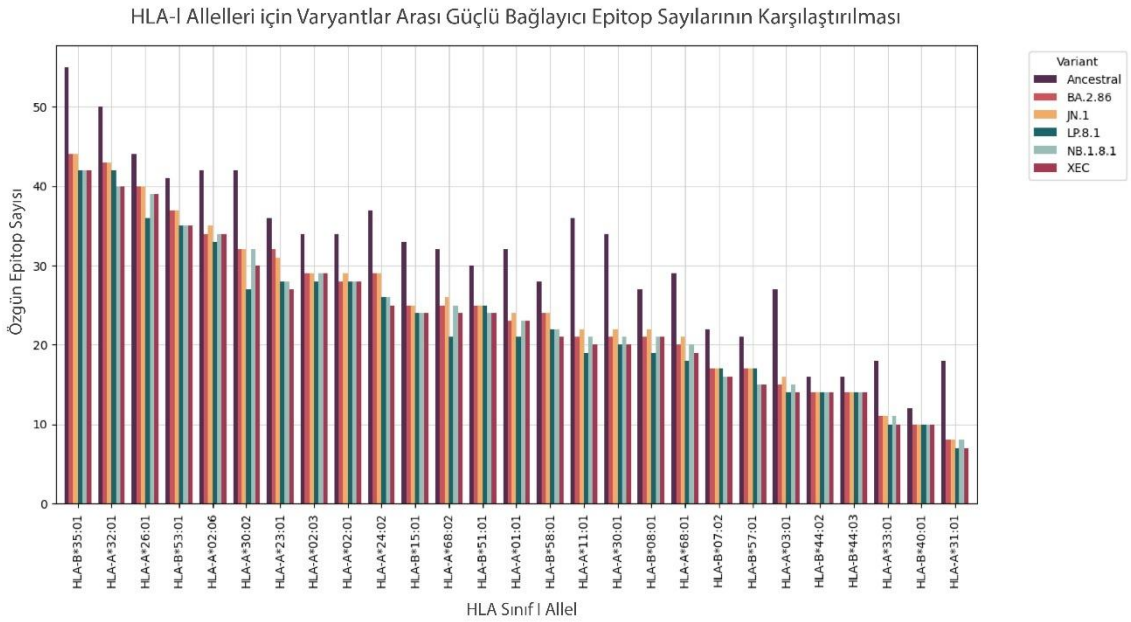
Epitopların genel korunma düzeyini belirlemek amacıyla, hem wild type hem de incelenen tüm varyantlarda ortak olarak güçlü bağlayıcı özelliğini sürdüren "korunmuş" çiftlerin sayısı da analiz edilmiştir. Bu analiz, tüm suşlarda ortak olan 580 civarında bir çekirdek peptit-alel çifti seti olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.15B, "Tamamında

Korunan"). Bu çekirdek setin dışında kalan, yani en az bir suşta bulunmayan veya güçlü bağlayıcı özelliğini yitiren tüm diğer çiftlerin toplam sayısı ("Özgün" olarak etiketlenen) ise yaklaşık 280 olarak hesaplanmıştır. Korunmuş çiftlerin sayısının, korunmamış olanların toplamından daha fazla olması, çalışılan varyantlar genelinde T-hücresi epitoplarının önemli bir kısmının stabil kaldığı bulgusunu güçlendirmektedir.



Şekil 4.15: Wild type SARS-CoV-2 ve seçili varyantlar arasındaki güçlü bağlayıcı CD8+ T hücresi peptit-allel çiftlerinin karşılaştırmalı analizi. **(A)** Wild type ile BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantları arasında paylaşılan güçlü bağlayıcı (persentil ≤1) çiftlerin bağlanma gücü değişim sınıflandırması. Sütunlar, atalık suşa kıyasla bağlanma afinitesi "Artmış" (Increased), "Azalmış" (Decreased) veya "Değişmemiş" (Unchanged) olarak sınıflandırılan peptit-allel çiftlerinin sayısını göstermektedir. **(B)** İncelenen tüm suşlarda (Wild type ve beş varyantın tümü) ortak olarak korunan peptit-alel çiftlerinin ("Tamamında Korunan") ve bu ortak setin dışında kalan tüm diğer benzersiz çiftlerin ("Özgün") toplam sayılarının karşılaştırılması. **(C)** Her bir varyantın atalık suşa kıyasla

paylaşılan çiftler için bağlanma persentil değerlerindeki Log2-kat değişimini (Log2 Fold Change) gösteren histogramlar. Dikey kesikli çizgi, afinite değişiminin olmadığı (Log2-kat değişimi = 0) noktayı referans olarak göstermektedir.



Şekil 4.16: HLA Sınıf I allelleri için SARS-CoV-2 varyantları arasında güçlü bağlayıcı epitop sayılarının karşılaştırılması. Gruplandırılmış çubuk grafik, çalışılan altı SARS-CoV-2 varyantı (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) için her bir HLA Sınıf I alleli (X ekseni) tarafından bağlanan özgün güçlü bağlayıcı epitop sayısını (Y ekseni) göstermektedir. Güçlü bağlayıcı epitoplar, NetMHCpan EL %1 yüzdelik dilimi (percentile rank ≤1) kriterine göre tanımlanmıştır. Alleller, tüm varyantlardaki toplam epitop yüküne (toplam özgün epitop sayısı) göre azalan düzende sıralanmıştır. Her bir renk, grafiğin sağ üst köşesindeki lejantta belirtildiği gibi farklı bir virüs varyantını temsil etmektedir.

SARS-CoV-2 wild type suşu ve seçilen beş varyant (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) için öngörülen güçlü bağlayıcı (NetMHCpan EL yüzdelik dilimi ≤1) T-hücresi epitoplarının HLA Sınıf I allelleri bazında dağılımı Şekil 4.16'da karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Bu analiz, varyantlar arasında hem epitop sunum kapasitesi hem de potansiyel epitop kaybı açısından önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Şekil 4.16'da görüldüğü üzere, incelenen HLA allellerinin büyük çoğunluğunda, Wild type

(Ancestral) varyant (koyu mor çubuklar) diğer varyantlara kıyasla daha fazla veya eşit sayıda özgün epitop sunmaktadır. Bu durum, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarında, Wild type varyanta kıyasla belirgin bir epitop kaybı yaşandığını göstermektedir. Örneğin, HLA-A*31:01, HLA-A*03:01, HLA-A*11:01 ve HLA-A*30:01 gibi allellerde, wild type varyant ile diğer varyantlar arasındaki epitop sayısı farkı net bir şekilde gözlemlenmektedir. Analiz sonucunda, bazı HLA allellerinin varyantlardan bağımsız olarak yüksek sayıda epitop sunduğu ("promiscuous" bağlanma profili) tespit edilmiştir. HLA-B*35:01, HLA-A*32:01 ve HLA-A*26:01 allelleri, tüm varyantlar genelinde en yüksek sayıda özgün güçlü bağlayıcı epitopu sunan alleller olarak öne çıkmıştır. Buna karşın, grafiğin sağ tarafında yer alan HLA-A*33:01, HLA-B*40:01 ve HLA-A*31:01 gibi allellerin, tüm varyantlar genelinde görece daha düşük sayıda epitop sunduğu belirlenmiştir. Wild type varyant dışındaki diğer beş varyantın (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) epitop profilleri incelendiğinde, bu varyantların sunduğu epitop sayılarının çoğu allel için birbirine oldukça yakın olduğu ve benzer bir epitop sunum paterni sergilediği görülmüştür. Bu bulgu, bu varyantların Wild type suşundan farklılaşmakla birlikte, T-hücresi epitop profili açısından kendi aralarında büyük ölçüde benzer bir evrimsel yol izlediğini düşündürmektedir.

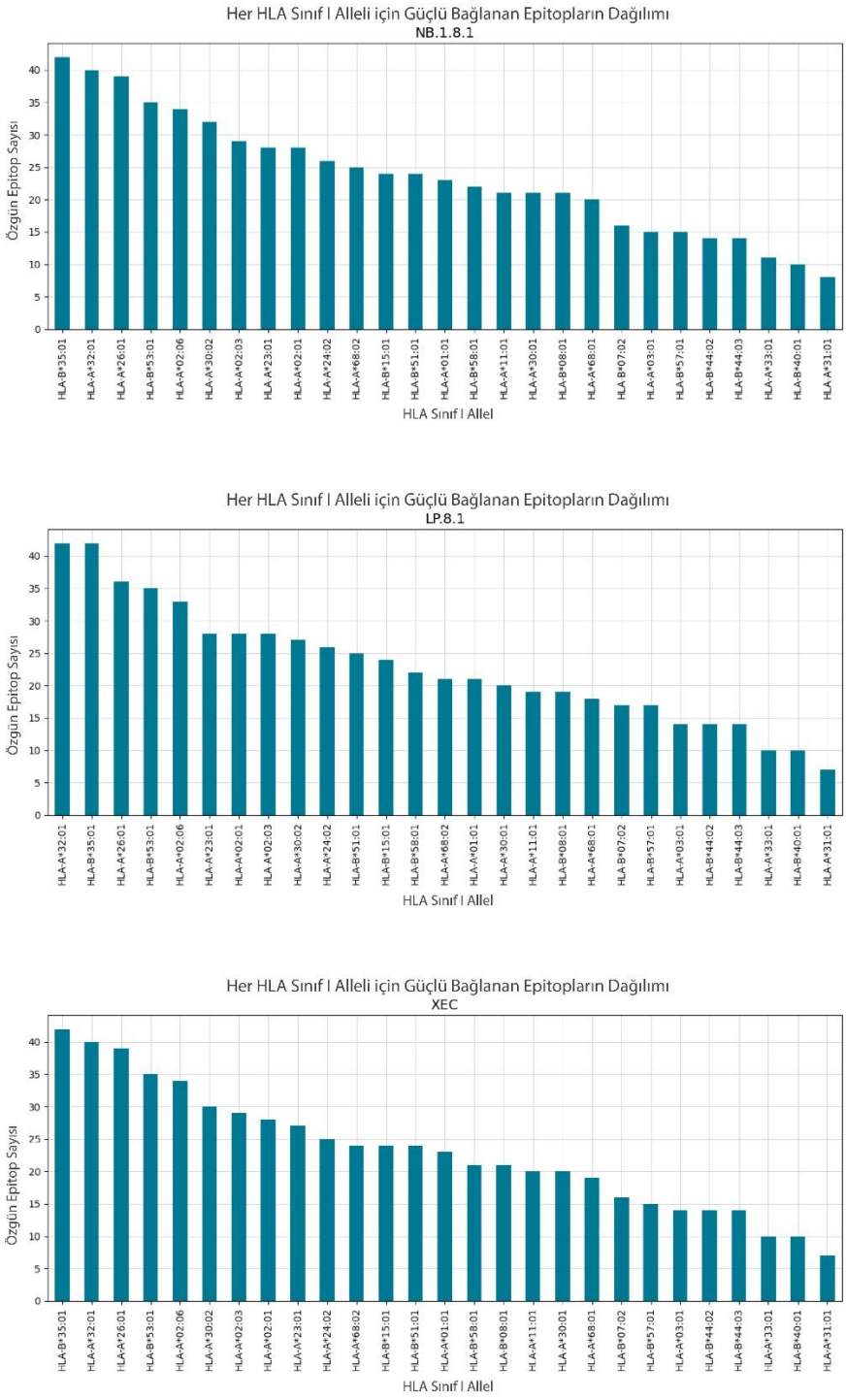
Analiz edilen altı SARS-CoV-2 varyantının (Wild type, BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) her biri için HLA Sınıf I aleli başına düşen özgün güçlü bağlayıcı epitop sayısının (epitop yükü) dağılımı Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Her bir varyant için oluşturulan bu bireysel histogramlar, alellerin epitop sunum kapasitelerindeki farklılıkları ve varyantlar arası değişimi ortaya koymaktadır. Gözlemlenen ilk ve en belirgin bulgu, Wild type (Ancestral) suşunun (Şekil 4.17, üst panel) epitop profili ile diğer beş varyantın profilleri arasındaki kantitatif farktır. Wild type varyantta, HLA-B*35:01 ve HLA-A*32:01 gibi baskın alleller 50'nin üzerinde özgün epitop sunma kapasitesine sahipken, diğer tüm varyantlarda (BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) bu allellerin sunduğu maksimum epitop sayısı yaklaşık 40-42 bandında kalmaktadır. Bu durum, Şekil 4.16'daki toplu karşılaştırmada da saptanan, yeni varyantlarda Wild type suşuna kıyasla belirgin bir epitop kaybı yaşandığı bulgusunu bireysel varyant bazında teyit etmektedir. İkinci olarak, tüm varyantlar genelinde belirli HLA allellerinin "immünodominant" veya "çoklu bağlayıcı" (promiscuous) bir profil sergilediği görülmüştür. Özellikle HLA-B*35:01, HLA-A*32:01, HLA-B*53:01 ve HLA-A*26:01 allelleri, incelenen tüm varyantlarda (hem Wild type hem de diğerleri) en

yüksek epitop sunum kapasitesine sahip alleller olarak öne çıkmıştır. Buna karşın, HLA-A*33:01, HLA-B*40:01 ve HLA-A*31:01 gibi alleller, tüm varyant profillerinin son sıralarında yer alarak sürekli olarak görece daha düşük bir epitop yükü göstermiştir. Son olarak, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'deki profiller bir bütün olarak incelendiğinde, Wild type varyant dışındaki diğer beş varyantın (BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) epitop dağılım profillerinin birbirine dikkat çekici derecede benzer olduğu saptanmıştır. Bu varyantlar, sadece toplam epitop sayılarında değil, aynı zamanda hangi HLA allellerinin ne kadar baskın olduğu (allel hiyerarşisi) açısından da yüksek bir tutarlılık sergilemektedir. Bu bulgu, bu varyantların T-hücresi epitop bütünlüğü açısından benzer bir evrimsel yol izlediğini ve benzer immün kaçış mekanizmalarını paylaştığını düşündürmektedir.



Şekil 4.17: Wild type, BA.2.86 ve JN.1 varyantları için HLA Sınıf I allelleri bazında güçlü bağlayıcı epitop dağılımı. Grafikler, sırasıyla wild type (Ancestral), BA.2.86 ve JN.1 varyantları için HLA Sınıf I allelleri (X ekseni) tarafından sunulan özgün güçlü bağlayıcı epitop sayısını (Y ekseni) göstermektedir. Güçlü bağlayıcı epitoplar, NetMHCpan EL %1 yüzdelik dilimi (percentile rank ≤1) kriterine göre tanımlanmıştır.

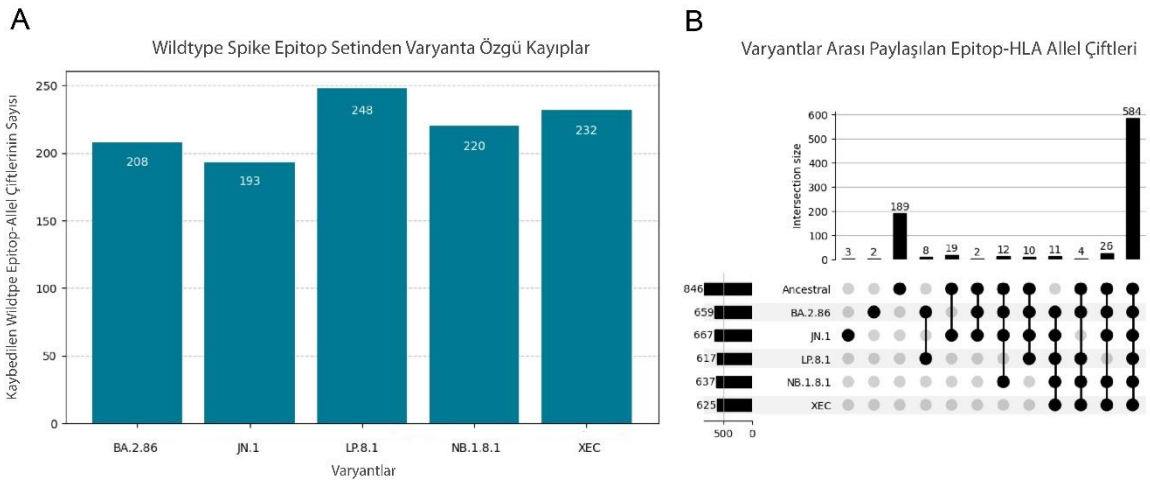
Her bir varyanta ait grafikte, HLA allelleri sundukları epitop sayısına göre azalan düzende sıralanmıştır.



Şekil 4.18: NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC varyantları için HLA Sınıf I allelleri bazında güçlü bağlayıcı epitop dağılımı. Grafikler, sırasıyla NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC varyantları için HLA Sınıf I allelleri (X ekseni) tarafından sunulan özgün güçlü bağlayıcı epitop sayısını

(Y ekseni) göstermektedir. Güçlü bağlayıcı epitoplar, NetMHCpan EL %1 yüzdelik dilimi (percentile rank ≤1) kriterine göre tanımlanmıştır. Her bir varyanta ait grafikte, HLA allelleri sundukları epitop sayısına göre azalan düzende sıralanmıştır.

Varyantlar arasındaki epitop profili farklılıklarına ek olarak, tüm varyantlarda değişmeden kalan çekirdek epitop seti ve varyant tanımlayıcı mutasyonların bu epitoplar üzerindeki fiziksel etkisi de analiz edilmiştir. İlk olarak, pipeline'ın 5. adımında, güçlü bağlayıcı (NetMHCpan EL yüzdelik dilimi ≤1) olarak tanımlanan peptit-HLA çiftlerinin, incelenen altı varyantın (Wild type, BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) tamamında ortak olarak bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Yapılan kesişim (intersection) analizi sonucunda, toplam 584 adet peptit-HLA çiftinin tüm varyantlar boyunca korunduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, varyantlarda gözlenen mutasyonel değişimlere rağmen, T-hücresi tanınması için stabil kalan çekirdek bir epitop havuzunun varlığını göstermektedir. Analizin 6. adımında ise, her bir varyantın (Wild type suşu hariç) tanımlayıcı mutasyonlarının, o varyantın kendi güçlü bağlayıcı epitoplarının (percentile ≤1) genomik koordinatları ile fiziksel olarak çakışıp çakışmadığı (overlap) araştırılmıştır. Bu analiz, Ancestral_mutation_overlap.xlsx dosyasından XEC_mutation_overlap.xlsx dosyasına kadar her varyant için ayrı ayrı yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, incelenen varyantların (BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC) hiçbirinde, tanımlayıcı mutasyonların güçlü bağlayıcı epitop bölgeleri üzerine denk geldiği bir çakışma saptanmamıştır. (Wild type varyant, tanım gereği referans olduğu için "etkilenmiş" epitop içermemektedir.) Sonuç olarak, tüm varyantlar için "etkilenen" (affected) epitop sayısı sıfır (0) olarak bulunmuştur. Bu bulguların doğrudan bir sonucu olarak, analizin 7. adımı olan "Etkilenen/Etkilenmeyen Epitop Oranları" için planlanan pasta grafikler, tüm varyantlarda %100 "Etkilenmemiş" (Unaffected) sonucunu gösterdiği için bulgulara eklenmemiştir. Benzer şekilde, analizin 8. adımındaki mutasyon çakışma ısı haritası (heatmap) da çakışan epitop bulunmadığı için boş bir veri seti üreteceğinden oluşturulamamıştır. Bu durum, bu çalışmada incelenen varyantların tanımlayıcı mutasyonlarının, o varyantlarda halen mevcut olan güçlü bağlayıcı epitopların dizilimlerini doğrudan bozmadığını göstermektedir.



Şekil 4.19: SARS-CoV-2 varyantları arasında epitop-HLA allel çifti korunumu ve kaybının karşılaştırmalı analizi. Epitop-HLA allel çiftlerinin varyantlar arasındaki değişimini iki farklı analizle göstermektedir. **(A)** Wild type Spike epitop setinde bulunan "peptit-HLA alel" çiftlerinden, incelenen beş varyantın (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) her birinde kaybedilmiş (bulunmayan) olan çiftlerin toplam sayısını gösteren çubuk grafik. **(B)** İncelenen varyantların (Wild type ve diğer beş varyant) tümü arasındaki "peptit-HLA alel" çifti kümelerinin kesişimlerini görselleştiren bir UpSet grafiği.

Altı SARS-CoV-2 varyantı (Wild type, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasındaki "peptit-HLA alel" çifti kümelerinin kesişimlerini ve özgün elemanlarının grafiği gösterilmektedir (Şekil 4.19). Sol taraftaki yatay çubuklar (Set Büyüklüğü), her bir yatay çubuk, o varyantın sahip olduğu toplam özgün peptit-HLA çifti sayısını göstermektedir (örn. Wild type varyant toplam 846 çifte sahiptir). Üst taraftaki dikey çubuklar (Kesişim Büyüklüğü), her bir dikey çubuk, altındaki nokta matrisi ile tanımlanan spesifik bir varyant kombinasyonu tarafından paylaşılan peptit-HLA çiftlerinin sayısını temsil eder. Merkezdeki nokta matrisi, matristeki her bir sütun, üstteki dikey çubuğa karşılık gelir. Sütundaki siyah noktalar, o kesişime dahil olan varyantları gösterirken, gri noktalar hariç tutulanları gösterir. En sağdaki çubuk (n=584), matriste altı varyantın tamamının (tüm noktalar siyah) bağlı olduğu bu çubuk, tüm varyantlar arasında korunan (paylaşılan) toplam peptit-HLA çifti sayısını göstermektedir. İkinci çubuk (n=189), matriste sadece "Ancestral" satırında siyah nokta bulunan bu çubuk, sadece Wild type varyantına özgü olan ve diğer beş varyantın hiçbirinde bulunmayan (yani bu varyantlarda

"kaybedilmiş" olan) çiftlerin sayısını ifade eder. Diğer çubuklar (n=3, 8, 2, 19 vb.), farklı varyant kombinasyonları arasındaki daha küçük alt küme paylaşımlarını göstermektedir.

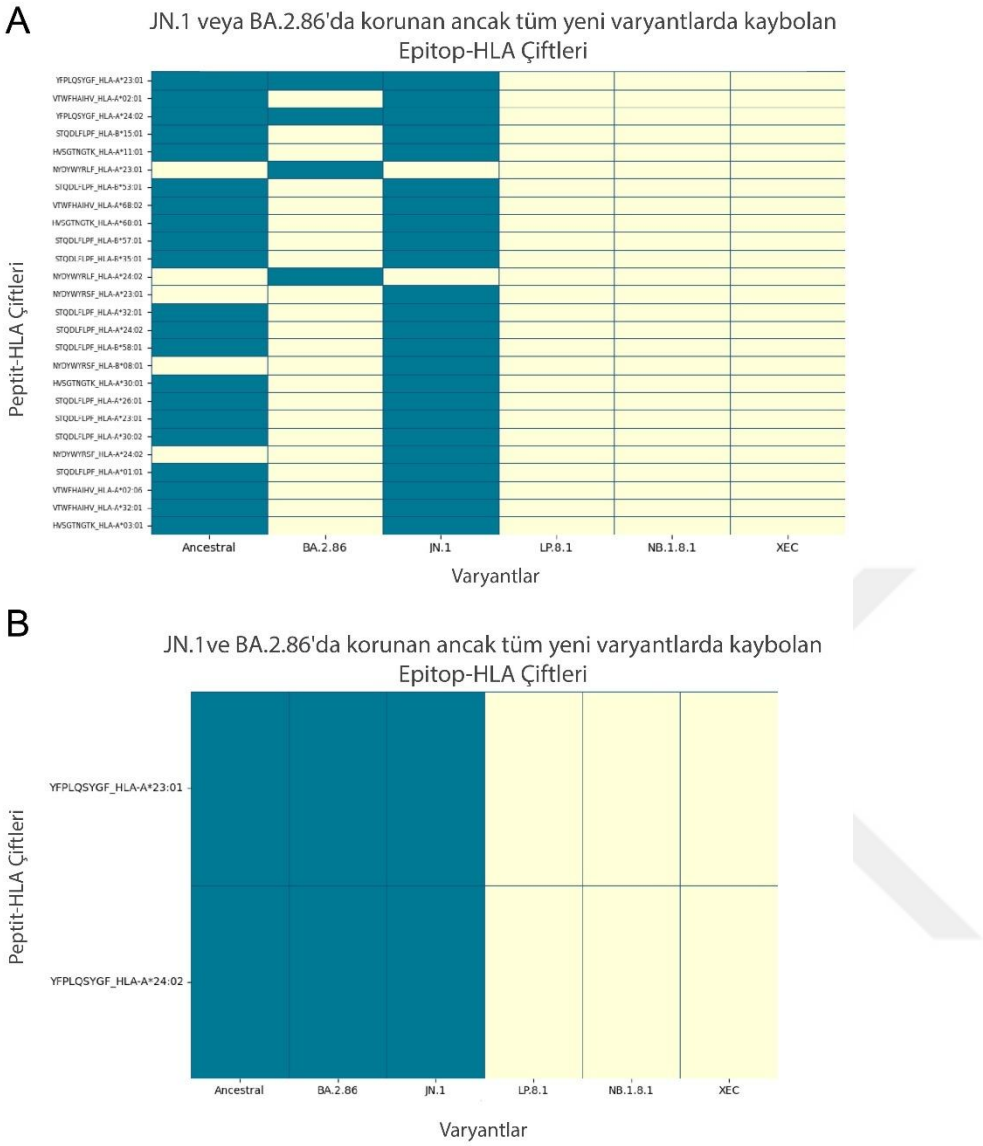
Wild type SARS-CoV-2 suşu ile BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantları arasındaki T-hücresi epitop profili değişimi, epitop kaybı (Şekil 4.19A) ve epitop paylaşımı (Şekil 4.19B) olmak üzere iki temel açıdan incelenmiştir. Şekil 4.19'da sunulan çubuk grafik, wild type suşunda tanımlanan peptit-HLA allel çifti setinin, diğer beş varyantın her birinde ne ölçüde kaybedildiğini kantitatif olarak göstermektedir. Bu analize göre, incelenen tüm varyantlarda wild type suşuna kıyasla 190'ın üzerinde peptit-HLA çiftinin kaybedildiği saptanmıştır. En az kayıp JN.1 varyantında (n=193) gözlemlenirken, en yüksek kayıp LP.8.1 varyantında (n=248) tespit edilmiştir. BA.2.86 (n=208), NB.1.8.1 (n=220) ve XEC (n=232) varyantları da wild type suşundan 200'ün üzerinde epitop-HLA çiftini kaybetmiştir. Bu bulgular, yeni varyantların epitop profilinin wild type suşundan önemli ölçüde farklılaştığını açıkça ortaya koymaktadır. Epitop profilindeki bu değişim, Şekil 4.19B'deki UpSet plot analizi ile daha ayrıntılı olarak incelenmiştir. Grafiğin sol tarafında yer alan set büyüklükleri (set size), wild type varyantın 846 peptit-HLA çifti ile en zengin epitop havuzuna sahip olduğunu, diğer varyantların ise daha düşük (625 ile 667 arasında) sayıda çift içerdiğini doğrulamaktadır. Panel A'daki kaybı teyit eder nitelikte, UpSet plot analizi 189 adet peptit-HLA çiftinin sadece wild type varyantına özgü olduğunu ve incelenen diğer beş varyantın tamamında kaybedildiğini ortaya koymuştur (grafikteki n=189 ile gösterilen kesişim). Bu önemli epitop kaybına rağmen, analizin en kritik bulgusu, toplam 584 adet peptit-HLA çiftinin incelenen altı varyantın tamamında ortak olarak bulunduğu, yani korunduğu (preserved) olmuştur. Grafikte en sağdaki çubuk ile temsil edilen bu "çekirdek epitop seti", virüsün evrimsel değişimi boyunca T-hücresi tanınması için stabil kalan hedefleri temsil etmektedir. Bu iki analiz birlikte, SARS-CoV-2 varyantlarının hem önemli bir epitop kaybı yaşayarak immün kaçış potansiyeli gösterdiğini hem de T-hücresi yanıtı için kritik olabilecek büyük bir çekirdek epitop setini koruduğunu göstermektedir.

SARS-CoV-2 varyantları arasındaki epitop-HLA çifti setlerinin evrimsel dinamiklerini incelemek amacıyla, belirli epitop setlerinin korunumu ve kaybı biyoinformatik yöntemlerle analiz edilmiştir. Bu analizde, özellikle JN.1 ve BA.2.86 varyantlarında korunan, ancak daha sonra ortaya çıkan LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarında kaybolan epitop-HLA çiftleri tanımlanarak odaklanılmıştır. Bu

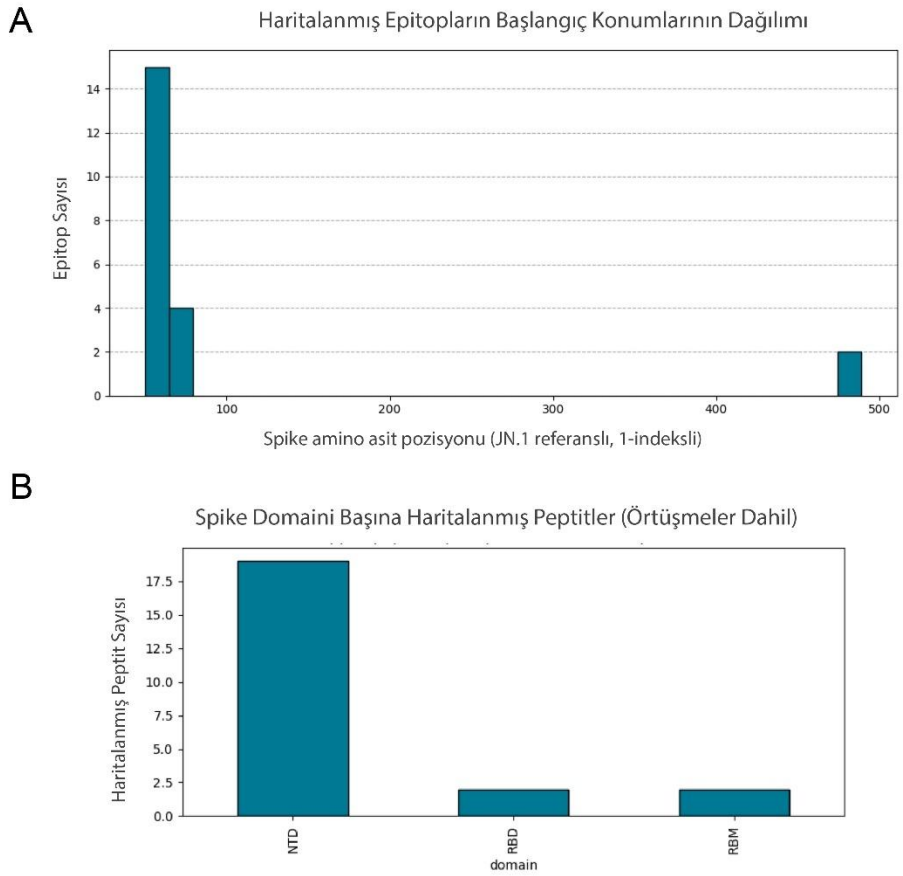
karşılaştırmalı analizin sonuçları Şekil 4.20'deki ısı haritalarında özetlenmektedir. Şekil 4.20A, "JN.1 veya BA.2.86" referans setlerinin en az birinde (birleşim) bulunan, ancak takip eden üç yeni varyantın tümünde kaybolan epitop-HLA çiftlerini göstermektedir. Bu grupta, görece daha büyük ve heterojen bir epitop havuzunun (N=[26]) yer aldığı gözlemlenmiştir. Bu çiftlerin, referans varyantlar olan Ancestral, BA.2.86 ve JN.1 arasında farklı korunum kalıpları sergilediği (örneğin, bazılarının yalnızca BA.2.86'da mevcutken, diğerlerinin JN.1 ve Ancestral'da da bulunduğu) görülmektedir. Bu heterojen grubun ortak ve en belirgin bulgusu, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının tümünde evrensel olarak kaybolmuş (açık renk) olmalarıdır.

Şekil 4.20B ise, daha katı bir korunum kriteri olan "JN.1 ve BA.2.86" referans setlerinin her ikisinde de (kesişim) ortak olarak bulunan alt seti sunmaktadır. Bu analizin, (A) panelindeki geniş havuzu filtreleyerek, YFPLQSYGF peptidi ile ilişkili iki spesifik HLA alelini (HLA-A*23:01 ve HLA-A*24:02) içeren çok küçük bir alt grup (N=2) ortaya çıkardığı tespit edilmiştir. Görseldeki ısı haritası, bu yüksek düzeyde korunmuş çiftlerin, sadece BA.2.86 ve JN.1'de değil, aynı zamanda Ancestral varyantta da bulunduklarını (koyu renk) doğrulamaktadır. (A) panelindeki grupta olduğu gibi, bu çekirdek epitop çiftlerinin de üç yeni varyantta eş zamanlı olarak kaybolduğu saptanmıştır.

Bu iki bulgunun birlikte değerlendirilmesi, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının ortaya çıkışıyla birlikte, hem BA.2.86/JN.1 havuzundaki daha değişken epitopların (Şekil 4.20A) hem de Ancestral kökenden beri güçlü bir şekilde korunan çekirdek epitopların (Şekil 4.20B) eş zamanlı olarak kaybedildiğini göstermektedir. Bu durum, yeni varyantların epitop profillerinde belirgin bir "kayıp" veya "kaçış" örüntüsü sergilediğine işaret etmektedir.



Şekil 4.20: Seçilmiş epitop-HLA çiftlerinin SARS-CoV-2 varyantları arasındaki korunma ve kayıp profilleri. Heatmap, altı farklı Spike varyantı (X ekseni: Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) boyunca belirli peptit-HLA çiftlerinin (Y ekseni) varlığını (koyu renk) veya yokluğunu (açık renk) göstermektedir. **(A)** "JN.1 veya BA.2.86" referans setlerinin en az birinde (birleşim) bulunan, ancak daha yeni olan üç varyantın (LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) tümünde kaybolan epitop-HLA çiftlerini göstermektedir. **(B)** "JN.1 ve BA.2.86" referans setlerinin her ikisinde de (kesişim) ortak olarak bulunan, ancak daha yeni üç varyantın tümünde kaybolan epitop-HLA çiftlerini göstermektedir. Bu alt grup, daha katı bir korunum ve kayıp kriterini temsil etmektedir.

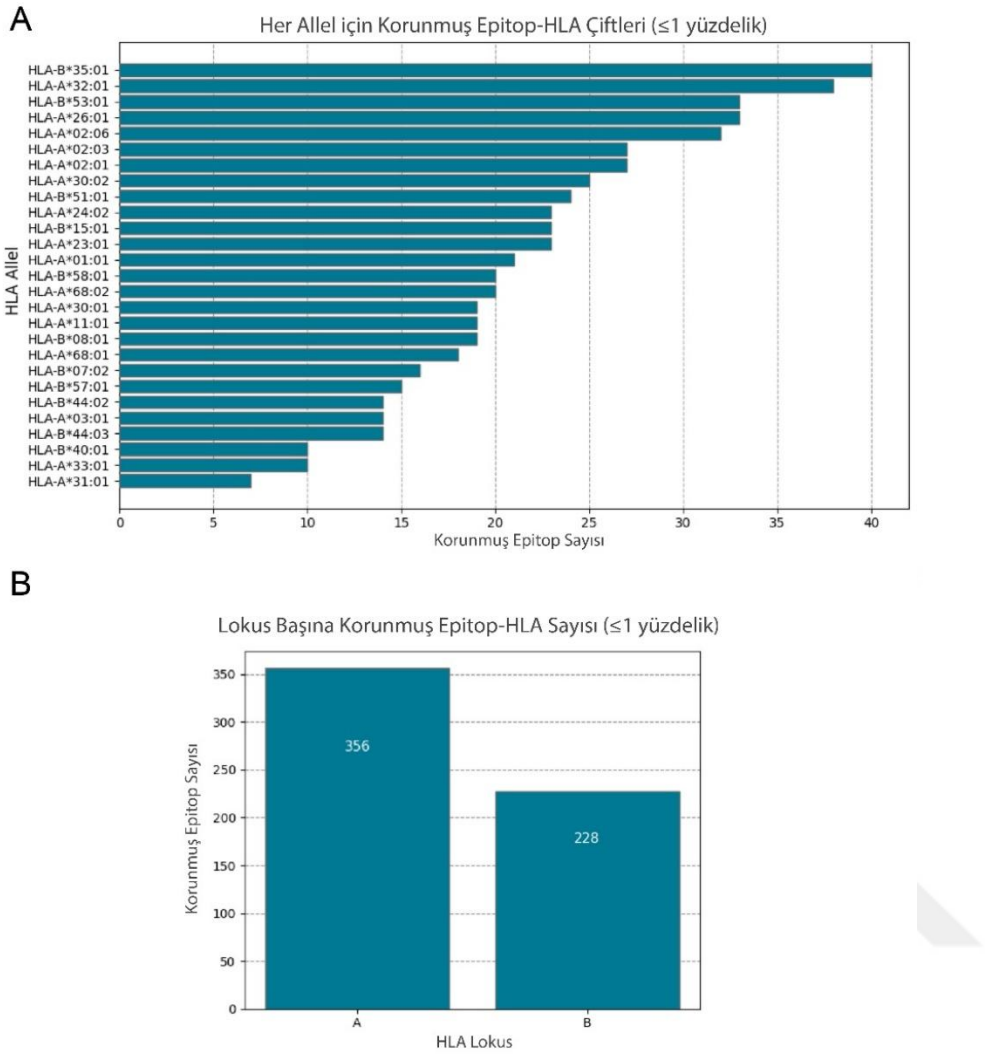


Şekil 4.21: JN.1/BA.2.86'da korunup yeni varyantlarda kaybolan epitop-hla çiftlerinin pozisyonel ve fonksiyonel domain haritalaması. **(A)** Tanımlanan kayıp epitop setinin, JN.1 referans Spike protein dizisi (1-indeksli) üzerindeki amino asit başlangıç pozisyonlarına göre dağılımını gösteren histogram. **(B)** Aynı kayıp peptit setinin, Spike proteininin bilinen fonksiyonel domainlerine (NTD: N-terminal domain, RBD: Reseptör bağlanma domeni, RBM: Reseptör bağlanma motifi) göre haritalanmasını ve peptit sayısını gösteren sütun grafiği. Sütun grafiği, bir peptidin birden fazla domain ile örtüşmesine (overlap) izin verecek şekilde hesaplanmıştır.

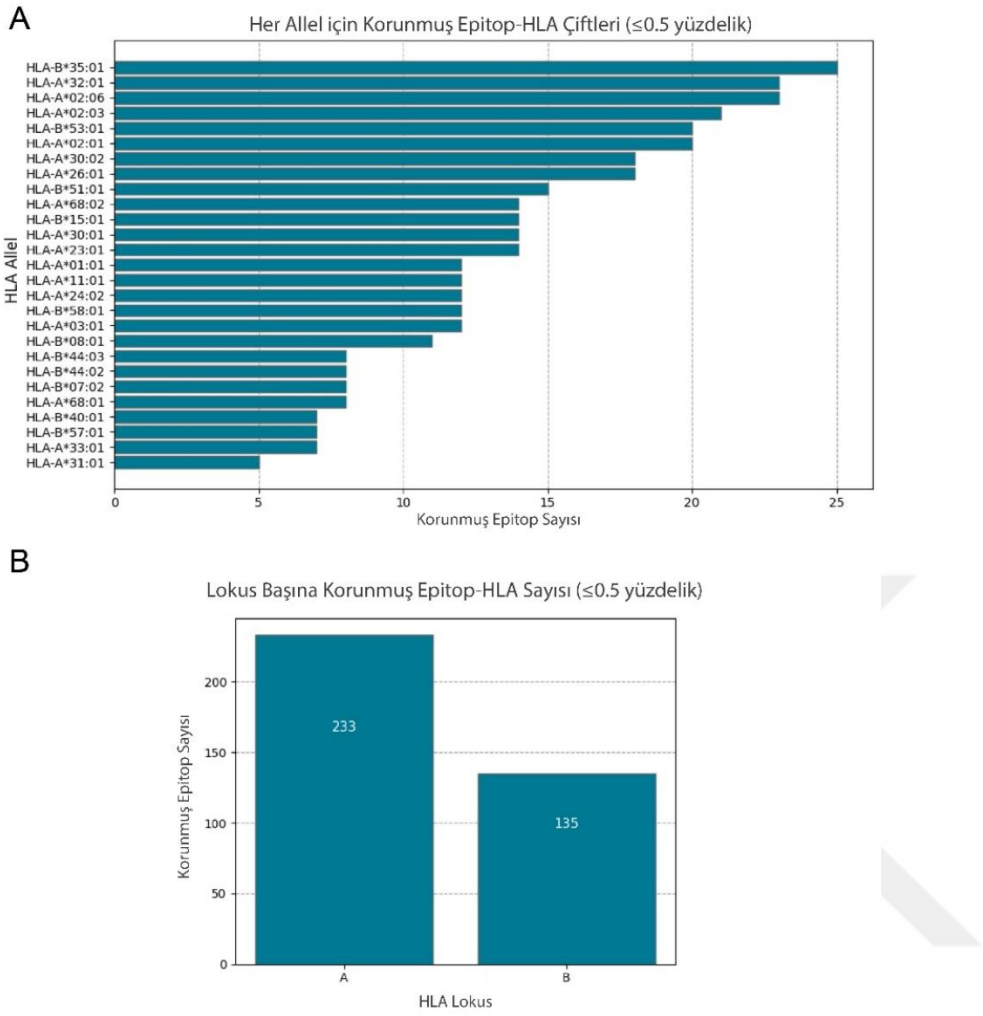
Bir önceki analizde (Şekil 4.21A), JN.1 veya BA.2.86 varyantlarında korunup daha yeni varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) kaybolduğu saptanan epitop-HLA çiftlerinin (N=26), Spike proteini üzerindeki fiziksel konumları ve fonksiyonel domain ilişkileri detaylı olarak incelenmiştir. Şekil 4.21A, bu kayıp epitopların Spike proteini üzerindeki başlangıç pozisyonlarının dağılımını (JN.1 referans dizisine göre) göstermektedir. Analiz sonucunda, kayıp epitopların protein dizisi boyunca rastgele dağılmadığı, aksine iki belirgin bölgede kümelendiği tespit edilmiştir. Kayıp epitopların

büyük çoğunluğunun (N=19, proteinin N-terminal bölgesinde, yaklaşık 40 ila 100. amino asit pozisyonları arasında yoğunlaştığı görülmüştür. Buna ek olarak, daha küçük ikinci bir kümelenmenin (N=2) ise proteinin ~480-490 pozisyonları civarında yer aldığı saptanmıştır. Bu pozisyonel dağılımın fonksiyonel domain haritalaması (Şekil 4.21B), gözlemlenen bu kümelenmenin yapısal önemini doğrulamaktadır. Sütun grafiği, kayıp peptitlerin dominant bir kısmının (N=19) NTD (N-terminal domain) içerisinde yer aldığını açıkça göstermektedir. Pozisyon ~480-490'daki ikinci kümelenme ise, Spike proteininin kritik öneme sahip iki fonksiyonel bölgesi olan hem RBD hem de RBM ile örtüşmektedir (N=2). Bu bulgular, JN.1 ve BA.2.86'dan sonra ortaya çıkan yeni varyantlardaki T hücresi epitop kaybının (veya kaçışının) tesadüfi olmadığını; bunun yerine, immün yanıt açısından kritik olan NTD ve RBD/RBM gibi spesifik, yüksek düzeyde hedeflenen bölgelerde yoğunlaştığını ortaya koymaktadır.

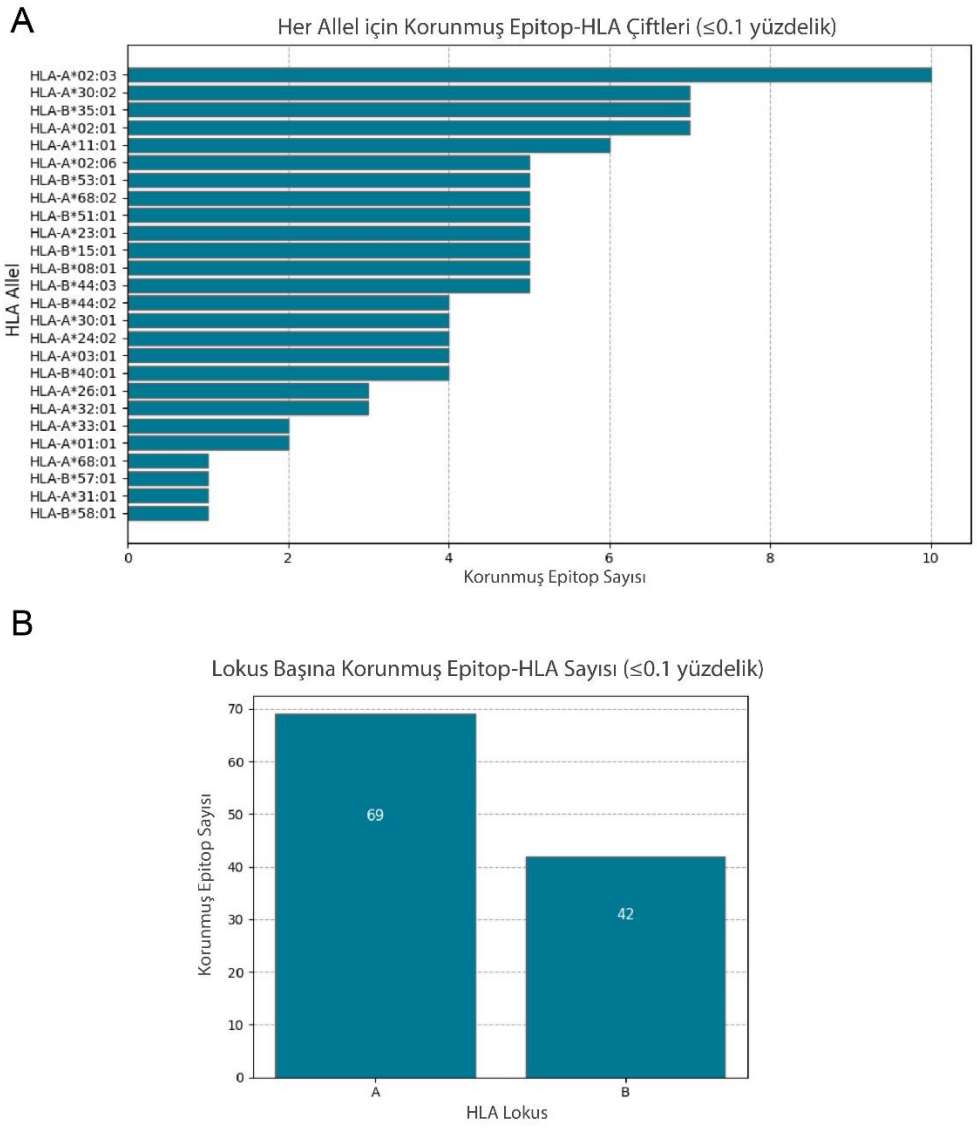
Bu çalışmada, SARS-CoV-2 Spike proteini üzerinde tanımlanan CD8 T-hücresi epitoplarının beş farklı viral varyant (Wild type, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasındaki korunum düzeyleri, dört farklı bağlanma afinitesi eşik değeri kullanılarak (NetMHCpan ≤1, ≤0,5, ≤0,1 ve ≤0,05 yüzdelik) analiz edilmiştir (sırasıyla, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25). Şekil 4.22B'de görüldüğü üzere, en geniş filtre olan ≤1 yüzdelik dilim kriteri uygulandığında, tüm varyantlarda korunan toplam 584 (356 HLA-A, 228 HLA-B) epitop–HLA çifti tanımlanmıştır.



Şekil 4.22: NetMHCpan ≤1 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı. Grafik, analiz edilen tüm viral varyantlarda (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) hem korunan hem de NetMHCpan persentil skoru ≤1 olan epitop–HLA çiftlerinin sayısını göstermektedir. **(A)** Korunmuş çiftlerin spesifik HLA alelleri bazında dağılımı. Yatay çubuklar, her bir allel tarafından sunulan korunmuş epitop sayısını göstermektedir. **(B)** Korunmuş çiftlerin HLA lokusları bazında kümülatif dağılımı. Çubuklar, sırasıyla HLA-A (n=356) ve HLA-B (n=228) lokuslarına atanan toplam korunmuş epitop sayısını temsil etmektedir.

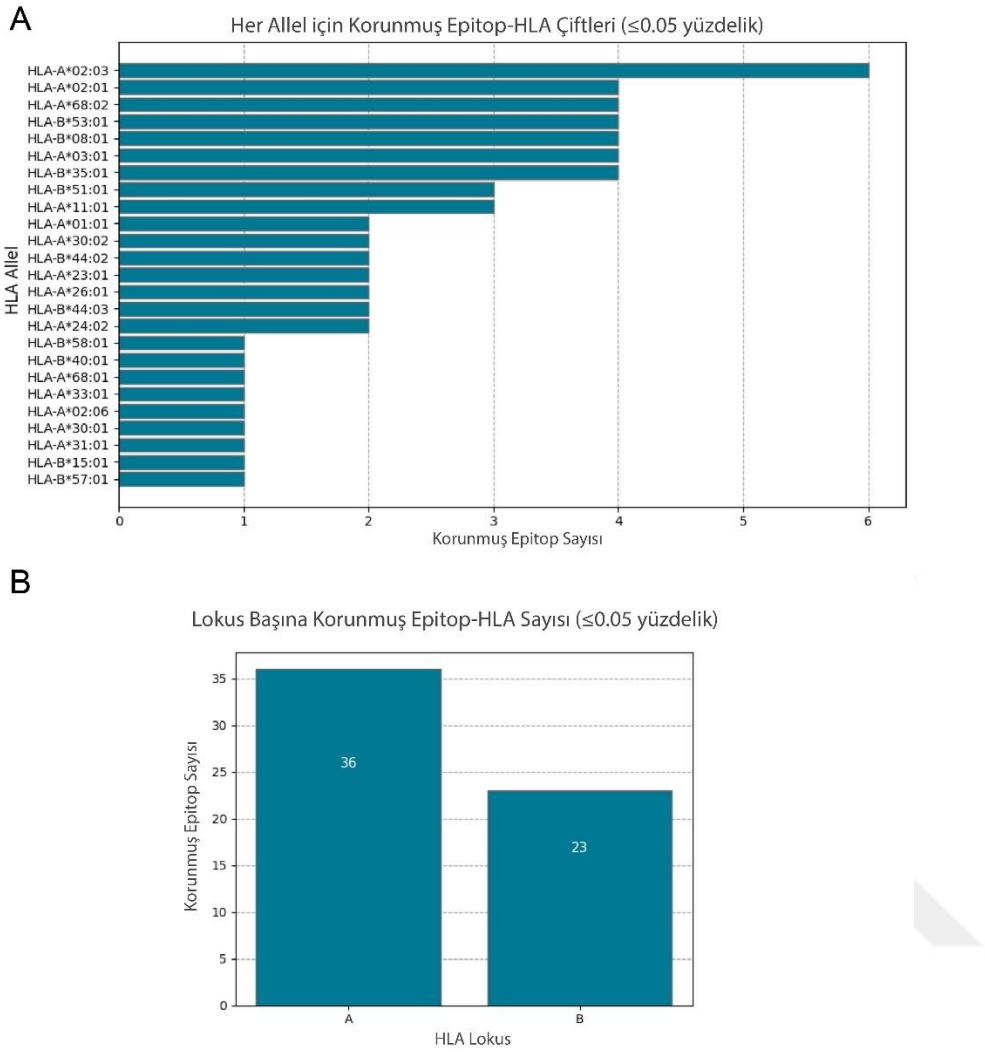


Şekil 4.23: NetMHCpan ≤0,5 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı. Grafik, analiz edilen tüm viral varyantlarda korunan ve daha yüksek bağlanma afinitesini gösteren NetMHCpan persentil skoru ≤0,5 kriterini karşılayan epitop–HLA çiftlerinin sayısını göstermektedir. **(A)** Korunmuş çiftlerin spesifik HLA alelleri bazında dağılımı. Yatay çubuklar, her bir alel tarafından sunulan korunmuş epitop sayısını göstermektedir. **(B)** Korunmuş çiftlerin HLA lokusları bazında kümülatif dağılımı. Çubuklar, sırasıyla HLA-A (n=233) ve HLA-B (n=135) lokuslarına atanan toplam korunmuş epitop sayısını temsil etmektedir.



Şekil 4.24: NetMHCpan ≤0,1 yüzdelik bağlanma afinitesi eşik değerine göre filtrelenmiş, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı. Grafik, tüm varyantlarda korunan ve NetMHCpan persentil skoru ≤0,1 olan, çok güçlü bağlayıcı (very strong binder) olarak kabul edilen epitop–HLA çiftlerinin sayısını göstermektedir. **(A)** Korunmuş çiftlerin spesifik HLA alelleri bazında dağılımı. **(B)** Korunmuş çiftlerin HLA lokusları bazında kümülatif dağılımı. Bu katı eşik değerinde, HLA-A lokusu için 69, HLA-B lokusu için 42 adet korunmuş çift tanımlanmıştır.

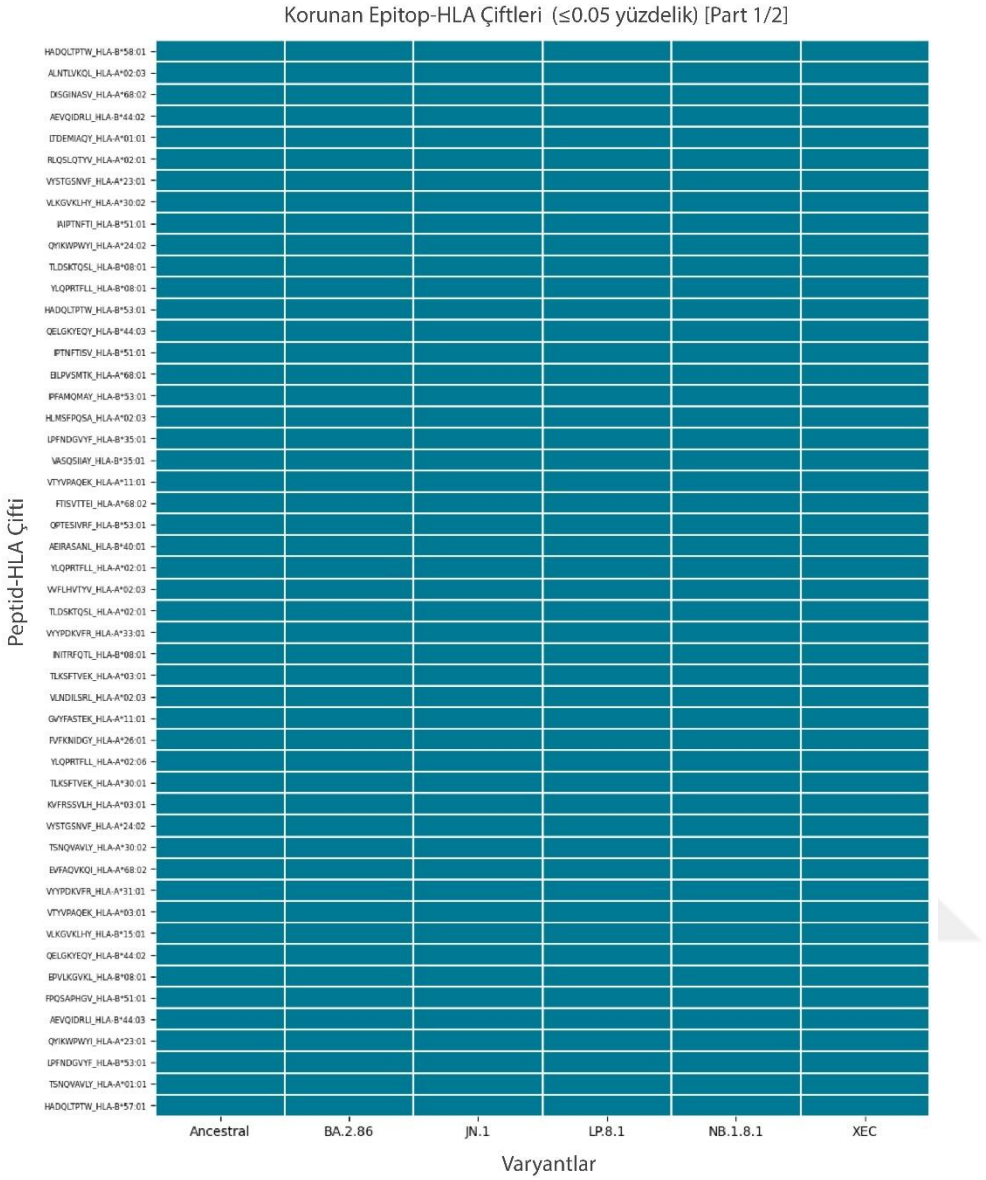
Bu sayı, filtre katılığı artırıldıkça kademeli olarak azalmış; ≤0,5 yüzdelik dilimde 368 çifte (Şekil 4.23B), ≤0,1 yüzdelik dilimde 111 çifte (Şekil 4.24B) ve son olarak en katı filtre olan ≤0,05 yüzdelik dilimde 59 çifte (Şekil 4.25B) düşmüştür. Lokus bazında yapılan incelemelerde, tüm analiz seviyelerinde tutarlı bir eğilim gözlenmiştir.



Şekil 4.25: En güçlü bağlayıcıları (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) temsil eden, korunmuş CD8 T-hücresi epitop–HLA çiftlerinin dağılımı. Grafik, analitikte kullanılan en güçlü bağlanma afinitesi kriterini (NetMHCpan persentil skoru ≤0,05) karşılayan ve tüm varyantlarda korunum gösteren epitop–HLA çiftlerinin sayısını özetlemektedir. **(A)** Bu en güçlü bağlayıcı korunmuş çiftlerin, spesifik HLA allelleri bazındaki dağılımı. **(B)** Korunmuş çiftlerin HLA lokusları bazındaki kümülatif dağılımı. Analiz, bu en yüksek afiniteli grupta HLA-A lokusu için 36 ve HLA-B lokusu için 23 adet korunmuş çift bulunduğunu ortaya koymuştur.

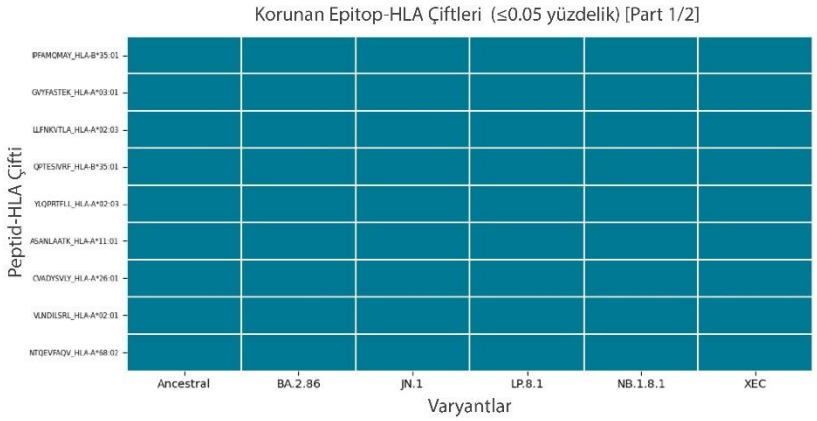
İncelenen her dört afinite eşik değerinde de (Şekil 4.22B, 4.23B, 4.24B ve 4.25B), HLA-A lokusunun, HLA-B lokusuna kıyasla daha fazla sayıda korunmuş epitop sunduğu tespit edilmiştir. En geniş analizde (≤1) HLA-A (n=356) ve HLA-B (n=228) arasında gözlenen bu baskınlık, en katı analiz (≤0,05) sonucunda da HLA-A (n=36) ve HLA-B

(n=23) şeklinde korunmuştur. Bu bulgu, HLA-A alellerinin, varyantlar arasında yüksek oranda korunan viral epitopların sunumunda HLA-B'ye göre daha baskın bir role sahip olabileceğine işaret etmektedir. Daha spesifik bir analiz olan allel bazlı dağılımlar, filtre katılığı arttıkça epitop sunum kapasitesi en yüksek olan allellerin değişimini ortaya koymuştur. Şekil 4.22A'da (≤1 yüzdelik), HLA-B*35:01 (n=40) ve HLA-A*32:01 (n=38) alelleri en fazla sayıda korunmuş epitop sunan aleller olarak öne çıkarken, afinite kriteri en katı seviyeye (≤0.05 yüzdelik, Şekil 4.25A) getirildiğinde bu sıralama değişmiştir. En güçlü bağlayıcıları temsil eden bu elit grupta, HLA-A*02:03 (n=6), HLA-A*02:01 (n=4), HLA-A*68:02 (n=4) ve HLA-B*53:01 (n=4) alelleri en yüksek sayıda korunmuş epitop sunan aleller olarak belirlenmiştir. Bu durum, söz konusu allellerin, hem yüksek bağlanma afinitesine sahip hem de varyantlar arasında mutlak korunum gösteren epitopları sunma konusunda özellikle yetkin olduğunu göstermektedir. Son olarak, en katı filtreleme kriteri (≤0,05 yüzdelik) sonucunda tanımlanan ve en güçlü bağlayıcıları temsil eden 59 adet korunmuş epitop–HLA çiftinin tüm varyantlardaki varlığı, bir heat-map aracılığıyla görsel olarak doğrulanmıştır.



Şekil 4.26: En güçlü bağlayıcı (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arası doğrulaması (Bölüm 1/2)

Bu heat-map şekili, analizin en katı filtresi (≤0,05) sonucunda belirlenen 59 adet korunmuş epitop–HLA çiftinden ilk 50'sini göstermektedir. Y ekseni peptid–HLA çiftini, X ekseni ise incelenen altı viral varyantı (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) temsil etmektedir. Grafikteki kesintisiz dolgulu hücreler, Y ekseninde listelenen her bir "en güçlü bağlayıcı" çiftin, incelenen tüm varyantlarda mutlak olarak korunduğunu göstermektedir.



Şekil 4.27: En güçlü bağlayıcı (NetMHCpan ≤0,05 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arası doğrulaması (Bölüm 2/2)

Bu heat-map şekili, bir önceki şeklin (Şekil 4.26) devamı niteliğinde olup, ≤0,05 filtresini geçen 59 korunmuş çiftten geriye kalan 9 adet peptid–HLA çiftini listelemektedir. Y ekseni peptid–HLA çiftini, X ekseni ise incelenen viral varyantları temsil etmektedir. Dolgulu hücreler, bu çiftlerin de altı varyantın tamamında korunduğunu görsel olarak doğrulamaktadır.

İki bölüm halinde sunulan (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27) bu haritalar, tanımlanan 59 adayın her birinin, incelenen altı varyantın (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) tamamında istisnasız olarak (%100) bulunduğunu teyit etmektedir. Bu sonuç, analiz metodolojisinin güvenilirliğini ve filtrelenmiş 59 çiftin yüksek kalitesini kanıtlamakta, bu çiftleri potansiyel aşı tasarımları için öncelikli hedefler olarak konumlandırmaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, COVID-19 geçirmiş bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden, SARS-CoV-2 wild type ve Omicron varyantlarına özgü bellek CD8+ T hücrelerinin frekansı ve spesifikliği kapsamlı şekilde değerlendirilmiştir. Ayrıca, SARS-CoV-2'ye karşı gelişen bağışıklık yanıtında OAS fenomeninin etkisi, hem deneysel yöntemlerle hem de hesaplamalı biyoloji teknikleriyle araştırılmıştır.

Çalışmanın gerçekleştirildiği popülasyonda, son enfeksiyonlarının üzerinden geçen sürenin minimum 9 ay, ortalama ise 15-18 ay olduğu saptanmıştır. Bu zaman diliminde geçirilen enfeksiyon, akut ve erken bellek evrelerinin (early memory) ötesinde, stabilizasyonunu tamamlamış uzun süreli bellek (long-term memory) yanıtlarının karakterize edilmesine imkan tanımıştır. Literatürde, özellikle Omicron varyantına karşı gelişen hücresel bağışıklığın uzun dönemli kalıcılığına dair verilerin kısıtlı olması nedeniyle, enfeksiyon sonrası 1 yılı aşan bu takip süresi, CD8+ T hücre alt gruplarının uzun dönem kinetiğinin ve homeostatik korunmunun değerlendirilmesi açısından kritik bir öneme sahiptir.

Antijenle ilk karşılaşma, SARS-CoV-2'ye karşı T hücresi bağışıklığını önemli ölçüde etkiler (103). İlk maruziyetin türü (doğal enfeksiyon veya aşılama), daha sonraki varyantlara karşı T hücresi tepkilerinin büyüklüğünü ve çapraz tanıma yeteneğini belirleyen kritik bir faktör olarak vurgulanmaktadır. SARS-CoV-2 antijenine maruz kalma geçmişi, hafıza CD8+ T hücrelerinin fenotiplerini ve özgüllüğünü şekillendirdiği bulunmuştur (103,104). Hipermutasyona uğramış BA.2.86 varyantına karşı T hücresi tepkilerinin çapraz reaktivitesini değerlendiren bir çalışmada, ilk immün yanıt doğal enfeksiyon yoluyla indüklendiğinde, T hücresi yanıtlarının ve çapraz tanımanın, üç yıl önceki aşılamayla indüklenene göre anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (103). Antijenle ilk karşılaşma türü T hücresi yanıtının büyüklüğünü etkilese de, genel olarak T hücreleri, antikorlara kıyasla SARS-CoV-2 varyantlarına karşı daha dirençli ve çapraz reaktif kalır (105,106). Omicron BA.1, BA.4/BA.5 ve hatta hipermutasyona uğramış BA.2.86 gibi varyantlar nötralize edici antikorlardan büyük ölçüde kaçmasına rağmen, T hücresi yanıtlarının (hem CD4+ hem de CD8+) çoğu bireyde korunmuş olduğu veya sadece kısmen azaldığı gözlemlenmiştir (107). T hücresi yanıtlarının bu dayanıklılığı, T hücrelerinin

genellikle Spike proteini dışındaki daha korunmuş viral proteinlerde (örneğin, Nükleokapsid ve Membran proteinleri) yer alan epitopları hedeflemesinden kaynaklanır (108). BA.2.86 varyantına karşı Spike proteinine özgü T hücreleri, önceki enfeksiyon veya aşılama ile indüklenmiş olsa bile, etkili bir immün tanıma sergilemeye devam eder (109). Ancak BA.2.86 varyantındaki mutasyonların, test edilen on immünodominant T hücresi epitopundan altısında peptit sunumunu azaltması beklenirken, genom genelindeki T hücresi epitoplarının toplam sayısının bu etkiyi hafifletmesi beklenmektedir (103).

Yalnızca bir enfeksiyon geçiren bireylerde BA.2.86'ya karşı T hücresi tanınmasının, iki kez enfekte olanlara kıyasla (özellikle IL-2 ve polifonksiyonel T hücreleri için) azalabileceği gözlemlenmiştir. Virüs ile ilk karşılaşması doğal enfeksiyon olan kişilerde, BA.2.86'ya karşı T hücresi yanıtları (IFN-γ, IL-2 ve IFN-γ + IL-2 ölçümlerine göre) ilk karşılaşması aşılama olan kişilere kıyasla sırasıyla 3,5, 2 ve 2,4 kat daha yüksek olmuştur (103). Rubio ve arkadaşlarının yaptığı araştırmalara göre, doğal enfeksiyonun varlığı ve tekrarı, T hücresinin BA.2.86 gibi zorlu varyantları tanıması için, sadece aşılamaya veya tekil maruziyete kıyasla daha sağlam bir zemin oluşturduğunu göstermektedir. Wild type veya Delta varyantı enfeksiyonları, Omicron varyantı enfeksiyonlarına kıyasla BA.2.86'ya karşı daha yüksek T hücresi yanıtları sağlamıştır (103). Bizim yaptığımız çalışmada SARS-CoV-2-spesifik bellek hücelerin frekanslarını incelediğimizde bu çalışmayı destekleyen sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmada, hem daha önce wild type virüsle doğal bağışıklık yoluyla karşılaşmış ve hibrit bağışıklığa sahip olan Wt(+) hem de karşılaşmamış Wt(–) bireylerde Omicron varyantına karşı güçlü T hücresi yanıtları tespit edilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen en dikkat çekici bulgulardan biri, doğal enfeksiyon geçmişine sahip hibrit bağışıklığı olan grup (Wt(+)) ile sadece aşılanmış grup (Wt(–)) arasında, S^{WT} antijenine verilen CD8+ T hücresi yanıtlarının büyüklüğü açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamış olmasıdır. Bu durum, sadece aşılanma yoluyla kazanılan bağışıklığın, hibrit bağışıklığa benzer kantitatif düzeyde bir hücresel yanıt oluşturabildiğini kanıtlamaktadır. S^{WT} uyarımı sonrası tüm bellek alt tiplerinde (T_{CM}, $T_{EM1\text{-}2\text{-}3}$ ve T_{EMRA}) gözlenen medyan frekans benzerliği, aşı kaynaklı bağışıklığın hücresel düzeyde en az doğal enfeksiyon kadar sağlam bir zemin oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, aşı stratejilerinin sadece antikor

düzeylerini artırmakla kalmayıp, hücresel düzeyde de enfeksiyon geçirmiş bireylerle yarışır seviyede, dayanıklı ve stabil bir CD8+ T hücresi belleği oluşturduğunu göstermesi açısından klinik açıdan bir öneme sahiptir.

Hibrit bağışıklık, Wt(+), ve sadece aşı kaynaklı bağışıklık, Wt(-), grupları arasında S^{WT} yanıtları açısından saptanan benzerliğin aksine, Omicron (S^{O}) varyantına özgü yanıtlarda dikkate değer bir eğilim gözlenmiştir. Daha önce wild type spike antijenine doğal bağışıklık yoluyla maruz kalmamış olan Wt(-) grubunda, Omicron varyantına özgü merkezi bellek (T_{CM}) ve efektör bellek (T_{EM}) hücre tiplerinin yanıtlarının, enfeksiyon geçirmiş Wt(+) grubuna göre sayısal olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmamızın bulguları, bireylerin SARS-CoV-2 ile ilk karşılaşma biçiminin, varyantlara karşı geliştirilen hücresel yanıtın esnekliğini belirlediğini ortaya koymaktadır. Özellikle wild type enfeksiyon geçmişi olan bireylerde, Omicron varyantına özgü gelişen yeni (de novo) T hücresi yanıtlarının, mevcut bellek havuzunun ilk karşılaşılan antijenik yapıya olan önceliği nedeniyle görece sınırlanmış olabileceği değerlendirilmektedir.Verilerimiz, CD8+ T hücresi düzeyinde OAS etkisinin antikorlar kadar kısıtlayıcı olmadığını, ancak antijenle ilk karşılaşma türünün bellek havuzunun esnekliği üzerinde belirleyici bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Lineer farklılaşma modeli, aktive olan naif CD8+ T hücrelerinin antijenik uyarı ve sitokinlerin etkisiyle belirli bir hiyerarşi içinde farklılaştığını savunur. Bu model uyarınca hücreler sırasıyla merkezi bellek (T_{CM}), efektör bellek (T_{EM}) ve son olarak terminal farklılaşmış efektör bellek (T_{EMRA}) hücrelerine dönüşür (110). Naif CD8+ T hücreleri, aktive olmuş APC karşılaştıklarında blastogenez ve proliferasyon (hızlı çoğalma) sürecine girerler. Bu aktivasyon, hem efektör hem de bellek hücre oluşumuyla sonuçlanan dinamik bir farklılaşma sürecini tetikler. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrası gelişen hücresel bağışıklıkta uzun süreli bellek oluşumu ve fenotipik özellikler kritik bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar, SARS-CoV-2'ye özgü CD8+ T hücrelerinin enfeksiyondan sonra bir yılı aşkın süre boyunca varlığını sürdürebildiğini göstermektedir. Bu hücreler, uzun ömürlü bellek hücrelerini zamanla azalan hücrelerden ayıran belirgin bir transkripsiyonel imza taşımaktadır. SARS-CoV-2 enfeksiyonuna yönelik yürütülen çalışmalar, enfeksiyon sonrası gelişen uzun ömürlü bellek CD8+ T hücrelerinin karakteristik olarak CD45RA ve CD127

ekspresyonu sergilediğini ve fenotipik açıdan T_{EMRA} hücrelerine benzediğini ortaya koymaktadır. Adamo ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen araştırma, kısa ömürlü hücreler ile uzun süre hayatta kalan bellek T hücrelerini birbirinden ayıran özgün transkripsiyonel imzalar tanımlamış olsa da; T_{CM}, T_{EM1}, T_{EM2} veya T_{EM3} gibi alt gruplara dair ayrıntılı bir detaylandırma sunmamıştır. (111). Fenotipik analizler ise bu hücrelerin, enfeksiyonun kontrol altına alınması için temel teşkil eden güçlü yardımcı fonksiyonlar ve yüksek proliferasyon (çoğalma) kapasitesi sergilediğini ortaya koymaktadır (112). Neidleman ve ark. (2020), SARS-CoV-2'ye özgü CD8+ T hücrelerinin ağırlıklı olarak T_{EMRA} formunda olduğunu, ancak bu hücrelerin tipik T_{EMRA} hücrelerine kıyasla daha az terminal farklılaşma gösterdiğini saptamıştır. Bu bulgular, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun ardından gelişen T hücresi bağışıklığının, virüsün kontrol altına alınmasında etkili olan güçlü bir bellek ve uzun ömürlü bir koruma potansiyeline sahip olduğunu desteklemektedir. Bu özellikler, virüsle yeniden karşılaşıldığında bağışıklık sisteminin hızlı ve etkili bir yanıt vermesini sağlayan hücresel hafızanın temelini oluşturmaktadır.

Analizlerimiz, çalışma gruplarındaki, Wt(+) ve Wt(-), SARS-CoV-2 spesifik CD8+ T hücrelerinin, çoğunlukla "resting" (dinlenme) halindeki merkezi bellek (T_{CM}) fenotipinden ziyade, hızlı antiviral fonksiyon gösterme potansiyeline sahip geç efektör bellek T_{EM3} ve terminal efektör T_{EMRA} aşamalarında kümelendiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgu, mevcut T hücresi havuzunun antijenle karşılaştığında hızla sitotoksik yanıt verme kapasitesinin yüksek olduğunu, ancak proliferatif kapasitesi yüksek olan kök-benzeri (stem-like) hafıza havuzunun oransal olarak daha az yer kapladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, mevcut çalışmada kullanılan immünofenotiplendirme paneli, doğrudan kök hücre-benzeri bellek T hücresi (T_{SCM}) alt grubunu tanımlayan spesifik yüzey belirteçlerini (örneğin; CD95, CD122, TCF-1) içermemektedir. Dolayısıyla, T_{CM} frekansındaki bu göreceli düşüşün ve belirgin efektör dominansının, uzun süreli immüniteyi besleyen T_{SCM} havuzundaki bir daralmayı işaret etme ihtimali güçlü bir hipotez olarak karşımıza çıkmaktadır. SARS-CoV-2 spesifik bellek havuzunun rejeneratif (yenilenme) kapasitesini ve uzun vadeli kalıcılığını (longevity) tam olarak aydınlatabilmek adına, ilerleyen çalışmalarda bu spesifik belirteçlerin de dahil edildiği daha geniş kapsamlı analizlerin yapılması gerekmektedir.

Dan ve arkadaşları (2021), enfeksiyondan 8 ay sonrasına kadar izledikleri SARS-CoV-2 hafızasında, CD8+ T hücrelerinin büyük oranda T_{EMRA} ve T_{EM} fenotipine yöneldiğini, buna karşın CD4+ T hücrelerinin dolaşımda ağırlıklı olarak T_{CM} ve T_{EM1} formunda kaldığını bildirmişlerdir (113). Benzer şekilde, Sette ve Crotty (2021) tarafından yapılan derlemede, virüse karşı gelişen ideal hücresel yanıtın, lenfoid organlarda konumlanarak B hücrelerine yardım (B-cell help) sinyalleri gönderecek ve yüksek proliferasyon kapasitesini koruyacak "uzun ömürlü" bir CD4+ T_{CM} rezervuarına dayandığı vurgulanmıştır (114).

Çalışma gruplarımızda gözlemlediğimiz bu diferansiyel dağılım, konağın bağışıklık sisteminde stratejik bir immünolojik iş bölümünün başarıyla kurulduğunu kanıtlamaktadır. CD8+ T hücrelerinin ağırlıklı olarak sitotoksik kapasiteyi barındıran T_{EM3} ve T_{EMRA} evrelerinde bulunması, olası bir viral re-enfeksiyon durumunda mukozal ve sistemik bölgelerde hızlı bir sitotoksik bariyer oluşturarak virüs temizlenmesini sağlayacaktır (115). CD4+ T hücrelerinin ise "dinlenme" (resting) halindeki T_{CM} profilinde bulunması, bu hücrelerin antijenik uyarım anında tükenmişlik (exhaustion) yaşamadan hızla klonal ekspansiyona uğramasına, CD8+ hücreleri için gerekli olan sitokin (özellikle IL-2) desteğini sağlamasına ve foliküler yardımcı T hücre (Tfh) farklılaşması yoluyla nötralizan antikor titrelerini yeniden yükseltmesine (anamnestik yanıt) olanak tanıyacaktır (116).

Çalışmamızda SARS-CoV-2 spesifik bellek yanıtı incelendiğinde, CD8+ T hücre havuzunda ileri derecede farklılaşmış efektör bellek (T_{EM3}) ve terminal efektör (T_{EMRA}) fenotiplerinin baskınlığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bir parçası olarak, aynı çalışma grubuyla yapılan bir diğer çalışmada ise CD4+ T hücre bellek popülasyonları detaylı bir şekilde incelenmiş ve CD4+ T hücre havuzunda merkezi bellek (T_{CM}) popülasyonunun dominant olduğu ve T_{EMRA} hücre popülasyonunun ise en düşük frekans gösterdiği bulunmuştur (117). T hücresi alt grupları arasında görülen bu fenotipik farklılık, literatürdeki geniş kapsamlı SARS-CoV-2 immünolojik hafıza çalışmalarıyla güçlü bir benzerlik göstermektedir.

Çalışma grubunda gözlemlenen CD4+ ve CD8+ bellek T hücre dağılımı, Jung ve ark. (2021) tarafından COVID-19 konvalesan hastalarla yapılan uzun dönem (10 ay) immünofenotiplendirme çalışmasının bulgularıyla benzerlik göstermektedir (116). Jung ve ark., CD4+ T hücre havuzunda T_{CM} fenotipinin (%50) baskın olduğunu ve T_{EMRA}

oranının ise %5'in altında çok minör bir popülasyon olarak kaldığını, buna karşın CD8+ T hücrelerinde T_{CM} frekansının zamanla düştüğünü, T_{EM} (%50) ve T_{EMRA} (%25) fenotiplerinin ise dominant hale geldiğini bildirmişlerdir. Kendi bulgularımızdaki CD8+ efektör dominansı ve CD4+ merkezi bellek dominansı bu verilerle birebir örtüşmektedir.

Daha da önemlisi, Jung ve ark.'nın çalışması, mevcut araştırmamızda bir limitasyonu olarak belirtilen kök hücre-benzeri bellek T hücrelerinin (T_{SCM}) önemini aydınlatmaktadır. İlgili çalışmada, fenotipik olarak naif hücrelere benzeyen (CD45RA+CCR7+) popülasyonun aslında yüksek oranda CD95 eksprese eden ve kendi kendini yenileme (self-renewal) kapasitesi yüksek T_{SCM} hücreleri olduğu, bu hücrelerin enfeksiyondan 120 gün sonra stabilize olarak immün havuzda yerini aldığı kanıtlanmıştır (116). Aşılamanın da kök hücre bellek fenotipine sahip dayanıklı T hücreleri indüklediği görülmüştür (118).

Bu çalışma kapsamında değerlendirilen hücresel yanıtlar, viral evrimin getirdiği yapısal değişikliklere rağmen bellek T hücrelerinin varyantlar arası çapraz tanıma yeteneğini koruduğunu göstermektedir. Özellikle T_{CM} hücrelerinin Omicron spike peptidlerine karşı gösterdiği güçlü aktivasyon, hücresel belleğin proliferatif kapasitesinin varyantlar karşısında dirençli olduğunu kanıtlamaktadır. Orijinal Antijenik Sin çerçevesinde değerlendirildiğinde, daha önceki antijenik maruziyetlerin bellek havuzunu şekillendirdiği, ancak CD8+ T hücrelerinin epitop çeşitliliği sayesinde varyantlarda meydana gelen mutasyonlardan antikor yanıtlarına kıyasla daha az etkilendiği ve koruyucu sitotoksik aktiviteyi sürdürdüğü saptanmıştır.

Merkezi bellek hücreleri, Omicron varyantına karşı Wild type'a kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek aktivasyon göstermiştir. Bu çalışmayla, Spike peptidlerinin merkezi bellek ve efektör bellek CD8+ T hücrelerini etkili şekilde aktive ettiğini ve bellek hücre alt popülasyonunun varyantlara karşı çapraz reaktivite potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. T hücresi tepkilerinin çapraz tanıma yeteneği kritik bir faktör olarak vurgulanmaktadır. Bu çalışmanın bulgularına göre, korelasyon analizlerinde S^{WT} ve S^{O} yanıtları arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki bulunması (r=0,5303), wild type antijenine karşı gelişen yanıtın varyantları da tanıdığını, yani çapraz reaktivitenin varlığını deneysel olarak ortaya koymaktadır.

Ayrıca bu çalışmada, Spike wild type suşu ve Omicron varyantına karşı oluşan bellek T hücresi yanıtlarının değerlendirilmesine aktivasyon belirteçlerinin (CD69,

CD137) dahil edilmesiyle aktive olabilen CD8+ T hücre yanıtlarını ve bellek yanıtlarının birlikte ölçülmesi, T hücrelerinin yalnızca varlığını değil, aynı zamanda antijenle yeniden karşılaştıklarında ne kadar aktif hale geldiklerini ve fonksiyonelliğini de ortaya koymaktadır ve bağışıklık yanıtının kalitesini değerlendirmek açısından önemlidir. Ek olarak, S ve Omicron varyantlarına özgü aktivasyon profillerinin karşılaştırılması, varyantlara karşı gelişen çapraz reaktif veya özgül T hücresi yanıtlarının farklılıklarını ortaya koymuştur. Bu yaklaşım, enfeksiyon ve aşılanma sırasının bağışıklık üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı biçimde anlamamıza olanak tanıyarak, polifonksiyonel T hücresi yanıtlarının belirlenmesini ve koruyucu bağışıklığın niteliğinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesini sağlayabilir.

Omicron BA.1 varyantına karşı T hücresi yanıtlarının genel olarak hem aşılanmış hem de konvalesan bireylerde korunduğu, ancak bazen konvalesan bireylerde aşılanmış bireylere göre daha yüksek IFN-γ+ T hücresi sıklığı gözlemlendiği rapor edilmiştir (119). Bu durum, enfeksiyon ve aşı ile indüklenen T hücresi epitop repertuvarları arasında farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir.

Bir çalışmada, genel olarak, doğal enfeksiyon, atılım (breakthrough) enfeksiyonları ve aşılamanın tamamı, yüksek sitotoksik ve kalıcı hücresel belleğe sahip güçlü T hücresi belleği oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, antijen maruziyetinin (aşı/enfeksiyon) kaynağı farklı olsa da, epitop-spesifik CD8+ T hücreleri toplam sıklığı tüm gruplarda benzer bulunmuştur (104).

BA.2.86 gibi aşırı mutasyon biriktirmiş varyantlara karşı gelişen T hücresi yanıtları, nötralizan antikorların yaşadığı önemli ölçüde kaçışa rağmen genellikle korunma eğilimindedir. Literatürde bu durumun temel nedeni olarak, T hücresi epitoplarının, antikorların birincil hedefi olan Spike proteini reseptör bağlanma alanına kıyasla daha yüksek düzeyde korunmuş olması gösterilmektedir (103). Nitekim Sette ve arkadaşları (2024) (120), SARS-CoV-2'ye özgü CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtlarının tüm antijenler bazında sırasıyla %72 ve %89 oranında korunduğunu; sadece Spike proteini özelinde ise bu oranların BA.2.86 için sırasıyla %56 ve %72 seviyelerinde kaldığını bildirmiştir. Spike epitopları mutasyona uğrasa dahi, büyük bir kısmının (%96 CD4+, %62 CD8+) rapor edilen HLA-kısıtlayıcı allellere bağlanma kapasitesini sürdürdüğü bilinmektedir.

Çalışmamızın hesaplamalı biyoloji analizleri, bu literatür bilgisini destekler nitelikte sonuçlar ortaya koymuştur. Omicron varyantlarında, Wild type Spike proteinine özgü HLA-kısıtlı epitopların büyük oranda korunduğu ve bağlanma afinitelerinin ("binding affinity") %100'e yakın oranda değişmeden kaldığı saptanmıştır (Şekil 4.15). Ancak analizlerimiz, literatürdeki genel korunum bilgisinin ötesine geçerek, varyantların evrimsel sürecinde T hücresi kaçışının dinamik yapısını ortaya koymuştur. Özellikle yeni ortaya çıkan Omicron alt varyantlarında (NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC), WT Spike epitop kaybının ("epitope loss"), daha önceki varyantlara kıyasla belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. Virüs, OAS nedeniyle bağışıklık sisteminin sürekli saldırdığı "eski" bölgeleri mutasyona uğratarak (kaybederek) bu baskıdan kaçmaktadır. Yeni varyantlardaki artan kayıp, OAS temelli korumanın zamanla aşınabileceğini öngörmektedir.

Bu bağlamda çalışmamız, önceki varyantlara karşı geliştirilmiş T hücresi yanıtlarının güncel varyantlar karşısındaki etkinliğini değerlendirmek adına kritik bir ayrımı ortaya koymaktadır. Hesaplamalı analizlerimizde en az epitop kaybı JN.1 varyantında (~193 epitop) gözlemlenirken; LP.8.1 (~248), XEC (~232) ve NB.1.8.1 (~220) varyantlarında bu kaybın sayısal olarak arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.19A).

Daha da önemlisi, çalışmamızın özgün bir bulgusu olarak; JN.1 ve BA.2.86 gibi görece erken Omicron alt varyantlarında ve wild type suşta (Ancestral) korunan belirli "çekirdek" epitop-HLA çiftlerinin, daha yeni varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) eş zamanlı olarak kaybolduğu saptanmıştır (Şekil 4.20). Bu bulgu, virüsün sadece antikor baskısından değil, aynı zamanda T hücresi baskısından da kaçmak adına evrimsel bir yönelim içinde olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, T hücresi yanıtı genel hatlarıyla dirençli olsa da, yeni varyantların epitop profillerindeki bu kademeli erozyon, T hücrelerinin yeni varyantları tanıma ve hedefleme kapasitesinde kısmi ancak stratejik bir azalmaya işaret edebilir

Orijinal Antijenik Sin, yeni bir varyanta maruz kalındığında, bellek yanıtının önceki maruziyetlerden kaynaklanan çapraz reaktif veya paylaşılan epitopları hedefleme eğilimini ifade eder. Bu durum, yeni varyanta özgü neoepitoplara karşı daha az güçlü bir yanıtla sonuçlanabilir. OAS, bir varyant virüs için rekabet avantajı sağlayarak, homolog zorlamaya veya birincil maruziyete kıyasla daha az etkili bir bağışıklık yanıtına yol açabilir (121).

Hesaplamalı biyoloji analizlerimiz, epitop kayıplarının rastgele olmadığını, virüsün en hayati bölgelerini korumaya çalıştığını ortaya koymuştur. Epitop kayıplarının, Spike proteininin özellikle RBD ve NTD bölgelerinde yoğunlaştığı çalışmamızda haritalandırılmıştır. RBD, nötralizan antikorların ana hedefiyken, bulgularımıza göre, virüsün bu bölgede sadece antikorlardan değil, aynı zamanda T hücrelerinden de kaçmak için yoğun bir evrimsel baskı altında olduğunu göstermektedir. Bu duruma göre, OAS'nin odaklandığı ana hedeflerde T hücre epitoplarınnın da detaylı incelemek yer almalıdır.

Çalışmamızda, HLA-A lokusunun, HLA-B'ye kıyasla varyantlar arasında daha fazla sayıda korunmuş epitop sunduğu tespit edilmiştir. HLA-B*35:01 ve HLA-A*32:01 gibi bazı allellerin, varyant ne olursa olsun çok yüksek sayıda epitop sunabildiği (süper bağlayıcı) görülmüştür. HLA-A tipi baskın olan veya "süper bağlayıcı" allellere sahip bireyler, OAS fenomeninden (epitop kaybından) daha az etkilenebilir çünkü virüs ne kadar değişirse değişsin, bu alleller sürekli olarak sunacak "eski" bir epitop bulabilmektedir.

Çapraz reaktif immün hücrelerin tercihli olarak artırılması derecesi, maruziyetin sırasına ve tipine (aşılama veya hafif/şiddetli enfeksiyon) ve farklı suşlar arasındaki antijenik farklılığa bağlı olarak değişir. CD8+ T hücreleri için, bellek yanıtının yeniden hatırlanması ve gecikmiş bir de novo (yeni) yanıt oluşabilir. Çünkü insan bellek CD8+ T hücreleri, naif CD8+ hücre popülasyonlarına kıyasla daha yüksek bir immünolojik sinaps eğilimine sahiptir. Bu durum, bellek CD8+ T hücrelerine naif CD8+ T hücrelerine karşı rekabet avantajı sağlar. Önemli olarak, bellek ve naif fenotipler arasındaki bu fark ne insan CD4+ T hücrelerinde ne de fare (murine) T hücrelerinde gözlemlenmektedir (121). Çalışmamızın bulguları, wild-type enfeksiyon geçmişi doğal bağışıklık yoluyla olmayan bireylerde (Wt-), Omicron varyantına özgü bellek CD8+ T hücresi yanıtlarının, enfeksiyon geçirmiş bireylere (Wt+) kıyasla sayısal olarak daha yüksek olma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Bu durum, bağışıklık sisteminin ilk karşılaştığı antijenik yapıya (wild type spike) olan eğilimi nedeniyle, yeni varyant epitoplarına karşı gelişecek de novo yanıtların görece baskılanabileceği hipotezini desteklemektedir. Literatürde OAS veya immünolojik imprinting olarak tanımlanan bu olgu, $CD8^+$ T hücre repertuvarının esnekliğinin,

bireyin ilk antijenik maruziyeti tarafından şekillendirilebileceğine dair önemli bir kanıt sunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen veriler, SARS-CoV-2 spesifik CD8+ T hücresi yanıtlarının, virüsün geçirdiği yoğun mutasyonlara rağmen hem doğal enfeksiyon geçirmiş (Wt+) hem de geçirmemiş (Wt-) bireylerde oldukça korunmuş ve fonksiyonel olduğunu göstermektedir. Özellikle Omicron (S^O) varyantına karşı saptanan güçlü hücresel yanıtlar, literatürde antikorlar için tanımlanan "immün kaçış" olgusunun T hücreleri için geçerli olmadığını göstermektedir. Verilerimiz, wild type enfeksiyon geçmişi olan Wt(+) grupta, Omicron yanıtlarının baskılanmadığını; aksine her iki grupta da S^O yanıtlarının güçlü bir şekilde korunduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın temel bulgularından biri, her iki grupta da S^O stimülasyonunun, S^{WT} uyarımına kıyasla özellikle merkezi bellek (T_{CM}) ve efektör bellek (T_{EM}) havuzlarında istatistiksel olarak daha yüksek veya benzer frekanslar indüklemesidir. Bu durum, Tarke ve ark. (2022) (122) ile Redd ve ark. (2022) (123) tarafından yapılan ve Omicron varyantındaki mutasyonların T hücresi epitoplarının %80'inden fazlasını etkilemediğini gösteren çalışmalarla tam bir uyum içerisindedir. S^O stimülasyonunun S^{WT}'den daha yüksek yanıtlar tetiklemesi, varyantın sahip olduğu mutasyonların bazı bireylerde yeni ve daha "immunojenik" epitoplar yaratmış olabileceği hipoteziyle açıklanabilir.

Çalışmamızda, katılımcıların çoğunluğunu 9 ay veya daha uzun süre önce Omicron varyantı ile enfekte olmuş bireyler oluşturmaktadır. Bu sayede, peptit stimülasyonu ile aktive olabilen bellek CD8+ T hücrelerinin yanıtlarının korunduğunu ve uzun süreli bellek CD8+ T hücrelerinin varlığını gösterdik. Ayrıca, wild type Spike'a karşı T hücre yanıtlarının hâlâ tespit edilebildiğini gözlemledik. Özellikle Wt(-) olarak tanımlanan grupta dahi yüksek düzeyde S^{WT} yanıtı saptanması, Omicron enfeksiyonunun çapraz reaktif bir bağışıklık yanıtı oluşturduğunu düşündürmektedir. Wt(+) ve Wt(-) grupları karşılaştırıldığında, statistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, Wt(-) grubunda sayısal olarak daha yüksek bir eğilim gözlenmiştir. Wt(-) gruplarda benzer veya daha yüksek düzeyde Spike WT (S^{WT}) yanıtı gözlemlenmesi, Omicron enfeksiyonunun Wt'ye özgü bağışıklık yanıtını baskılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Bu proje, Türkiye'deki COVID-19 konvalesan bireylerde SARS-CoV-2'ye karşı gelişen bellek CD8+ T hücre yanıtlarını detaylı biçimde analiz ederek, hem deneysel hem de hesaplamalı yaklaşımları bir araya getirmiştir. Elde edilen bulgular, önceki enfeksiyonun bağışıklık yanıtının şekillenmesinde belirleyici olduğunu ve bu etkinin OAS fenomeniyle bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır.

Omicron varyantlarının, wild type spike epitoplarına göre tanınmayan epitopların sayısının artmasına yol açtığı ve bu nedenle T hücre düzeyinde bağışıklık kaçışının mümkün olabileceği gösterilmiştir. Özellikle yeni varyantların, daha önce edinilmiş T hücre yanıtlarını etkisizleştirme potansiyeli taşıdığı gösterilmiştir. Bu bağlamda, mevcut aşıların yalnızca antikor değil, T hücresi düzeyinde de yeterli koruyuculuk sağlayıp sağlamadığı tartışmalıdır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez çalışması kapsamında, yüksek sayıda katılımcıdan oluşan bir kohort oluşturularak elde edilen immünolojik verilerin istatistiksel gücü ve güvenilirliği maksimize edilmiştir. Çalışmamız, Omicron varyantına özgü bellek CD8+ T hücresi yanıtlarının varlığını ve çapraz reaktivite potansiyelini ortaya koymuş olsa da, hücresel bağışıklığın dinamik doğası gereği, bu yanıtların kalıcılığını (durability) ve zaman içindeki evrimini izleyebilmek adına yürütülen bu çalışma kesitsel (cross-sectional) bir nitelik taşımaktadır. Çalışmanın üç yıllık bir süreci kapsayan prospektif ve uzun dönemli (longitudinal) bir kohort olarak tasarlanamamış olması ve verilerin tek bir zaman noktasından (single time-point) elde edilmesi, bellek hücrelerinin bireysel bazdaki kinetik değişimlerinin izlenmesini sınırlandırmıştır. Ayrıca, pandeminin ilerleyen aşamalarında toplumun büyük çoğunluğunun enfeksiyon veya aşılama yoluyla virüsle karşılaşmış olması nedeniyle, "immunologically naive" (virüsle hiç karşılaşmamış) sağlıklı kontrol grubunun oluşturulamaması bir diğer kısıtlılıktır. Ek olarak, analizlerimiz sadece Spike (S) proteinine odaklanmış olup, nükleokapsid (N), membran (M) ve zarf (E) gibi diğer yapısal proteinlere karşı gelişen T hücresi yanıtları bu çalışma kapsamında değerlendirilmemiştir. Bunlara ek olarak, çalışmamızın bir diğer önemli kısıtlılığı, katılımcıların serumlarında nötralizan antikor (nAb) düzeylerinin ölçülmemiş olmasıdır. Her ne kadar çalışmamızın temel odağı 'hücresel bağışıklık' olsa da, nötralizan antikorlar virüsün hücreye girişini engelleyen ilk savunma hattını oluşturmaktadır. Nötralizan antikor verilerinin eksikliği, saptadığımız güçlü CD8+ T hücre yanıtları ile hümoral bağışıklık arasındaki olası korelasyonun veya 'hümoral kaçışa rağmen korunan hücresel yanıt' dengesinin (immune decoupling) analiz edilmesini sınırlandırmıştır. Gelecekteki çalışmalarda, özellikle Omicron gibi antikorlardan kaçan varyantlara karşı hücresel yanıtın etkinliğini tam olarak belirlemek adına, ACE2-RBD inhibisyon testleri veya pseudovirüs nötralizasyon biyotahlilleri (VNT) gibi fonksiyonel antikor ölçümlerinin sürece dahil edilmesi önerilmektedir

Gelecek çalışmalarda, T hücrelerinin sadece fenotipik aktivasyonunu değil, aynı zamanda fonksiyonel kalitesini (polifonksiyonellik) derinlemesine analiz etmek amacıyla metodolojik çeşitliliğe gidilmelidir. Bu kapsamda, Aktivasyon ile

İndüklenen Belirteç (AIM) testleri, hücrelerin antijenle karşılaştığında yüzeyde eksprese ettiği OX40 (CD134), CD25, CD137 (4-1BB) ve CD154 (CD40L) gibi belirteçlerin analizi, hücrelerin "uyarılabilirliğini" göstermek açısından kritiktir. AIM testleri, sitokin üretiminden bağımsız olarak tüm antijen-spesifik T hücre popülasyonunu (özellikle düşük sitokin üreten bellek hücrelerini) saptamamıza olanak tanır.

Efektör fonksiyonları gösteren hücre içi sitokin boyama (ICS) testi, hücrelerin efektör kapasitesini ölçmek için Th1/Tc1 yolağına ait sitokinler (özellikle IFN-γ, TNF-α ve IL-2) ile sitotoksik degranülasyon markeri olan CD107a entegre edilmelidir. Polifonksiyonellik analizi (aynı anda birden fazla sitokin üreten hücrelerin oranı), bağışıklığın kalitesi ve enfeksiyondan korunma düzeyi ile doğrudan ilişkilidir.

Antiviral kapasiteyi ölçen IFN-γ ELISpot, moleküler düzeyde tek bir hücrenin salgıladığı sitokin miktarını ölçen bu yöntem, flow sitometrisinden daha yüksek bir hassasiyete (sensitivity) sahiptir. ELISpot, özellikle nadir bulunan bellek hücrelerinin (rare populations) frekansını saptamak ve hücresel yanıtın "büyüklüğünü" (magnitude) moleküler düzeyde doğrulamak için altın standarttır. Ayrıca rejeneratif kapasiteyi gösteren lenfosit proliferasyon analizlerinin entegre edildiği çok parametreli bir yaklaşım benimsenmelidir. Bu sayede virüs-spesifik T hücrelerinin "niceliği" kadar "niteliği" de değerlendirilebilecektir.

SARS-CoV-2'nin hızlı mutasyon oranı ve toplumdaki bağışıklık geçmişinin heterojenliği (farklı aşı platformları, hibrit bağışıklık ve tekrar-enfeksiyon sayıları) göz önüne alındığında, katılımcıların daha spesifik alt gruplara (stratifikasyon) ayrılarak incelenmesi ve analizlere güncel varyantları temsil eden genişletilmiş peptit havuzlarının dahil edilmesi, immün kaçış mekanizmalarının ve Orijinal Antijenik Sin etkisinin daha net anlaşılmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızın hesaplamalı biyoloji analizlerinde *in silico* yöntemlerle öngörülen, varyantlar arası yüksek korunum ve bağlanma afinitesi gösteren potansiyel epitopların deneysel validasyonu kritik bir sonraki adımdır. Bu amaçla, MHC-tetramer boyama teknolojileri ve yüksek çözünürlüklü HLA sekanslama yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir. Bu ileri teknikler, popülasyona özgü

HLA-kısıtlı immünodominant epitopların kesin olarak tanımlanmasına (epitop haritalama) olanak tanıyacaktır.

Çalışmamızın *in silico* analiz aşamasında elde edilen en çarpıcı bulgulardan biri, belirli HLA allellerinin tüm varyantlar genelinde sergilediği yüksek sunum kapasitesidir. Özellikle HLA-B*35:01, HLA-A*32:01, HLA-B*53:01 ve HLA-A*26:01 allelleri, hem Wild-type hem de Omicron dahil tüm varyant spektrumunda en yüksek sayıda 'özgün ve güçlü bağlayıcı' (strong binder) epitopu sunan alleller olarak öne çıkmıştır. Bu durum, bu HLA allellerinin varyant mutasyonlarından minimal düzeyde etkilenen, 'immünodominant' ve 'promiscuous' (çoklu bağlayıcı) bir profil sergilediğini kanıtlamaktadır. Bu alleller arasında, özellikle toplumda yaygın görülen ve analizlerimizde en yüksek epitop sunum kapasitesine sahip olduğu saptanan HLA-B*35 alleli, gelecekteki çalışmalarımızın odak noktasını oluşturacaktır. Bu bağlamda, HLA-B*35 taşıyıcısı olan bireylerde bu özgün epitopların *ex vivo* koşullarda (MHC-Tetramer boyama veya ELISpot ile) doğrulanması, varyanttan bağımsız koruyucu bağışıklığın moleküler temellerini anlamamızı sağlayacaktır. Bu allellere özgü yüksek afiniteli epitopların tanımlanması, sadece akademik bir veri sunmakla kalmayacak, aynı zamanda popülasyon genetiğine dayalı, mutasyonlara dirençli rasyonel aşı tasarımları için hedef bölgeleri (target regions) belirleyecektir.

Sonuç olarak, bu tür bütünleşik (deneysel ve hesaplamalı) çalışmalar, HLA genotiplerine dayalı bireysel bağışıklık varyasyonlarının belirlenmesini sağlayacak ve özellikle immün yetmezliği olan risk grupları için HLA uyumlu veya epitop-zengin (epitope-based) yeni nesil rasyonel aşı tasarımlarının geliştirilmesine bilimsel zemin oluşturacaktır.

KAYNAKLAR

1. Li, C., Zhan, W., Yang, Z., Tu, C., Hu, G., Zhang, X., Song, W., Du, S., Zhu, Y., Huang, K., Kong, Y., Zhang, M., Mao, Q., Gu, X., Zhang, Y., Xie, Y., Deng, Q., Song, Y., Chen, Z., … Ying, T. (2022). Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody. *Cell*, *185*(8). https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.009

2. Piccoli, L., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Czudnochowski, N., Walls, A. C., Beltramello, M., Silacci-Fregni, C., Pinto, D., Rosen, L. E., Bowen, J. E., Acton, O. J., Jaconi, S., Guarino, B., Minola, A., Zatta, F., Sprugasci, N., Bassi, J., Peter, A., De Marco, A., … Veesler, D. (2020). Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology. *Cell*, *183*(4). https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037

3. Michel, C. J., Mayer, C., Poch, O., & Thompson, J. D. (2020). Characterization of accessory genes in coronavirus genomes. *Virology Journal*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/s12985-020-01402-1

4. Gao, Q., Bao, L., Mao, H., Wang, L., Xu, K., Yang, M., Li, Y., Zhu, L., Wang, N., Lv, Z., Gao, H., Ge, X., Kan, B., Hu, Y., Liu, J., Cai, F., Jiang, D., Yin, Y., Qin, C., … Qin, C. (2020). Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, *369*(6499). https://doi.org/10.1126/science.abc1932

5. Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, *581*(7807). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5

6. Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F. W., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K. Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., … Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, *584*(7821). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7

7. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Lavine, C. L., Rawson, S., Peng, H., Zhu, H., Anand, K., Tong, P., Gautam, A., Lu, S., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Rits-Volloch, S., Lu, J., Wesemann, D. R., Yang, W., Seaman, M. S., & Chen, B. (2021). Structural basis for enhanced infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 variants. *Science*, *373*(6555). https://doi.org/10.1126/science.abi9745

8. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2). https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052

9. Shah, M., & Woo, H. G. (2022). Omicron: A Heavily Mutated SARS-CoV-2 Variant Exhibits Stronger Binding to ACE2 and Potently Escapes Approved COVID-19 Therapeutic Antibodies. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.830527

10. Liu, Y., Liu, J., Plante, K. S., Plante, J. A., Xie, X., Zhang, X., Ku, Z., An, Z., Scharton, D., Schindewolf, C., Widen, S. G., Menachery, V. D., Shi, P. Y., & Weaver, S. C. (2022). The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature*, *602*(7896). https://doi.org/10.1038/s41586-021-04245-0

11. Nunes, D. R., Braconi, C. T., Ludwig-Begall, L. F., Arns, C. W., & Durães-Carvalho, R. (2022). Deep phylogenetic-based clustering analysis uncovers new and shared mutations in SARS-CoV-2 variants as a result of directional and convergent evolution. *PLoS ONE*, *17*(5 May). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268389

12. Liu, H., Wei, P., Kappler, J. W., Marrack, P., & Zhang, G. (2022). SARS-CoV-2 Variants of Concern and Variants of Interest Receptor Binding Domain Mutations and Virus Infectivity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.825256

13. Faria, N. R., Mellan, T. A., Whittaker, C., Claro, I. M., Candido, D. D. S., Mishra, S., Crispim, M. A. E., Sales, F. C. S., Hawryluk, I., McCrone, J. T., Hulswit, R. J. G., Franco, L. A. M., Ramundo, M. S., De Jesus, J. G., Andrade, P. S., Coletti, T. M., Ferreira, G. M., Silva, C. A. M., Manuli, E. R., … Sabino, E. C. (2021). Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. *Science*, *372*(6544). https://doi.org/10.1126/science.abh2644

14. Hassan, A. O., Kafai, N. M., Dmitriev, I. P., Fox, J. M., Smith, B. K., Harvey, I. B., Chen, R. E., Winkler, E. S., Wessel, A. W., Case, J. B., Kashentseva, E., McCune, B. T., Bailey, A. L., Zhao, H., VanBlargan, L. A., Dai, Y. N., Ma, M., Adams, L. J., Shrihari, S., … Diamond, M. S. (2020). A Single-Dose Intranasal ChAd Vaccine Protects Upper and Lower Respiratory Tracts against SARS-CoV-2. *Cell*, *183*(1). https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.026

15. Mariotti, S., Capocefalo, A., Chiantore, M. V., Iacobino, A., Teloni, R., De Angelis, M. L., Gallinaro,

A., Pirillo, M. F., Borghi, M., Canitano, A., Michelini, Z., Baggieri, M., Marchi, A., Bucci, P., McKay, P. F., Acchioni, C., Sandini, S., Sgarbanti, M., Tosini, F., … Nisini, R. (2021). Isolation and Characterization of Mouse Monoclonal Antibodies That Neutralize SARS-CoV-2 and Its Variants of Concern Alpha, Beta, Gamma and Delta by Binding Conformational Epitopes of Glycosylated RBD With High Potency. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.750386
16. Bayarri-Olmos, R., Sutta, A., Rosbjerg, A., Mortensen, M. M., Helgstrand, C., Nielsen, P. F., Pérez-Alós, L., González-García, B., Johnsen, L. B., Matthiesen, F., Egebjerg, T., Hansen, C. B., Sette, A., Grifoni, A., da Silva Antunes, R., & Garred, P. (2024). Unraveling the impact of SARS-CoV-2 mutations on immunity: insights from innate immune recognition to antibody and T cell responses. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1412873
17. Fomina, D. S., Lebedkina, M. S., Iliukhina, A. A., Kovyrshina, A. V., Shelkov, A. Y., Andreev, S. S., Chernov, A. A., Dolzhikova, I. V., Kruglova, T. S., Andrenova, G. V., Tukhvatulin, A. I., Shcheblyakov, D. V., Karaulov, A. V., Lysenko, M. A., Logunov, D. Y., & Gintsburg, A. L. (2023). Real-world clinical effectiveness of Tixagevimab/Cilgavimab and Regdanvimab monoclonal antibodies for COVID-19 treatment in Omicron variant-dominant period. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1259725
18. Boer, J. C., Pan, Q., Holien, J. K., Nguyen, T. B., Ascher, D. B., & Plebanski, M. (2022). A bias of Asparagine to Lysine mutations in SARS-CoV-2 outside the receptor binding domain affects protein flexibility. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.954435
19. Uraki, R., Halfmann, P. J., Iida, S., Yamayoshi, S., Furusawa, Y., Kiso, M., Ito, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Mine, S., Kuroda, M., Maemura, T., Sakai-Tagawa, Y., Ueki, H., Li, R., Liu, Y., Larson, D., Fukushi, S., Watanabe, S., Maeda, K., … Kawaoka, Y. (2022). Characterization of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 isolates in rodents. *Nature*, *612*(7940). https://doi.org/10.1038/s41586-022-05482-7
20. Wang, W., Jin, Q., Liu, R., Zeng, W., Zhu, P., Li, T., Wang, T., Xiang, H., Zhang, H., Chen, Q., Gao, Y., Lai, Y., Yan, F., Xia, X., Li, J., Wang, X., & Gao, Y. (2024). Virological characteristics of SARS-CoV-2 Omicron BA.5.2.48. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1427284
21. Kim, G. J., Elnaggar, J. H., Varnado, M., Feehan, A. K., Tauzier, D., Rose, R., Lamers, S. L., Sevalia, M., Nicholas, N., Gravois, E., Fort, D., Crabtree, J. S., & Miele, L. (2024). A bioinformatic analysis of T-cell epitope diversity in SARS-CoV-2 variants: association with COVID-19 clinical severity in the United States population. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1357731
22. Pérez, P., Astorgano, D., Albericio, G., Flores, S., Sánchez-Corzo, C., Noriega, M. A., Sánchez-Cordón, P. J., Labiod, N., Delgado, R., Casasnovas, J. M., Esteban, M., & García-Arriaza, J. (2024). MVA-based vaccine candidates expressing SARS-CoV-2 prefusion-stabilized spike proteins of the Wuhan, Beta or Omicron BA.1 variants protect transgenic K18-hACE2 mice against Omicron infection and elicit robust and broad specific humoral and cellular immune responses. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1420304
23. López, D. (2022). Predicted HLA Class I and Class II Epitopes From Licensed Vaccines Are Largely Conserved in New SARS-CoV-2 Omicron Variant of Concern. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.832889
24. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., & Lee, S. S. (2022). A Detailed Overview of Immune Escape, Antibody Escape, Partial Vaccine Escape of SARS-CoV-2 and Their Emerging Variants With Escape Mutations. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.801522
25. Lou, F., Li, M., Pang, Z., Jiang, L., Guan, L., Tian, L., Hu, J., Fan, J., & Fan, H. (2021). Understanding the Secret of SARS-CoV-2 Variants of Concern/Interest and Immune Escape. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744242
26. Hoffmann, M., Krüger, N., Schulz, S., Cossmann, A., Rocha, C., Kempf, A., Nehlmeier, I., Graichen, L., Moldenhauer, A. S., Winkler, M. S., Lier, M., Dopfer-Jablonka, A., Jäck, H. M., Behrens, G. M. N., & Pöhlmann, S. (2022). The Omicron variant is highly resistant against antibody-mediated neutralization: Implications for control of the COVID-19 pandemic. *Cell*, *185*(3). https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.032
27. Chang, X., Liu, X., Martina, B., Zeltins, A., Augusto, G., Vogel, M., Mohsen, M. O., Speiser, D. E., & Bachmann, M. F. (2023). Vaccination using mutated receptor binding domains of SARS-CoV-2: Evidence for partial immune escape but not serotype formation. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1114396
28. Lopes-Ribeiro, Á., Oliveira, P. de M., Retes, H. M., Barbosa-Stancioli, E. F., da Fonseca, F. G., Tsuji, M., & Coelho-dos-Reis, J. G. A. (2023). Surveillance of SARS-CoV-2 immunogenicity: loss of immunodominant HLA-A*02-restricted epitopes that activate CD8+ T cells. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1229712
29. Kombe Kombe, A. J., Biteghe, F. A. N., Ndoutoume, Z. N., & Jin, T. (2022). CD8+ T-cell immune

escape by SARS-CoV-2 variants of concern. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.962079
30. Cao, Y., Yisimayi, A., Jian, F., Song, W., Xiao, T., Wang, L., Du, S., Wang, J., Li, Q., Chen, X., Yu, Y., Wang, P., Zhang, Z., Liu, P., An, R., Hao, X., Wang, Y., Wang, J., Feng, R., … Xie, X. S. (2022). BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*, *608*(7923). https://doi.org/10.1038/s41586-022-04980-y
31. Shafqat, A., Omer, M. H., Ahmad, O., Niaz, M., Abdulkader, H. S., Shafqat, S., Mushtaq, A. H., Shaik, A., Elshaer, A. N., Kashir, J., Alkattan, K., & Yaqinuddin, A. (2022). SARS-CoV-2 epitopes inform future vaccination strategies. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1041185
32. Tang, H., Gao, L., Wu, Z., Meng, F., Zhao, X., Shao, Y., Hou, G., Du, X., & Qin, F. X. F. (2022). Multiple SARS-CoV-2 Variants Exhibit Variable Target Cell Infectivity and Ability to Evade Antibody Neutralization. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836232
33. Hong, Q., Han, W., Li, J., Xu, S., Wang, Y., Xu, C., Li, Z., Wang, Y., Zhang, C., Huang, Z., & Cong, Y. (2022). Molecular basis of receptor binding and antibody neutralization of Omicron. *Nature*, *604*(7906). https://doi.org/10.1038/s41586-022-04581-9
34. Laine, L., Skön, M., Väisänen, E., Julkunen, I., & Österlund, P. (2022). SARS-CoV-2 variants Alpha, Beta, Delta and Omicron show a slower host cell interferon response compared to an early pandemic variant. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1016108
35. Chandrashekar, A., Yu, J., McMahan, K., Jacob-Dolan, C., Liu, J., He, X., Hope, D., Anioke, T., Barrett, J., Chung, B., Hachmann, N. P., Lifton, M., Miller, J., Powers, O., Sciacca, M., Sellers, D., Siamatu, M., Surve, N., VanWyk, H., … Barouch, D. H. (2022). Vaccine protection against the SARS-CoV-2 Omicron variant in macaques. *Cell*, *185*(9). https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.03.024
36. Liu, J., Chandrashekar, A., Sellers, D., Barrett, J., Jacob-Dolan, C., Lifton, M., McMahan, K., Sciacca, M., VanWyk, H., Wu, C., Yu, J., Collier, A. ris Y., & Barouch, D. H. (2022). Vaccines elicit highly conserved cellular immunity to SARS-CoV-2 Omicron. *Nature*, *603*(7901). https://doi.org/10.1038/s41586-022-04465-y
37. Sieber, J., Mayer, M., Schmidthaler, K., Kopanja, S., Camp, J. V., Popovitsch, A., Dwivedi, V., Hoz, J., Schoof, A., Weseslindtner, L., Szépfalusi, Z., Stiasny, K., & Aberle, J. H. (2022). Long-Lived Immunity in SARS-CoV-2-Recovered Children and Its Neutralizing Capacity Against Omicron. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.882456
38. Zhao, X.-J., Li, X.-L., Zhang, S., Chen, J.-J., Zhao, W.-C., Wu, N.-N., Wang, R.-J., Xu, Q., Lv, C.-L., Jiang, B.-G., Wang, G.-L., & Fang, L.-Q. (2024). Dynamic changes of neutralizing antibody and memory T cell responses six months post Omicron XBB reinfection. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1477721
39. Park, Y. J., Pinto, D., Walls, A. C., Liu, Z., De Marco, A., Benigni, F., Zatta, F., Silacci-Fregn, C., Bassi, J., Sprouse, K. R., Addetia, A., Bowen, J. E., Stewart, C., Giurdanella, M., Saliba, C., Guarino, B., Schmid, M. A., Franko, N. M., Logue, J. K., … Veesler, D. (2022). Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Science*, *378*(6620). https://doi.org/10.1126/science.adc9127
40. Balinsky, C. A., Jiang, L., Jani, V., Cheng, Y., Zhang, Z., Belinskaya, T., Qiu, Q., Long, T. K., Schilling, M. A., Jenkins, S. A., Corson, K. S., Martin, N. J., Letizia, A. G., Hontz, R. D., & Sun, P. (2023). Antibodies to S2 domain of SARS-CoV-2 spike protein in Moderna mRNA vaccinated subjects sustain antibody-dependent NK cell-mediated cell cytotoxicity against Omicron BA.1. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1266829
41. Cao, S., Sun, B., & Gao, F. (2025). From immune evasion to broad in silico binding: computational optimization of SARS-CoV-2 RBD-targeting nanobody. *Frontiers in Immunology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1637955
42. Han, P., Li, L., Liu, S., Wang, Q., Zhang, D., Xu, Z., Han, P., Li, X., Peng, Q., Su, C., Huang, B., Li, D., Zhang, R., Tian, M., Fu, L., Gao, Y., Zhao, X., Liu, K., Qi, J., … Wang, P. (2022). Receptor binding and complex structures of human ACE2 to spike RBD from omicron and delta SARS-CoV-2. *Cell*, *185*(4). https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.001
43. Belik, M., Reinholm, A., Kolehmainen, P., Heroum, J., Maljanen, S., Altan, E., Österlund, P., Laine, L., Ritvos, O., Pasternack, A., Naves, R. A., Iakubovskaia, A., Barkoff, A.-M., He, Q., Lempainen, J., Tähtinen, P. A., Ivaska, L., Jalkanen, P., Julkunen, I., & Kakkola, L. (2024). Long-term COVID-19 vaccine- and Omicron infection-induced humoral and cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1494432
44. Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., Rawlings, S. A., Sutherland, A., Premkumar, L., Jadi, R. S., Marrama, D., de Silva, A. M., Frazier, A., Carlin, A. F., Greenbaum, J. A., Peters, B., Krammer, F., Smith, D. M., Crotty, S., & Sette, A. (2020). Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals.

Cell, *181*(7), 1489-1501.e15.
45. Torres-Flores, A., Ontiveros-Padilla, L. A., Madera-Sandoval, R. L., Tepale-Segura, A., Gajón-Martínez, J., Rivera-Hernández, T., Ferat-Osorio, E. A., Cérbulo-Vázquez, A., Arriaga-Pizano, L. A., Bonifaz, L., Paz-De la Rosa, G., Rojas-Martínez, O., Suárez-Martínez, A., Peralta-Sánchez, G., Sarfati-Mizrahi, D., Sun, W., Chagoya-Cortés, H. E., Palese, P., Krammer, F., … López-Macías, C. (2024). Newcastle disease virus vector-based SARS-CoV-2 vaccine candidate AVX/COVID-12 activates T cells and is recognized by antibodies from COVID-19 patients and vaccinated individuals. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1394114
46. Alfonso-Dunn, R., Lin, J., Lei, J., Liu, J., Roche, M., De Oliveira, A., Raisingani, A., Kumar, A., Kirschner, V., Feuer, G., Malin, M., & Sadiq, S. A. (2023). Humoral and cellular responses to repeated COVID-19 exposure in multiple sclerosis patients receiving B-cell depleting therapies: a single-center, one-year, prospective study. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1194671
47. Saito, S., Okuno, A., Peng, Z., Cao, D.-Y., & Tsuji, N. M. (2024). Probiotic lactic acid bacteria promote anti-tumor immunity through enhanced major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation machinery in dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1335975
48. Gupta, S. S., Wang, J., & Chen, M. (2020). Metabolic Reprogramming in CD8+ T Cells During Acute Viral Infections. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01013
49. Juarez, I., Su, S., Herbert, Z. T., Teijaro, J. R., & Moulton, V. R. (2022). Splicing factor SRSF1 is essential for CD8 T cell function and host antigen-specific viral immunity. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.906355
50. Xie, S., Yang, L., Bi, X., Deng, W., Jiang, T., Lin, Y., Wang, S., Zhang, L., Liu, R., Chang, M., Wu, S., Gao, Y., Hao, H., Shen, G., Xu, M., Chen, X., Hu, L., Lu, Y., Song, R., … Li, M. (2022). Cytokine profiles and CD8+ T cells in the occurrence of acute and chronic hepatitis B. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1036612
51. Moström, M. J., Scheef, E. A., Sprehe, L. M., Szeltner, D., Tran, D., Hennebold, J. D., Roberts, V. H. J., Maness, N. J., Fahlberg, M., & Kaur, A. (2021). Immune Profile of the Normal Maternal-Fetal Interface in Rhesus Macaques and Its Alteration Following Zika Virus Infection. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.719810
52. Seipp, R. P., Hoeffel, G., Moise, A. R., Lok, S., Ripoche, A.-C., Marañón, C., Hosmalin, A., & Jefferies, W. A. (2025). A secreted Tapasin isoform impairs cytotoxic T lymphocyte recognition by disrupting exogenous MHC class I antigen presentation. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1525136
53. Possamaï, D., Hanafi, L.-A., Bellemare-Pelletier, A., Hamelin, K., Thébault, P., Hébert, M.-J., Gagnon, É., Leclerc, D., & Lapointe, R. (2021). MHC class I antigen cross-presentation mediated by PapMV nanoparticles in human antigen-presenting cells is dependent on autophagy. *PLOS ONE*, *16*(12), e0261987. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261987
54. Del Balzo, D., Capmany, A., Cebrian, I., & Damiani, M. T. (2021). Chlamydia trachomatis Infection Impairs MHC-I Intracellular Trafficking and Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662096
55. Zandhuis, N. D., Nicolet, B. P., & Wolkers, M. C. (2021). RNA-Binding Protein Expression Alters Upon Differentiation of Human B Cells and T Cells. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.717324
56. Wienke, J., Veldkamp, S. R., Struijf, E. M., Yousef Yengej, F. A., van der Wal, M. M., van Royen-Kerkhof, A., & van Wijk, F. (2022). T cell interaction with activated endothelial cells primes for tissue-residency. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.827786
57. Hou, Q., Wang, P., Kong, X., Chen, J., Yao, C., Luo, X., Li, Y., Jin, Z., & Wu, X. (2024). Higher TIGIT+ γδ TCM cells may predict poor prognosis in younger adult patients with non-acute promyelocytic AML. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1321126
58. Galletti, G., De Simone, G., Mazza, E. M. C., Puccio, S., Mezzanotte, C., Bi, T. M., Davydov, A. N., Metsger, M., Scamardella, E., Alvisi, G., De Paoli, F., Zanon, V., Scarpa, A., Camisa, B., Colombo, F. S., Anselmo, A., Peano, C., Polletti, S., Mavilio, D., … Lugli, E. (2020). Two subsets of stem-like CD8+ memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans. *Nature Immunology*, *21*(12). https://doi.org/10.1038/s41590-020-0791-5
59. Dei Zotti, F., Moriconi, C., Qiu, A., Miller, A., & Hudson, K. E. (2022). Distinct CD4+ T cell signature in ANA-positive young adult patients. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.972127
60. Kumar, N. P., Padmapriyadarsini, C., Rajamanickam, A., Bhavani, P. K., Nancy, A., Jayadeepa, B., Selvaraj, N., Asokan, D., Renji, R. M., Venkataramani, V., Tripathy, S., & Babu, S. (2021). BCG

vaccination induces enhanced frequencies of memory T cells and altered plasma levels of common γc cytokines in elderly individuals. *PLoS ONE*, *16*(November). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258743
61. Zhang, G., Liu, A., Yang, Y., Xia, Y., Li, W., Liu, Y., Zhang, J., Cui, Q., Wang, D., Liu, X., Guo, Y., Chen, H., & Yu, J. (2022). Clinical predictive value of naïve and memory T cells in advanced NSCLC. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.996348
62. Lang, H. P., Almeer, F. F., Jenkins, M. K., & Friedenberg, S. G. (2025). Rabies vaccination induces a CD4+ TEM and CD4+CD8+ TEMRA TH1 phenotype in dogs. *PLOS One*, *20*(5), e0323823. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0323823
63. Lagumdzic, E., Pernold, C., Viano, M., Olgiati, S., Schmitt, M. W., Mair, K. H., & Saalmüller, A. (2022). Transcriptome Profiling of Porcine Naïve, Intermediate and Terminally Differentiated CD8+ T Cells. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.849922
64. Pieren, D. K. J., Smits, N. A. M., Postel, R. J., Kandiah, V., de Wit, J., van Beek, J., van Baarle, D., & Guichelaar, T. (2022). Co-Expression of TIGIT and Helios Marks Immunosenescent CD8+ T Cells During Aging. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833531
65. Özbay Kurt, F. G., Lepper, A., Gerhards, C., Roemer, M., Lasser, S., Arkhypov, I., Bitsch, R., Bugert, P., Altevogt, P., Gouttefangeas, C., Neumaier, M., Utikal, J., & Umansky, V. (2022). Booster dose of mRNA vaccine augments waning T cell and antibody responses against SARS-CoV-2. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1012526
66. Yi, L., Jin, X., Wang, J., Yan, Z., Cheng, X., Wen, T., Yang, B., Wang, X., Che, N., Liu, Z., & Zhang, H. (2022). CD137 Agonists Targeting CD137-Mediated Negative Regulation Show Enhanced Antitumor Efficacy in Lung Cancer. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.771809
67. Gao, L., Hong, Z., Lei, G., Guo, A. L., Wang, F. S., Jiao, Y. M., & Fu, J. (2023). Decreased granzyme-B expression in CD11c+CD8+ T cells associated with disease progression in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1107483
68. Gatti, A., Zizzo, G., De Paschale, M., Tamburello, A., Castelnovo, L., Faggioli, P. M., Clerici, P., Brando, B., & Mazzone, A. (2023). Assessing SARS-CoV-2-specific T-cell reactivity in late convalescents and vaccinees: Comparison and combination of QuantiFERON and activation-induced marker assays, and relation with antibody status. *PLoS ONE*, *18*(5 May). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285728
69. Huang, C., Xiong, H., Li, W., Peng, L., Zheng, Y., Liao, W., Zhou, M., & Xu, Y. (2023). T cell activation profiles can distinguish gram negative/positive bacterial sepsis and are associated with ICU discharge. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1058606
70. Fisher, E., Padula, L., Podack, K., O'Neill, K., Seavey, M. M., Jayaraman, P., Jasuja, R., & Strbo, N. (2021). Induction of SARS-CoV-2 Protein S-Specific CD8+ T Cells in the Lungs of gp96-Ig-S Vaccinated Mice. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.602254
71. Bar-On, L., Dekel, H., Aftalion, M., Chitlaru, T., & Erez, N. (2023). Essential role for Batf3-dependent dendritic cells in regulating CD8 T-cell response during SARS-CoV-2 infection. *PLoS ONE*, *18*(12 December). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294176
72. Goel, R. R., Painter, M. M., Apostolidis, S. A., Mathew, D., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Lundgreen, K. A., Reynaldi, A., Khoury, D. S., Pattekar, A., Gouma, S., Kuri-Cervantes, L., Hicks, P., Dysinger, S., Hicks, A., Sharma, H., Herring, S., Korte, S., Baxter, A. E., … Vanderbeck, A. N. (2021). mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern. *Science*, *374*(6572). https://doi.org/10.1126/science.abm0829
73. Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Salih, H. R., Roerden, M., Lübke, M., Bauer, J., Rieth, J., Wacker, M., Peter, A., Hörber, S., Traenkle, B., Kaiser, P. D., Rothbauer, U., Becker, M., Junker, D., Krause, G., Strengert, M., … Walz, J. S. (2020). SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nature Immunology 2020 22:1*, *22*(1), 74–85. https://doi.org/10.1038/s41590-020-00808-x
74. Loyal, L., Braun, J., Henze, L., Kruse, B., Dingeldey, M., Reimer, U., Kern, F., Schwarz, T., Mangold, M., Unger, C., Dörfler, F., Kadler, S., Rosowski, J., Gürcan, K., Uyar-Aydin, Z., Frentsch, M., Kurth, F., Schnatbaum, K., Eckey, M., … Giesecke-Thiel, C. (2021). Cross-reactive CD4+ T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination. *Science*, *374*(6564).
75. Dowell, A. C., Butler, M. S., Jinks, E., Tut, G., Lancaster, T., Sylla, P., Begum, J., Bruton, R., Pearce, H., Verma, K., Logan, N., Tyson, G., Spalkova, E., Margielewska-Davies, S., Taylor, G. S., Syrimi, E., Baawuah, F., Beckmann, J., Okike, I. O., … Ladhani, S. (2022). Children develop robust and sustained cross-reactive spike-specific immune responses to SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology*, *23*(1). https://doi.org/10.1038/s41590-021-01089-8
76. Salgado Del Riego, E., Saiz, M. L., Corte-Iglesias, V., Leoz Gordillo, B., Martin-Martin, C., Rodríguez-Pérez, M., Escudero, D., Lopez-Larrea, C., & Suarez-Alvarez, B. (2022). Divergent SARS-CoV-2-specific T cell responses in intensive care unit workers following mRNA COVID-19 vaccination. *Frontiers in*

Immunology, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.942192
77. Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Painter, M. M., Mathew, D., Pattekar, A., Kuthuru, O., Gouma, S., Hicks, P., Meng, W., Rosenfeld, A. M., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Oldridge, D. A., Baxter, A. E., Giles, J. R., … Wherry, E. J. (2021). Distinct antibody and memory B cell responses in SARS-CoV-2 naïve and recovered individuals after mRNA vaccination. *Science Immunology*, *6*(58), 1–19. https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABI6950
78. Prakash, S., Dhanushkodi, N. R., Zayou, L., Ibraim, I. C., Quadiri, A., Coulon, P. G., Tifrea, D. F., Suzer, B., Shaik, A. M., Chilukuri, A., Edwards, R. A., Singer, M., Vahed, H., Nesburn, A. B., Kuppermann, B. D., Ulmer, J. B., Gil, D., Jones, T. M., & BenMohamed, L. (2024). Cross-protection induced by highly conserved human B, CD4+, and CD8+ T-cell epitopes-based vaccine against severe infection, disease, and death caused by multiple SARS-CoV-2 variants of concern. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1328905
79. Kilpeläinen, A., Jimenez-Moyano, E., Blanch-Lombarte, O., Ouchi, D., Peña, R., Quirant-Sanchez, B., Perez-Caballero, R., Chamorro, A., Blanco, I., Martínez-Caceres, E., Paredes, R., Mateu, L., Carrillo, J., Blanco, J., Brander, C., Massanella, M., Clotet, B., & Prado, J. G. (2022). Skewed Cellular Distribution and Low Activation of Functional T-Cell Responses in SARS-CoV-2 Non-Seroconvertors. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.815041
80. Taus, E., Hofmann, C., Ibarrondo, F. J., Hausner, M. A., Fulcher, J. A., Krogstad, P., Ferbas, K. G., Tobin, N. H., Rimoin, A. W., Aldrovandi, G. M., & Yang, O. O. (2022). Dominant CD8+ T Cell Nucleocapsid Targeting in SARS-CoV-2 Infection and Broad Spike Targeting From Vaccination. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.835830
81. Addetia, A., Piccoli, L., Case, J. B., Park, Y. J., Beltramello, M., Guarino, B., Dang, H., de Melo, G. D., Pinto, D., Sprouse, K., Scheaffer, S. M., Bassi, J., Silacci-Fregni, C., Muoio, F., Dini, M., Vincenzetti, L., Acosta, R., Johnson, D., Subramanian, S., … Veesler, D. (2023). Neutralization, effector function and immune imprinting of Omicron variants. *Nature*, *621*(7979). https://doi.org/10.1038/s41586-023-06487-6
82. Mercado, A., Sop, J., Amanat, S., Zhang, L., Chida, N. M., Basseth, C. R., Gebo, K. A., Antar, A. A. R., Smith, K. N., Zeng, Z., & Blankson, J. N. (2025). SARS-CoV-2 vaccines induce a diverse spike-specific CD4+ T cell receptor repertoire in people living with HIV with low CD4 nadirs. *Frontiers in Immunology*, *16*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1663819
83. Cinicola, B. L., Piano Mortari, E., Zicari, A. M., Agrati, C., Bordoni, V., Albano, C., Fedele, G., Schiavoni, I., Leone, P., Fiore, S., Capponi, M., Conti, M. G., Petrarca, L., Stefanelli, P., Spalice, A., Midulla, F., Palamara, A. T., Quinti, I., Locatelli, F., & Carsetti, R. (2022). The BNT162b2 vaccine induces humoral and cellular immune memory to SARS-CoV-2 Wuhan strain and the Omicron variant in children 5 to 11 years of age. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1094727
84. Yin, D., Han, Z., Lang, B., Li, Y., Mai, G., Chen, H., Feng, L., Chen, Y. Q., Luo, H., Xiong, Y., Jing, L., Du, X., Shu, Y., & Sun, C. (2023). Effect of seasonal coronavirus immune imprinting on the immunogenicity of inactivated COVID-19 vaccination. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1195533
85. Nathan, A., Rossin, E. J., Kaseke, C., Park, R. J., Khatri, A., Koundakjian, D., Urbach, J. M., Singh, N. K., Bashirova, A., Tano-Menka, R., Senjobe, F., Waring, M. T., Piechocka-Trocha, A., Garcia-Beltran, W. F., Iafrate, A. J., Naranbhai, V., Carrington, M., Walker, B. D., & Gaiha, G. D. (2021). Structure-guided T cell vaccine design for SARS-CoV-2 variants and sarbecoviruses. *Cell*, *184*(17). https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.029
86. Coulon, P.-G., Prakash, S., Dhanushkodi, N. R., Srivastava, R., Zayou, L., Tifrea, D. F., Edwards, R. A., Figueroa, C. J., Schubl, S. D., Hsieh, L., Nesburn, A. B., Kuppermann, B. D., Bahraoui, E., Vahed, H., Gil, D., Jones, T. M., Ulmer, J. B., & BenMohamed, L. (2024). High frequencies of alpha common cold coronavirus/SARS-CoV-2 cross-reactive functional CD4+ and CD8+ memory T cells are associated with protection from symptomatic and fatal SARS-CoV-2 infections in unvaccinated COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1343716
87. Hyun, H., Nham, E., Seong, H., Yoon, J. G., Noh, J. Y., Cheong, H. J., Kim, W. J., Yoon, S. K., Park, S.-J., Gwak, W., Lee, J.-W., Kim, B., & Song, J. Y. (2024). Long-term humoral and cellular immunity against vaccine strains and Omicron subvariants (BQ.1.1, BN.1, XBB.1, and EG.5) after bivalent COVID-19 vaccination. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1385135
88. Soni, M. K., Migliori, E., Fu, J., Assal, A., Chan, H. T., Pan, J., Khatiwada, P., Ciubotariu, R., May, M. S., Pereira, M. R., De Giorgi, V., Sykes, M., Mapara, M. Y., & Muranski, P. J. (2023). The prospect of universal coronavirus immunity: characterization of reciprocal and non-reciprocal T cell responses against SARS-CoV2 and common human coronaviruses. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1212203
89. Paniskaki, K., Konik, M. J., Anft, M., Meister, T. L., Marheinecke, C., Pfaender, S., Jäger, J., Krawczyk,

A., Zettler, M., Dolff, S., Westhoff, T. H., Rohn, H., Stervbo, U., Witzke, O., & Babel, N. (2022). Superior humoral immunity in vaccinated SARS-CoV-2 convalescence as compared to SARS-COV-2 infection or vaccination. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031254
90. Sonnleitner, S. T., Walder, S., Knabl, L., Poernbacher, R., Tschurtschenthaler, T., Hinterbichler, E., Sonnleitner, S., Muehlmann, V., Posch, W., & Walder, G. (2023). Omicron (B.1.1.529) BA.1 or BA.2-related effects on immune responses in previously naïve versus imprinted individuals: immune imprinting as an advantage in the humoral immune response against novel variants. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1165769
91. Martín-Galiano, A. J., Díez-Fuertes, F., McConnell, M. J., & López, D. (2021). Predicted Epitope Abundance Supports Vaccine-Induced Cytotoxic Protection Against SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.732693
92. Khan, M. S., Khan, I. M., Ahmad, S. U., Rahman, I., Khan, M. Z., Khan, M. S. Z., Abbas, Z., Noreen, S., & Liu, Y. (2023). Immunoinformatics design of B and T-cell epitope-based SARS-CoV-2 peptide vaccination. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1001430
93. Waqas, M., Aziz, S., Liò, P., Khan, Y., Ali, A., Iqbal, A., Khan, F., & Almajhdi, F. N. (2023). Immunoinformatics design of multivalent epitope vaccine against monkeypox virus and its variants using membrane-bound, enveloped, and extracellular proteins as targets. *Frontiers in Immunology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1091941
94. Cirac, A., Poirey, R., Dieckmeyer, M., Witter, K., Delecluse, H. J., Behrends, U., & Mautner, J. (2021). Immunoinformatic Analysis Reveals Antigenic Heterogeneity of Epstein-Barr Virus Is Immune-Driven. *Frontiers in Immunology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796379
95. Suleman, M., Rashid, F., Ali, S., Sher, H., Luo, S., Xie, L., & Xie, Z. (2022). Immunoinformatic-based design of immune-boosting multiepitope subunit vaccines against monkeypox virus and validation through molecular dynamics and immune simulation. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1042997
96. Kaushik, V., G, S. K., Gupta, L. R., Kalra, U., Shaikh, A. R., Cavallo, L., & Chawla, M. (2022). Immunoinformatics Aided Design and In-Vivo Validation of a Cross-Reactive Peptide Based Multi-Epitope Vaccine Targeting Multiple Serotypes of Dengue Virus. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.865180
97. *GISAID - hCov19 Variants*. (n.d.). Retrieved November 21, 2025, from https://gisaid.org/hcov19-variants/
98. NextStrain. (2025, July 18). *Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months*. NextStrain.
99. Tsueng, G., Mullen, J. L., Alkuzweny, M., Cano, M., Rush, B., Haag, E., Lin, J., Welzel, D. J., Zhou, X., Qian, Z., Latif, A. A., Hufbauer, E., Zeller, M., Andersen, K. G., Wu, C., Su, A. I., Gangavarapu, K., & Hughes, L. D. (2023). Outbreak.info Research Library: a standardized, searchable platform to discover and explore COVID-19 resources. *Nature Methods*, *20*(4). https://doi.org/10.1038/s41592-023-01770-w
100. *IEDB.org: Free epitope database and prediction resource*. (n.d.). Retrieved November 22, 2025, from https://iedb.org/
101. Vita, R., Blazeska, N., Marrama, D., Shackelford, D., Zalman, L., Foos, G., Zarebski, L., Chan, K., Reardon, B., Fitzpatrick, S., Busse, M., Coleman, S., Sedwick, C., Edwards, L., Macfarlane, C., Ennis, M., Duesing, S., Bennett, J., Greenbaum, J., … Peters, B. (2025). The Immune Epitope Database (IEDB): 2024 update. *Nucleic Acids Research*, *53*(D1), D436–D443. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE1092
102. Reynisson, B., Alvarez, B., Paul, S., Peters, B., & Nielsen, M. (2020). NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data. *Nucleic Acids Research*, *48*(W1), W449–W454. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA379
103. Rubio, R., Yavlinsky, A., Escalera Zamudio, M., Molinos-Albert, L. M., Martín Pérez, C., Pradenas, E., Canyelles, M., Torres, C., Tan, C., Swadling, L., Ramírez-Morros, A., Trinité, B., Vidal-Alaball, J., Aguilar, R., Ruiz-Comellas, A., Blanco, J., van Dorp, L., Balloux, F., Dobaño, C., & Moncunill, G. (2025). Initial antigen encounter determines robust T-cell immunity against SARS-CoV-2 BA.2.86 variant three years later. *Journal of Infection*, *90*(2), 106402. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2024.106402
104. Minervina, A. A., Pogorelyy, M. V., Kirk, A. M., Crawford, J. C., Allen, E. K., Chou, C. H., Mettelman, R. C., Allison, K. J., Lin, C. Y., Brice, D. C., Zhu, X., Vegesana, K., Wu, G., Trivedi, S., Kottapalli, P., Darnell, D., McNeely, S., Olsen, S. R., Schultz-Cherry, S., … Thomas, P. G. (2022). SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *23*(5), 781–790. https://doi.org/10.1038/s41590-022-01184-4
105. Reynolds, C. J., Pade, C., Gibbons, J. M., Otter, A. D., Lin, K. M., Sandoval, D. M., Pieper, F. P., Butler, D. K., Liu, S., Joy, G., Forooghi, N., Treibel, T. A., Manisty, C., Moon, J. C., Semper, A., Brooks,

T., McKnight, Á., Altmann, D. M., Boyton, R. J., … Chain, B. (2022). Immune boosting by B.1.1.529 (Omicron) depends on previous SARS-CoV-2 exposure. *Science*, *377*(6603). https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABQ1841/SUPPL_FILE/SCIENCE.ABQ1841_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF
106. Geers, D., Shamier, M. C., Bogers, S., den Hartog, G., Gommers, L., Nieuwkoop, N. N., Schmitz, K. S., Rijsbergen, L. C., van Osch, J. A. T., Dijkhuizen, E., Smits, G., Comvalius, A., van Mourik, D., Caniels, T. G., van Gils, M. J., Sanders, R. W., Oude Munnink, B. B., Molenkamp, R., de Jager, H. J., … GeurtsvanKessel, C. H. (2021). SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T-cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccinees. *Science Immunology*, *6*(59), 1750. https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.ABJ1750
107. Boni, C., Cavazzini, D., Bolchi, A., Rossi, M., Vecchi, A., Tiezzi, C., Barili, V., Fisicaro, P., Ferrari, C., & Ottonello, S. (2021). Degenerate CD8 Epitopes Mapping to Structurally Constrained Regions of the Spike Protein: A T Cell-Based Way-Out From the SARS-CoV-2 Variants Storm. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730051
108. Nesamari, R., Omondi, M. A., Baguma, R., Höft, M. A., Ngomti, A., Nkayi, A. A., Besethi, A. S., Magugu, S. F. J., Mosala, P., Walters, A., Clark, G. M., Mennen, M., Skelem, S., Adriaanse, M., Grifoni, A., Sette, A., Keeton, R. S., Ntusi, N. A. B., Riou, C., & Burgers, W. A. (2024). Post-pandemic memory T cell response to SARS-CoV-2 is durable, broadly targeted, and cross-reactive to the hypermutated BA.2.86 variant. *Cell Host and Microbe*, *32*(2), 162-169.e3. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.12.003
109. Müller, T. R., Gao, Y., Wu, J., Ribeiro, O., Chen, P., Bergman, P., Blennow, O., Hansson, L., Mielke, S., Nowak, P., Vesterbacka, J., Akber, M., Söderdahl, G., Smith, C. I. E., Loré, K., Chen, M. S., Ljungman, P., Ingelman-Sundberg, H. M., Ljunggren, H. G., … Buggert, M. (2024). Memory T cells effectively recognize the SARS-CoV-2 hypermutated BA.2.86 variant. *Cell Host and Microbe*, *32*(2), 156-161.e3. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.12.010
110. Turner, S. J., Bennett, T. J., & La Gruta, N. L. (2021). $CD8^+$ T-Cell Memory: The Why, the When, and the How. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *13*(5), a038661. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038661
111. Adamo, S., Michler, J., Zurbuchen, Y., Cervia, C., Taeschler, P., Raeber, M. E., Baghai Sain, S., Nilsson, J., Moor, A. E., & Boyman, O. (2022). Signature of long-lived memory $CD8^+$ T cells in acute SARS-CoV-2 infection. *Nature*, *602*(7895), 148–155. https://doi.org/10.1038/s41586-021-04280-x
112. Neidleman, J., Luo, X., Frouard, J., Xie, G., Gill, G., Stein, E. S., McGregor, M., Ma, T., George, A. F., Kosters, A., Greene, W. C., Vasquez, J., Ghosn, E., Lee, S., & Roan, N. R. (2020). SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential. *Cell reports. Medicine*, *1*(6), 100081. https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100081
113. Dan, J. M., Mateus, J., Kato, Y., Hastie, K. M., Yu, E. D., Faliti, C. E., Grifoni, A., Ramirez, S. I., Haupt, S., Frazier, A., Nakao, C., Rayaprolu, V., Rawlings, S. A., Peters, B., Krammer, F., Simon, V., Saphire, E. O., Smith, D. M., Weiskopf, D., Sette, A., … Crotty, S. (2021). Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science (New York, N.Y.)*, *371*(6529), eabf4063. https://doi.org/10.1126/science.abf4063
114. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, *184*(4), 861–880. https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.007
115. Breton, G., Mendoza, P., Hägglöf, T., Oliveira, T. Y., Schaefer-Babajew, D., Gaebler, C., Turroja, M., Hurley, A., Caskey, M., & Nussenzweig, M. C. (2021). Persistent cellular immunity to SARS-CoV-2 infection. *The Journal of experimental medicine*, *218*(4), e20202515. https://doi.org/10.1084/jem.20202515
116. Jung, J. H., Rha, M. S., Sa, M., Choi, H. K., Jeon, J. H., Seok, H., Park, D. W., Park, S. H., Jeong, H. W., Choi, W. S., & Shin, E. C. (2021). SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. *Nature Communications 2021 12:1*, *12*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24377-1
117. Uzunoğlu, M. S. (2025). Omicron Varyantına Özgü Yardımcı T Hücrelerin COVID-19 Konvalesan Bireylerde İncelenmesi ve Orijinal Antijenik Sin Kavramının CD4+ T Hücre Epitopları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması [Yayımlanmamış doktora tezi]. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul.
118. Almendro-Vázquez, P., Laguna-Goya, R., & Paz-Artal, E. (2023). Defending against SARS-CoV-2: The T cell perspective. *Frontiers in Immunology*, *14*(January), 1–12. https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1107803
119. Emmelot, M. E., Vos, M., Boer, M. C., Rots, N. Y., de Wit, J., van Els, C. A. C. M., & Kaaijk, P. (2022). Omicron BA.1 Mutations in SARS-CoV-2 Spike Lead to Reduced T-Cell Response in Vaccinated and Convalescent Individuals. *Viruses*, *14*(7). https://doi.org/10.3390/v14071570

120. Sette, A., Sidney, J., & Grifoni, A. (2024). Pre-existing SARS-2-specific T cells are predicted to cross-recognize BA.2.86. *Cell Host and Microbe*, *32*(1), 19-24.e2. https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.11.010
121. Aguilar-Bretones, M., Fouchier, R. A. M., Koopmans, M. P. G., & van Nierop, G. P. (2023). Impact of antigenic evolution and original antigenic sin on SARS-CoV-2 immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, *133*(1). https://doi.org/10.1172/JCI162192
122. Tarke, A., Coelho, C. H., Zhang, Z., Dan, J. M., Yu, E. D., Methot, N., Bloom, N. I., Goodwin, B., Phillips, E., Mallal, S., Sidney, J., Filaci, G., Weiskopf, D., da Silva Antunes, R., Crotty, S., Grifoni, A., & Sette, A. (2022). SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron. *Cell*, *185*(5), 847–859.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.015
123. Redd, A. D., Nardin, A., Kared, H., Bloch, E. M., Abel, B., Pekosz, A., Laeyendecker, O., Fehlings, M., Quinn, T. C., & Tobian, A. A. R. (2022). Minimal Crossover between Mutations Associated with Omicron Variant of SARS-CoV-2 and $CD8^+$ T-Cell Epitopes Identified in COVID-19 Convalescent Individuals. *mBio*, *13*(2), e0361721. https://doi.org/10.1128/mbio.03617-21

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Değerli katılımcı,

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Doktora öğrencisi Aylin Seher UZUNOĞLU'nun doktora tezi kapsamında ve Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ danışmanlığında yürütülecek olan bilimsel bir çalışmadır.

Araştırmanın içeriği COVID-19 geçirmiş bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden, SARS-CoV-2 wild type ve Omicron varyantlarına özgü bellek $CD8^+$ T hücrelerinin frekansı ve spesifikliği kapsamlı şekilde anlamaya ilişkin ölçümleri kapsamaktadır. Toplanan veriler sadece bilimsel amaçlarla kullanılacak, kimliğinizi ortaya çıkarabilecek kayıtlar gizli kalacak, elde edilen kişisel bilgiler ve uygulanacak testlere verdiğiniz cevaplar araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi saklı tutulacaktır.

Araştırmanın yaklaşık 94 kişinin katılımıyla yürütülmesi beklenmektedir. Araştırma süreci boyunca sizden beklenen, yönergelere dikkatli bir şekilde uymak ve ölçekler üzerinde yer alan soruları dürüst şekilde cevaplamaktır. Hiçbir sorumluluk altından kalmadan soruların bir kısmına cevap vermeme, araştırmaya katılmayı reddetme veya araştırmadan çekilme hakkına sahip olacaksınız.

'Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen araştırmacı tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.'

Gönüllü Katılımcı	**Aylin Seher UZUNOĞLU**
İmza	**İmza**

EK-3.Çalışma Anket Formu

Bu anket, TÜSEB tarafından desteklenen bir bilimsel araştırmanın parçasıdır. Çalışmamız, COVID-19 enfeksiyonunun farklı SARS-CoV-2 varyantları ile oluşan bağışıklık yanıtlarını anlamayı amaçlamaktadır. Sorularla ilgili herhangi bir açıklama veya yardım için bizimle iletişime geçebilirsiniz.

İletişim:

KİŞİSEL BİLGİLER VE ONAM

[ ] Kadın [ ] Erkek

Ad Soyad: **Yaşınız:**

Tel No: **TC No:**

COVID-19 ENFEKSİYON VE AŞI GEÇMİŞİ

2020 yılı içerisinde aşı olmadan önce COVID-19 enfeksiyonunu geçirdiniz mi?

[ ] Evet

[ ] Hayır

2020-2021 yıllarında hangi COVID-19 aşısını yaptırdınız? (Birden fazla seçebilirsiniz.)

[ ] Sinovac

[ ] BioNTech

[ ] Diğer: _____

2021 yılında toplam kaç doz COVID-19 aşısı yaptırdınız?

[ ] 1 doz

[ ] 2 doz

[ ] 3 doz veya daha fazla

2022 yılı içerisinde COVID-19 enfeksiyonu geçirdiniz mi?

[ ] Evet

[ ] Hayır

2023 yılı içerisinde COVID-19 enfeksiyonu geçirdiniz mi?

[ ] Evet

[ ] Hayır

En son COVID-19 enfeksiyonunuzu ne zaman geçirdiniz?

[ ] Son 6 ay içerisinde

[ ] Son 9 ay içerisinde

[ ] 9 aydan daha uzun süre önce

Son COVID-19 enfeksiyonunuzu geçirdiğiniz tarih nedir? (Ay/Yıl olarak hatırladığınız şekilde belirtiniz):

EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları

Kod 1: SARS-CoV-2 varyantları genelinde CD8+ T hücresine ait epitop örtüşmesi, korunumu, mutasyon analizi ve konumsal haritalama (positional mapping) işlemlerini gerçekleştiren bütünleşik analiz hattı

```
# ============================================
# SARS-CoV-2 Epitope Analysis Pipeline (CD8 T Cell Epitopes)
# ============================================

!pip install upsetplot

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
from upsetplot import from_contents, UpSet
import matplotlib.colors as mcolors
from matplotlib.lines import Line2D
import re

# ============================================
# Helper Functions
# ============================================

def plot_heatmap(matrix_dict, title, cmap, cbar_label="Shared Epitopes"):
    variants = list(matrix_dict.keys())
    n = len(variants)
    shared_matrix = pd.DataFrame(0, index=variants, columns=variants)
    for i in range(n):
        for j in range(n):
            shared_matrix.iloc[i, j] =
len(matrix_dict[variants[i]].intersection(matrix_dict[variants[j]]))
    plt.figure(figsize=(8, 6))
    sns.heatmap(shared_matrix, annot=True, fmt="d", cmap=cmap, cbar_kws={'label':
cbar_label})
    plt.yticks(rotation=0, va="center")
    plt.xticks(rotation=0, ha="right")
    plt.title(title, fontsize=12)
    plt.tight_layout()
    plt.show()

def parse_mutation(mutation):
    mutation = str(mutation).strip()
    positions = []
    if re.match(r"[A-Z]\d+[A-Z]", mutation):
        pos = int(re.findall(r"\d+", mutation)[0])
        positions.append(pos)
    elif "del" in mutation or "Δ" in mutation:
        nums = re.findall(r"\d+", mutation)
        if len(nums) == 1:
            positions.append(int(nums[0]))
        elif len(nums) == 2:
            start, end = map(int, nums)
            positions.extend(range(start, end + 1))
    elif "ins" in mutation:
        nums = re.findall(r"\d+", mutation)
        if nums:
            positions.append(int(nums[0]))
    return positions

def mutation_hits_epitope(mutation, epitopes_df):
    match = re.search(r"(\d+)", str(mutation))
    if not match:
        return False
    pos = int(match.group(1))
    for _, row in epitopes_df.iterrows():
        if row["Mapped Start Position"] <= pos <= row["Mapped End Position"]:
```

```
            return True
    return False

def get_mutated_epitopes(epitopes, mutations):
    mutated, unmutated = [], []
    for _, row in epitopes.iterrows():
        start, end, seq = row["Mapped Start Position"], row["Mapped End Position"],
row["Epitope Sequence"]
        is_mutated = any(start <= int(re.search(r"(\d+)", mut).group(1)) <= end for mut
in mutations if re.search(r"(\d+)", mut))
        if is_mutated:
            mutated.append(seq)
        else:
            unmutated.append(seq)
    return set(mutated), set(unmutated)

# ============================================
# Colormap
# ============================================
heatmap_cmap = "YlGnBu"

# ============================================
# Analysis 1: Epitope Overlap (UpSet + Heatmap)
# ============================================
def analyze_epitope_overlap(epitope_file, include_ancestral=False):
    df = pd.read_excel(epitope_file)
    if include_ancestral:
        print("\n=== Overlap including Ancestral ===")
    else:
        print("\n=== Overlap across Variants Only ===")

    variants = df.columns.tolist()
    epitope_dict = {v: set(df[v].dropna().astype(str).tolist()) for v in variants}

    # UpSet plot
    contents = from_contents(epitope_dict)
    plt.figure(figsize=(12, 6))
    UpSet(contents, subset_size='count', show_counts=True).plot()
    title = "Overlap of Experimental Epitopes"
    if include_ancestral:
        title += " (Including Ancestral)"
    else:
        title += " (Variants Only)"
    plt.suptitle(title, fontsize=12)
    plt.show()

    # Heatmap
    plot_heatmap(epitope_dict, f"Shared Epitopes Across Variants{' + Ancestral' if
include_ancestral else ''}", heatmap_cmap)


# ============================================
# Analysis 2: Epitope Preservation vs Ancestral
# ============================================
def analyze_epitope_preservation(epitope_file, show_unmatched=False):
    df = pd.read_excel(epitope_file)
    df.columns = ["Ancestral", "BA.2.86", "JN.1", "LP.8.1", "NB.1.8.1", "XEC"]

    epitope_sets = {col: set(df[col].dropna().astype(str).str.strip()) for col in
df.columns}
    ancestral = epitope_sets["Ancestral"]

    print("\n=== Epitope Preservation vs Ancestral ===")
    for variant in ["BA.2.86", "JN.1", "LP.8.1", "NB.1.8.1", "XEC"]:
        variant_set = epitope_sets[variant]
        overlap = ancestral.intersection(variant_set)
        unmatched = variant_set - ancestral

        overlap_count = len(overlap)
        total_variant = len(variant_set)
        percentage = (overlap_count / total_variant * 100) if total_variant > 0 else 0
        print(f"{overlap_count} of {total_variant} {variant} epitopes found in ancestral
({percentage:.2f}%)")

        if show_unmatched:
```

```
            if unmatched:
                print(f"Unmatched epitopes in {variant} ({len(unmatched)}):")
                for ep in unmatched:
                    print(f"  - {ep}")
            else:
                print(f"All {variant} epitopes are conserved in ancestral.")
        print("-" * 60)


# ============================================
# Analysis 3: Shared Mutations Across Variants
# ============================================
def analyze_shared_mutations(mutation_file):
    df = pd.read_excel(mutation_file)
    mutation_dict = {col: set(df[col].dropna().astype(str).str.strip().tolist()) for col
in df.columns}
    plot_heatmap(mutation_dict, "Pairwise Shared Spike Mutations Across Variants",
heatmap_cmap, cbar_label="Shared Mutations")


# ============================================
# Analysis 4: Impact of Variant-Defining Mutations on Ancestral Epitopes
# ============================================
def analyze_variant_defining_mutations(epitope_file, mutation_file,
output_excel="epitope_mutation_status.xlsx"):
    # Load data
    epitopes_df = pd.read_excel(epitope_file)
    mutations_df = pd.read_excel(mutation_file)
    epitopes_df.columns = ["Epitope Sequence", "Mapped Start Position", "Mapped End
Position"]
    variants = list(mutations_df.columns)

    results = []
    mutated_epitopes_by_variant = {}
    unmutated_epitopes_by_variant = {}

    # Collect mutated/unmutated epitopes
    for variant in variants:
        variant_mutations = mutations_df[variant].dropna().tolist()
        mut_positions = set()
        for mut in variant_mutations:
            mut_positions.update(parse_mutation(mut))

        mutated, unmutated = [], []
        for _, row in epitopes_df.iterrows():
            start, end = int(row["Mapped Start Position"]), int(row["Mapped End
Position"])
            seq = row["Epitope Sequence"]
            ep_range = set(range(start, end + 1))
            if ep_range & mut_positions:
                mutated.append(seq)
            else:
                unmutated.append(seq)

        total = len(mutated) + len(unmutated)
        results.append({
            "Variant": variant,
            "Mutated %": len(mutated) / total * 100 if total else 0,
            "Unmutated %": len(unmutated) / total * 100 if total else 0,
            "Total Epitopes": total,
            "Mutated Count": len(mutated),
            "Unmutated Count": len(unmutated)
        })

        mutated_epitopes_by_variant[variant] = mutated
        unmutated_epitopes_by_variant[variant] = unmutated

    results_df = pd.DataFrame(results)
    print("\n=== Variant-Defining Mutation Impact ===")
    print(results_df)


    # Export mutated/unmutated epitope lists
    with pd.ExcelWriter(output_excel) as writer:
```

```
        for variant in variants:
            df_out = pd.DataFrame({
                "Mutated Epitopes": pd.Series(mutated_epitopes_by_variant[variant]),
                "Unmutated Epitopes": pd.Series(unmutated_epitopes_by_variant[variant])
            })
            df_out.to_excel(writer, sheet_name=variant, index=False)
    print(f"\nMutated/unmutated epitope lists exported to '{output_excel}'")

    # ----------------------------
    # 4a. Stacked bar plot of mutated/unmutated percentages
    # ----------------------------
    fig, ax = plt.subplots(figsize=(9,6))
    plot_data = results_df.set_index("Variant")[["Unmutated %", "Mutated %"]]
    plot = plot_data.plot(kind="bar", stacked=True, ax=ax, color=["#194885", "#57BEC1"],
edgecolor="white")

    # Add labels inside the bars by iterating through the plot patches
    # Access data directly from results_df using index and column names
    for i in range(len(results_df)):
        unmut_count = results_df.loc[i, "Unmutated Count"]
        mut_count = results_df.loc[i, "Mutated Count"]
        unmut_pct = results_df.loc[i, "Unmutated %"]
        mut_pct = results_df.loc[i, "Mutated %"]

        # Position of unmutated label
        ax.text(i, unmut_pct/2, str(unmut_count), ha="center", va="center",
color="white", fontsize=10, fontweight="regular")
        # Position of mutated label
        ax.text(i, unmut_pct + mut_pct/2, str(mut_count), ha="center", va="center",
color="white", fontsize=10, fontweight="regular")


    ax.set_ylabel("Percentage of Epitopes (%)")
    ax.set_title("Impact of Variant-Defining Mutations on Ancestral Spike CD8+ T Cell
Epitopes")
    plt.xticks(rotation=45)
    plt.legend(title="Epitope Status")
    plt.tight_layout()
    plt.show()

    # ----------------------------
    # 4b. Heatmap: Epitope-Relevant Mutations
    # ----------------------------
    all_mutations = []
    for v in variants:
        all_mutations.extend(mutations_df[v].dropna().astype(str).tolist())
    all_mutations = sorted(set(all_mutations))

    presence_matrix = pd.DataFrame(0, index=all_mutations, columns=variants)
    for v in variants:
        muts = mutations_df[v].dropna().astype(str).tolist()
        for m in muts:
            if mutation_hits_epitope(m, epitopes_df):
                presence_matrix.loc[m, v] = 1


    plt.figure(figsize=(10, len(all_mutations) * 0.3))
    sns.heatmap(
        presence_matrix,
        cmap=heatmap_cmap,
        linewidths=0.5,
        linecolor="white",
        cbar_kws={"label": "Epitope-Relevant Mutation"},
        vmin=0, vmax=1
    )
    plt.title("Epitope-Relevant Mutations Across Variants")
    plt.xlabel("Variants")
    plt.ylabel("Mutations")
    plt.tight_layout()
    plt.savefig("epitope_relevant_mutations_heatmap.png", dpi=300, bbox_inches="tight")
    plt.show()


# ==========================================
# Analysis 6: Positional Mapping of Epitopes
```

```
# ==========================================
def analyze_positional_mapping(epitope_file, variant_epitope_file, mutation_file,
output_image="positional_mapping.png"):
    epitopes_df = pd.read_excel(epitope_file)
    epitopes_df.columns = epitopes_df.columns.str.strip()
    variant_epitopes_df = pd.read_excel(variant_epitope_file)
    variant_epitopes_df.columns = variant_epitopes_df.columns.str.strip()
    mutations_df = pd.read_excel(mutation_file)
    mutations_df.columns = mutations_df.columns.str.strip()
    variants = list(mutations_df.columns)

    mutated_present_dict = {}
    for variant in variants:
        mut_list = mutations_df[variant].dropna().astype(str).tolist()
        mutated, unmutated = get_mutated_epitopes(epitopes_df, mut_list)
        experimental_set =
set(variant_epitopes_df[variant].dropna().astype(str).tolist())
        mutated_present_dict[variant] = mutated & experimental_set

    # Export
    output_df = pd.DataFrame(dict([(k, pd.Series(list(v))) for k, v in
mutated_present_dict.items()]))
    output_df.to_excel("mutated_but_present_epitopes.xlsx", index=False)
    print("Exported mutated-but-present epitopes to
'mutated_but_present_epitopes.xlsx'")


    # Positional mapping visualization (with RBD highlight)

    plt.figure(figsize=(14, 7))

    # Define colors
    colors = {
        "conserved": "mediumseagreen",      # conserved epitopes
        "present": "gold",                  # mutated but still present
        "absent": "firebrick"               # mutated and absent
    }

    # Legend elements
    legend_elements = [
        Line2D([0], [0], color=colors["conserved"], lw=6, label="Conserved"),
        Line2D([0], [0], color=colors["present"], lw=6, label="Mutated but Present"),
        Line2D([0], [0], color=colors["absent"], lw=6, label="Mutated and Absent"),
    ]

    # --- RBD region highlight (aa 319-541) ---
    plt.axvspan(319, 541, color="lightcoral", alpha=0.2, label="RBD region")

    for i, variant in enumerate(variants):
        exp_epitopes = set(variant_epitopes_df[variant].dropna().astype(str).tolist())
        mutated_set, _ = get_mutated_epitopes(epitopes_df,
mutations_df[variant].dropna().astype(str).tolist())

        for _, row in epitopes_df.iterrows():
            start, end, seq = row["Mapped Start Position"], row["Mapped End Position"],
row["Epitope Sequence"]

            # Classification rules
            if seq not in mutated_set and seq in exp_epitopes:
                color = colors["conserved"]
            elif seq in mutated_set and seq in exp_epitopes:
                color = colors["present"]
            elif seq in mutated_set and seq not in exp_epitopes:
                color = colors["absent"]
            else:
                continue  # skip epitopes absent in both sets

            # Draw horizontal bars for each epitope
            plt.plot([start, end], [i, i], color=color, linewidth=20)

    # Y-axis labels = variants
    plt.yticks(range(len(variants)), variants)

    # Axis labels and title
    plt.xlabel("Ancestral Spike Protein Position (aa)")
```

```
    plt.ylabel("Variants")
    plt.title("Positional Mapping of Epitopes Across Variants", fontsize=14,
weight="regular")

    # Legend placement (merged RBD region info automatically if same label)
    plt.legend(
        handles=legend_elements + [Line2D([0], [0], color="lightcoral", lw=6, alpha=0.5,
label="RBD region")],
        loc='upper center',
        bbox_to_anchor=(0.5, 1.15),
        ncol=4,
        frameon=False
    )

    # Save + show
    plt.savefig("positional_mapping_with_RBD.png", dpi=300, bbox_inches="tight")
    plt.show()


# ============================================
# Main Execution
# ============================================
if __name__ == "__main__":
    # Epitope overlaps
    analyze_epitope_overlap("variant_epitopes_only.xlsx", include_ancestral=False)
    analyze_epitope_overlap("CD8_variant_epitopes.xlsx", include_ancestral=True)

    # Epitope preservation and variant-specific
    analyze_epitope_preservation("CD8_variant_epitopes.xlsx", show_unmatched=True)

    # Shared mutations across variants
    analyze_shared_mutations("variant_mutations.xlsx")

    # Impact of variant-defining mutations
    analyze_variant_defining_mutations("CD8_epitopes.xlsx", "variant_mutations.xlsx")

    # New positional mapping
    analyze_positional_mapping("CD8_epitopes.xlsx", "CD8_variant_epitopes.xlsx",
"variant_mutations.xlsx")
```

Kod 2: Her bir varyanta özgü Peptit-HLA allel çiftlerinin bağlanma güçlerindeki değişimlerin (fold change) analizi, sınıflandırılması ve korunan (preserved) epitopların tespiti

```
# Fold change analysis, Binding Strength Change Classification, Preserved vs.
Unique Peptide-Allele Pairs

import pandas as pd
import numpy as np
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

# --- SETTINGS ---
PERCENTILE_COLUMN = 'netmhcpan_el percentile'
PEPTIDE_COL = 'peptide'
ALLELE_COL = 'allele'
STRONG_BINDER_THRESHOLD = 1

# --- File names ---
variant_files = {
    "BA.2.86": "ba286.tsv",
    "JN.1": "jn1.tsv",
    "LP.8.1": "lp81.tsv",
    "NB.1.8.1": "nb181.tsv",
    "XEC": "xec.tsv"
```

```
}
ancestral_file = "ancestral.tsv"

# --- Custom colors ---
custom_palette = {
    "Increased": "#D9414E",
    "Decreased": "#BBE4B5",
    "Unchanged": "#007994"
}
preserved_palette = ["#BBE4B5", "#007994"]

# --- Load ancestral data ---
ancestral_df = pd.read_csv(ancestral_file, sep="\t")
ancestral_df = ancestral_df[ancestral_df[PERCENTILE_COLUMN] <=
STRONG_BINDER_THRESHOLD]
ancestral_df["pair"] = ancestral_df[PEPTIDE_COL] + "_" +
ancestral_df[ALLELE_COL]
ancestral_pairs = ancestral_df.set_index("pair")[PERCENTILE_COLUMN]

# --- Initialize summary list ---
summary_data = []
variant_pair_sets = []

sns.set(style="whitegrid")

# --- Fold change analysis ---
for variant, file in variant_files.items():
    variant_df = pd.read_csv(file, sep="\t")
    variant_df = variant_df[variant_df[PERCENTILE_COLUMN] <=
STRONG_BINDER_THRESHOLD]
    variant_df["pair"] = variant_df[PEPTIDE_COL] + "_" +
variant_df[ALLELE_COL]
    variant_pairs = variant_df.set_index("pair")[PERCENTILE_COLUMN]
    variant_pair_sets.append(set(variant_pairs.index))

    # Match with ancestral
    shared = ancestral_pairs.index.intersection(variant_pairs.index)
    fold_changes = variant_pairs[shared] / ancestral_pairs[shared]

    # Classify fold change
    def classify(fc):
        if np.isclose(fc, 1.0, atol=0.1):
            return "Unchanged"
        elif fc < 1:
            return "Decreased"
        else:
            return "Increased"

    categories = fold_changes.apply(classify)

    # Count categories
    counts = categories.value_counts().to_dict()
    summary_data.append({
        "Variant": variant,
        "Shared_Pairs": len(shared),
        "Increased": counts.get("Increased", 0),
        "Decreased": counts.get("Decreased", 0),
        "Unchanged": counts.get("Unchanged", 0)
    })

    # Plot histogram of fold changes
    plt.figure(figsize=(6, 4))
    sns.histplot(np.log2(fold_changes), bins=30, kde=True, color="#007994")
    plt.axvline(0, color="black", linestyle="--")
    plt.title(f"Log2 Fold Change: {variant} vs. Ancestral")
    plt.xlabel("Log2(Fold Change of Binding Percentile)")
    plt.ylabel("Peptide-Allele Pair Count")
```

```
    plt.tight_layout()
    plt.show()

# --- Summary Table ---
summary_df = pd.DataFrame(summary_data)

# --- Plot summary bar chart ---
variant_order = ["BA.2.86", "JN.1", "LP.8.1", "NB.1.8.1", "XEC"]

summary_df_melted = summary_df.melt(
    id_vars=["Variant"],
    value_vars=["Increased", "Decreased", "Unchanged"],
    var_name="Change", value_name="Count"
)

plt.figure(figsize=(8, 5))
sns.barplot(
    data=summary_df_melted,
    x="Variant", y="Count", hue="Change",
    order=variant_order,
    palette=custom_palette
)
plt.title("Binding Strength Change Classification")
plt.ylabel("Peptide-Allele Pair Count")
plt.tight_layout()
plt.show()

# --- Preserved epitope-allele pairs across all variants + ancestral ---
common_preserved_pairs =
set(ancestral_pairs.index).intersection(*variant_pair_sets)
print(f"\nNumber of preserved peptide-allele pairs across all:
{len(common_preserved_pairs)}")

# --- Plot preserved vs. unique counts ---
preserved_counts = {
    "Preserved in All": len(common_preserved_pairs),
    "Unique": len(set.union(*variant_pair_sets, set(ancestral_pairs.index))) -
len(common_preserved_pairs)
}
plt.figure(figsize=(5, 4))
sns.barplot(x=list(preserved_counts.keys()),
y=list(preserved_counts.values()), palette=preserved_palette)
plt.title("Preserved vs. Unique Peptide-Allele Pairs")
plt.ylabel("Count")
plt.xticks(rotation=0)
plt.tight_layout()
plt.show()

# --- Save summary table ---
summary_df.to_csv("summary_table.tsv", sep="\t", index=False)
```

Kod 3: SARS-CoV-2 varyantları genelinde peptit-HLA çiftlerinin paylaşımı, epitop dağılımları ve mutasyon örtüşme pozisyonlarını inceleyen karşılaştırmalı görselleştirme hattı

```
# ============================================================
# SARS-CoV-2 Epitope Analysis + Visualization Pipeline
# ============================================================
# Combined analyses:
# 1. Shared peptide-HLA pairs across variants (UpSet)
# 2. Per-variant histograms (epitope distribution per allele)
```

```
# 3. Grouped comparison across variants
# 4. Preserved peptide-HLA pairs across all variants
# 5. Mutation overlap of epitope-HLA pairs per variant
# 6. Affected epitope-HLA pair lists
# 7. Pie charts of affected vs unaffected epitopes
# 8. Heatmap of mutation overlap across variants
# ============================================================

# %pip install upsetplot pandas matplotlib seaborn openpyxl

%pip install upsetplot

import os
import re
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
from upsetplot import UpSet, from_memberships

# ============================================================
# COMMON SETTINGS
# ============================================================
files = {
    "Ancestral": "ancestral.tsv",
    "BA.2.86": "ba286.tsv",
    "JN.1": "jn1.tsv",
    "NB.1.8.1": "nb181.tsv",
    "LP.8.1": "lp81.tsv",
    "XEC": "xec.tsv",
}

colors = {
    "Ancestral": "#552D50",
    "BA.2.86": "#CB555D",
    "JN.1": "#F3AC67",
    "NB.1.8.1": "#99BDB7",
    "LP.8.1": "#1C646B",
    "XEC": "#A53852",
}

STRONG_BINDER_THRESHOLD = 1
PERCENTILE_COL = "netmhcpan_el percentile"
PEPTIDE_COL = "peptide"
ALLELE_COL = "allele"
START_COL = "start"
END_COL = "end"

mutations_df = pd.read_excel("variant_mutations.xlsx")

# ============================================================
# 1. LOAD DATA FOR VARIANT COMPARISON + UPSET ANALYSIS
# ============================================================
variant_sets = {}   # For UpSet plots
allele_dfs = []     # For per-variant and grouped comparisons

for variant, filepath in files.items():
    if not os.path.exists(filepath):
        print(f"File {filepath} not found, skipping.")
        continue

    df = pd.read_csv(filepath, sep="\t")

    # For UpSet plot
    variant_sets[variant] = set(df[PEPTIDE_COL] + "_" + df[ALLELE_COL])

    # For histograms and comparison
```

```
    allele_counts =
df.groupby(ALLELE_COL)[PEPTIDE_COL].nunique().reset_index()
    allele_counts["Variant"] = variant
    allele_dfs.append(allele_counts)

# ============================================================
# 2. UPSET PLOT - Shared peptide-allele pairs across variants
# ============================================================
all_pairs = set().union(*variant_sets.values())
memberships = [[v for v, s in variant_sets.items() if pair in s] for pair in
all_pairs]
data = from_memberships(memberships)

plt.figure(figsize=(18, 6))
UpSet(data, subset_size="count", show_counts=True, sort_categories_by="-
input").plot()
plt.suptitle("Shared Peptide-HLA Allele Pairs Across Variants", fontsize=12)
plt.tight_layout()
plt.show()

# ============================================================
# 3. PER-VARIANT HISTOGRAMS (Epitope counts per allele)
# ============================================================
for allele_counts in allele_dfs:
    variant = allele_counts["Variant"].iloc[0]
    counts =
allele_counts.groupby(ALLELE_COL)[PEPTIDE_COL].sum().sort_values(ascending=Fal
se)

    plt.figure(figsize=(12, 6))
    ax = counts.plot(kind="bar", color="#007994")
    plt.title(f"Distribution of Strong-Binding Epitopes per HLA Class I
Allele\n{variant}", fontsize=14)
    plt.xlabel("HLA Class I Allele", fontsize=12)
    plt.ylabel("Number of Unique Epitopes", fontsize=12)
    plt.xticks(rotation=90)
    ax.set_axisbelow(True)
    plt.grid(True, color="lightgray", linestyle="-", linewidth=0.7)
    plt.tight_layout()
    plt.show()

# ============================================================
# 4. GROUPED BAR CHART (Comparison across variants)
# ============================================================
all_data = pd.concat(allele_dfs, ignore_index=True)
pivot_data = all_data.pivot(index=ALLELE_COL, columns="Variant",
values=PEPTIDE_COL).fillna(0)

pivot_data["Total"] = pivot_data.sum(axis=1)
pivot_data = pivot_data.sort_values("Total",
ascending=False).drop(columns="Total")

ax = pivot_data.plot(
    kind="bar",
    figsize=(14, 7),
    width=0.8,
    color=[colors[col] for col in pivot_data.columns]
)
plt.title("Comparison of Strong-Binding Epitope Counts Across Variants per
HLA-I Allele", fontsize=14)
plt.xlabel("HLA Class I Allele", fontsize=12)
plt.ylabel("Number of Unique Epitopes", fontsize=12)
plt.xticks(rotation=90)
plt.legend(title="Variant", bbox_to_anchor=(1.05, 1), loc="upper left")
ax.set_axisbelow(True)
ax.grid(True, color="lightgray", linestyle="-", linewidth=0.7)
plt.savefig("epitope_variant_comparison.png", dpi=300, bbox_inches="tight")
```

```
plt.show()

# ============================================================
# 5. PRESERVED PEPTIDE-HLA PAIRS ACROSS ALL VARIANTS
# ============================================================
pair_sets = {}
for name, file in files.items():
    df = pd.read_csv(file, sep="\t")
    df = df[df[PERCENTILE_COL] <= STRONG_BINDER_THRESHOLD]
    df["pair"] = df[PEPTIDE_COL] + "_" + df[ALLELE_COL]
    pair_sets[name] = set(df["pair"])

preserved_all = set.intersection(*pair_sets.values())
print(f"Number of peptide-HLA pairs preserved in ancestral + all variants:
{len(preserved_all)}")

preserved_df = pd.DataFrame(list(preserved_all), columns=["Peptide_HLA_Pair"])
preserved_df[['Peptide', 'HLA']] =
preserved_df['Peptide_HLA_Pair'].str.split('_', n=1, expand=True)
preserved_path = "preserved_pairs_all_variants.xlsx"
preserved_df.to_excel(preserved_path, index=False)
print(f"Saved preserved pairs as {preserved_path}")

# ============================================================
# 6. MUTATION OVERLAP + AFFECTED PAIRS PER VARIANT
# ============================================================
def check_overlap(epitope_start, epitope_end, mutation_list):
    for mut in mutation_list:
        match = re.search(r"(\d+)", str(mut))
        if match:
            pos = int(match.group(1))
            if epitope_start <= pos <= epitope_end:
                return True
    return False

variant_output_files = {}

for variant, file in files.items():
    df = pd.read_csv(file, sep="\t")
    df = df[df[PERCENTILE_COL] <= STRONG_BINDER_THRESHOLD].copy()

    if variant != "Ancestral":
        mutation_list = mutations_df[variant].dropna().tolist()
        df["MutationOverlap"] = df.apply(
            lambda row: check_overlap(row[START_COL], row[END_COL],
mutation_list), axis=1
        )
    else:
        df["MutationOverlap"] = False

    variant_full_path = f"{variant}_mutation_overlap.xlsx"
    df.to_excel(variant_full_path, index=False)
    variant_output_files[variant] = variant_full_path
    print(f"Saved {variant_full_path} with mutation overlaps")

    affected_df = df[df["MutationOverlap"] == True].copy()
    if not affected_df.empty:
        affected_path = f"{variant}_affected_epitope_HLA_pairs.xlsx"
        affected_df.to_excel(affected_path, index=False)
        print(f"Saved {affected_path} ({len(affected_df)} affected pairs)")
    else:
        print(f"No affected epitopes found for {variant}")

# ============================================================
# 7. PIE CHARTS OF AFFECTED VS UNAFFECTED EPITOPES
# ============================================================
def make_autopct(values):
```

```
    def my_autopct(pct):
        return '{:.1f}%'.format(pct)
    return my_autopct

for variant, excel_file in variant_output_files.items():
    df = pd.read_excel(excel_file)
    counts = df["MutationOverlap"].value_counts()
    affected = counts.get(True, 0)
    unaffected = counts.get(False, 0)

    plt.figure(figsize=(5, 5))
    wedges, texts, autotexts = plt.pie(
        [affected, unaffected],
        labels=[f"Affected ({affected})", f"Unaffected ({unaffected})"],
        colors=["#007994", "#BBE4B5"],
        autopct=make_autopct([affected, unaffected]),
        startangle=90
    )
    for autotext in autotexts:
        autotext.set_color('white')
        autotext.set_fontweight('regular')

    plt.title(f"{variant}: Strong-Binding Epitopes Affected by Mutations")
    plt.tight_layout()
    plt.show()

# ============================================================
# 8. HEATMAP OF MUTATION OVERLAP ACROSS VARIANTS
# ============================================================
heatmap_df = pd.DataFrame()

for variant, file in variant_output_files.items():
    if variant == "Ancestral":
        continue
    df = pd.read_excel(file)
    df["Peptide_HLA"] = df[PEPTIDE_COL] + "_" + df[ALLELE_COL]
    df["MutationOverlap"] = df["MutationOverlap"].fillna(False)
    agg = df.groupby("Peptide_HLA")["MutationOverlap"].any()
    heatmap_df[variant] = agg

heatmap_df = heatmap_df.fillna(False)
heatmap_data = heatmap_df.astype(int)
heatmap_data = heatmap_data[heatmap_data.sum(axis=1) > 0]

# Add a check here to prevent plotting an empty DataFrame
if not heatmap_data.empty:
    plt.figure(figsize=(12, max(6, 0.2 * len(heatmap_data))))
    sns.heatmap(
        heatmap_data,
        cmap="YlGnBu",
        cbar=False,
        linewidths=0.5,
        linecolor='white'
    )
    plt.title("Variant-Defining Mutation Overlap with Strong-Binding Epitope-
HLA Pairs")
    plt.xlabel("Variants")
    plt.ylabel("Peptide-HLA Pairs")
    plt.yticks(rotation=0)
    plt.tight_layout()
    plt.show()
else:
    print("\nNo peptide-HLA pairs with mutation overlap across variants to
plot heatmap.")
```

Kod 4: CD8+ T hücresi epitop-HLA çiftlerinin varyant bazlı kayıp analizi, korunma durumlarının karşılaştırılması ve Spike proteini üzerindeki konumsal/bölgesel (domain) haritalaması

```
# ============================================================
# CD8 T CELL EPITOPE-HLA ALLELE PAIR ANALYSIS PIPELINE
# ============================================================
# ANALYSES
# 1. Variant-specific loss counts (bar chart)
# 2. Pairs preserved in JN.1/BA.2.86 but lost in all newer variants (heatmap)
# 3. Alternative check: BA.2.86/JN.1 preserved but lost in newer variants
# 4. Positional mapping of lost epitopes (JN.1 reference)
# 5. Domain mapping & summary plots for lost epitopes (mapping to a Spike
reference)
# ============================================================

# ============================================================
# 1. IMPORTS
# ============================================================
import os
import glob
from pathlib import Path
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns

# Instaling Required Packages
try:
    # Install Biopython if not already installed
    %pip install biopython
    from Bio import SeqIO
except Exception as e:
    raise ImportError("Biopython is required for sequence parsing. Install it
with: pip install biopython") from e

# ============================================================
# 2. FILE PATHS FOR VARIANT DATA
# ============================================================
variant_files = {
    "Ancestral": "ancestral.tsv",
    "BA.2.86": "ba286.tsv",
    "JN.1": "jn1.tsv",
    "LP.8.1": "lp81.tsv",
    "NB.1.8.1": "nb181.tsv",
    "XEC": "xec.tsv"
}

# Validate variant files exist
for v, p in variant_files.items():
    if not Path(p).exists():
        print(f"Warning: variant file for {v} not found at '{p}'. Make sure
the file exists before running that section.")

# ============================================================
# 3. VARIANT-SPECIFIC LOSS COUNTS (BAR CHART)
# ============================================================
# Collect all *_lost_pairs.tsv files (these are expected outputs from other
parts of the workflow)
lost_files = glob.glob("*_lost_pairs.tsv")
loss_data = []
for file in lost_files:
    variant = os.path.basename(file).replace("_lost_pairs.tsv", "")
    try:
        df = pd.read_csv(file, sep="\t", dtype=str)
```

```
        lost_count = len(df)
    except Exception:
        lost_count = 0
    loss_data.append({"Variant": variant, "Lost Pairs": lost_count})

loss_df = pd.DataFrame(loss_data)
if not loss_df.empty:
    loss_df = loss_df.sort_values("Variant")

    plt.figure(figsize=(8, 5))
    bars = plt.bar(loss_df["Variant"], loss_df["Lost Pairs"], color="#007994",
zorder=3)
    plt.ylabel("Number of Ancestral Epitope-Allele Pairs Lost")
    plt.title("Variant-Specific Losses from Ancestral Spike Epitope Set")
    plt.grid(axis='y', linestyle='--', alpha=0.7, zorder=0)

    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        plt.text(bar.get_x() + bar.get_width() / 2, height - 0.05*height,
                 f"{int(height)}", ha='center', va='top', color='white',
fontsize=10)
    plt.tight_layout()
    plt.show()
else:
    print("No '*_lost_pairs.tsv' files found — skipping variant-specific loss
counts plot.")

# ============================================================
# 4. PAIRS PRESERVED IN JN.1 / BA.2.86 BUT LOST IN ALL NEWER VARIANTS
(HEATMAP)
# ============================================================
# Load per-variant peptide/HLA pairs (as tuples)
variant_pairs = {}
for variant, filepath in variant_files.items():
    if Path(filepath).exists():
        df = pd.read_csv(filepath, sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
        # Expect columns named 'peptide' and 'allele'
        if "peptide" not in df.columns or "allele" not in df.columns:
            print(f"Warning: '{filepath}' does not contain both 'peptide' and
'allele' columns.")
            variant_pairs[variant] = set()
        else:
            df["peptide"] = df["peptide"].astype(str).str.strip()
            df["allele"] = df["allele"].astype(str).str.strip()
            variant_pairs[variant] = set(zip(df["peptide"], df["allele"]))
    else:
        variant_pairs[variant] = set()

# Define reference set as union of JN.1 and BA.2.86
reference_pairs = variant_pairs.get("JN.1",
set()).union(variant_pairs.get("BA.2.86", set()))

# Find pairs present in reference but absent in LP.8.1, NB.1.8.1, XEC
lost_in_all_newer = [
    pair for pair in reference_pairs
    if pair not in variant_pairs.get("LP.8.1", set())
    and pair not in variant_pairs.get("NB.1.8.1", set())
    and pair not in variant_pairs.get("XEC", set())
]

print(f"Number of epitope-HLA pairs preserved in JN.1/BA.2.86 but lost in all
newer variants: {len(lost_in_all_newer)}")

if lost_in_all_newer:
    heatmap_df = pd.DataFrame(index=[f"{pep}_{hla}" for pep, hla in
lost_in_all_newer])
```

```
    variant_order = ["Ancestral", "BA.2.86", "JN.1", "LP.8.1", "NB.1.8.1",
"XEC"]
    for variant in variant_order:
        pairs = variant_pairs.get(variant, set())
        heatmap_df[variant] = heatmap_df.index.map(lambda x:
tuple(x.split("_")) in pairs)
    heatmap_data = heatmap_df.astype(int)

    plt.figure(figsize=(10, max(1, 0.25*len(heatmap_data))))
    sns.heatmap(heatmap_data, cmap=["#ffffd9", "#007994"], cbar=False,
linewidths=0.4, linecolor='#1a517d')
    plt.title("Epitope-HLA Pairs: Preserved in JN.1/BA.2.86 but Lost in All
Newer Variants")
    plt.xlabel("Variants")
    plt.ylabel("Peptide-HLA Pairs")
    plt.yticks(rotation=0, fontsize=6)
    plt.tight_layout()
    plt.show()

    # Save list for downstream use
    lost_df = pd.DataFrame([tuple(x.split("_")) for x in heatmap_df.index],
columns=["peptide", "allele"])
    lost_df.to_csv("lost_in_all_newer.tsv", sep="\t", index=False)
    print("Saved lost_in_all_newer.tsv")
else:
    print("No pairs found for the 'preserved in JN.1/BA.2.86 but lost in all
newer variants' analysis.")

# ============================================================
# 5. ALTERNATIVE CHECK: BA.2.86/JN.1 PRESERVED BUT LOST IN NEWER VARIANTS
# ============================================================
variant_pairs_str = {}
for variant, filepath in variant_files.items():
    if Path(filepath).exists():
        df = pd.read_csv(filepath, sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
        if "peptide" in df.columns and "allele" in df.columns:
            variant_pairs_str[variant] =
set(df["peptide"].astype(str).str.strip() + "_" +
df["allele"].astype(str).str.strip())
        else:
            variant_pairs_str[variant] = set()
    else:
        variant_pairs_str[variant] = set()

preserved_old = variant_pairs_str.get("BA.2.86",
set()).intersection(variant_pairs_str.get("JN.1", set()))
lost_newer = preserved_old - (variant_pairs_str.get("LP.8.1", set()) |
variant_pairs_str.get("NB.1.8.1", set()) | variant_pairs_str.get("XEC",
set()))

if len(lost_newer) == 0:
    print("No epitope-HLA pairs were found that are preserved in BA.2.86/JN.1
but lost in newer variants.")
else:
    heatmap_df2 = pd.DataFrame(index=sorted(lost_newer),
columns=variant_files.keys())
    for variant in variant_files.keys():
        heatmap_df2[variant] =
heatmap_df2.index.isin(variant_pairs_str.get(variant, set()))
    heatmap_data2 = heatmap_df2.astype(int)

    plt.figure(figsize=(10, max(6, 0.3 * len(heatmap_data2))))
    sns.heatmap(heatmap_data2, cmap=["#ffffd9", "#007994"], cbar=False,
linewidths=0.5, linecolor='#1a517d')
    plt.title("Epitope-HLA Pairs Preserved in BA.2.86/JN.1 but Lost in Newer
Variants")
```

```
    plt.xlabel("Variants")
    plt.ylabel("Epitope-HLA Pairs")
    plt.yticks(rotation=0)
    plt.tight_layout()
    plt.show()

# ============================================================
# 6. POSITIONAL MAPPING OF LOST EPITOPE-HLA PAIRS (JN.1 REFERENCE)
# ============================================================
variant_pairs_pos = {}
for variant, filepath in variant_files.items():
    if Path(filepath).exists():
        df = pd.read_csv(filepath, sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
        if "peptide" in df.columns and "allele" in df.columns:
            df["Peptide_HLA"] = df["peptide"].astype(str).str.strip() + "_" +
df["allele"].astype(str).str.strip()
            variant_pairs_pos[variant] = set(df["Peptide_HLA"])
        else:
            variant_pairs_pos[variant] = set()
    else:
        variant_pairs_pos[variant] = set()

# This logic is now consistent with Section 4/7:
# (JN.1 OR BA.2.86) - (LP.8.1 OR NB.1.8.1 OR XEC)
lost_pairs = (variant_pairs_pos.get("JN.1", set()) |
variant_pairs_pos.get("BA.2.86", set())) - \
             (variant_pairs_pos.get("LP.8.1", set()) |
variant_pairs_pos.get("NB.1.8.1", set()) | \
              variant_pairs_pos.get("XEC", set()))

print(f"Number of lost pairs (JN.1 or BA.2.86, but not in newer):
{len(lost_pairs)}")

# Attempt to read JN.1 reference fasta
jn1_fasta = "JN.1_reference.fasta"
if Path(jn1_fasta).exists():
    jn1_record = SeqIO.read(jn1_fasta, "fasta")
    jn1_seq = str(jn1_record.seq)
else:
    print(f"Warning: '{jn1_fasta}' not found. Positional mapping section will
be skipped unless you provide the file.")
    jn1_seq = None

lost_positions = []
if jn1_seq:
    # === MODIFIED SECTION ===
    # Load BOTH ancestral and BA.2.86 data to find positions, as
    # the lost_pairs set is a union of epitopes from both sources.

    ancestral_pos_df = pd.DataFrame()
    ba286_pos_df = pd.DataFrame()

    required_cols = ["peptide", "allele", "start", "end"]

    if Path("ancestral.tsv").exists():
        try:
            ancestral_pos_df = pd.read_csv("ancestral.tsv", sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
            if not all(col in ancestral_pos_df.columns for col in
required_cols):
                print("Warning: 'ancestral.tsv' is missing required coordinate
columns. Will not be used for mapping.")
                ancestral_pos_df = pd.DataFrame() # Reset if bad
        except Exception as e:
            print(f"Error reading 'ancestral.tsv': {e}")
            ancestral_pos_df = pd.DataFrame()
```

```
    else:
        print("Warning: 'ancestral.tsv' not found. Cannot map ancestral-
derived pairs.")

    if Path("ba286.tsv").exists():
        try:
            ba286_pos_df = pd.read_csv("ba286.tsv", sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
            if not all(col in ba286_pos_df.columns for col in required_cols):
                print("Warning: 'ba286.tsv' is missing required coordinate
columns. Will not be used for mapping.")
                ba286_pos_df = pd.DataFrame() # Reset if bad
        except Exception as e:
            print(f"Error reading 'ba286.tsv': {e}")
            ba286_pos_df = pd.DataFrame()
    else:
        print("Warning: 'ba286.tsv' not found. Cannot map BA.2.86-derived
pairs.")

    # Combine the position data
    combined_pos_df = pd.concat([ancestral_pos_df, ba286_pos_df])

    if combined_pos_df.empty or not all(col in combined_pos_df.columns for col
in required_cols):
         print(f"Warning: No valid position data found in 'ancestral.tsv' or
'ba286.tsv'. Cannot perform positional mapping.")
         lost_pos_data = pd.DataFrame() # Create empty DataFrame to skip
mapping
    else:
        # Ensure only columns we know exist are kept
        combined_pos_df = combined_pos_df[required_cols]
        combined_pos_df["Peptide_HLA"] =
combined_pos_df["peptide"].astype(str).str.strip() + "_" +
combined_pos_df["allele"].astype(str).str.strip()
        # Keep the first match for any pair (in case it's in both)
        combined_pos_df.drop_duplicates(subset="Peptide_HLA", keep="first",
inplace=True)

        # Filter for the identified lost pairs and get their positions
        lost_pos_data =
combined_pos_df[combined_pos_df["Peptide_HLA"].isin(lost_pairs)].copy()
    # === END OF MODIFIED SECTION ===

    if not lost_pos_data.empty:
        # Use the start and end columns from the combined data
        lost_positions_df = lost_pos_data[["peptide", "allele", "start",
"end"]].copy()
        lost_positions_df.rename(columns={"peptide": "Peptide", "allele":
"HLA", "start": "Start", "end": "End"}, inplace=True)
        lost_positions_df["Start"] = pd.to_numeric(lost_positions_df["Start"],
errors='coerce')
        lost_positions_df["End"] = pd.to_numeric(lost_positions_df["End"],
errors='coerce')
        lost_positions_df.dropna(subset=["Start", "End"], inplace=True) # Drop
rows with invalid positions

        if not lost_positions_df.empty:
            lost_positions_df.to_excel("Lost_Epitopes_Positions_JN1.xlsx",
index=False)
            print("Positional mapping saved to
Lost_Epitopes_Positions_JN1.xlsx")

            # Simple positional plot
            plt.figure(figsize=(12, 2))
            plt.hlines(1, 1, len(jn1_seq), colors="dimgray",
linestyles="dashed")
            for _, row in lost_positions_df.iterrows():
```

```
                plt.hlines(1, row["Start"], row["End"], colors="#007994",
linewidth=10)
            plt.title("Positional Mapping of Lost Epitopes (JN.1/BA.2.86
Preserved, Newer Lost)", fontsize=14)
            plt.xlabel("Spike Protein Position (JN.1 reference)")
            plt.yticks([])
            plt.tight_layout()
            plt.show()
        else:
            print("No lost pairs with valid positions found for positional
mapping.")
    else:
        print("No lost pairs found in combined ancestral/BA.2.86 data for
positional mapping.")
else:
    print("Skipping JN.1 positional plotting (no JN.1 reference sequence
available).")

# ============================================================
# 7. DOMAIN MAPPING & SUMMARY PLOTS FOR LOST EPITOPE-HLA PAIRS
# ============================================================
# Use a lost-pairs input for mapping:
# Prefer the pipeline-created 'lost_in_all_newer.tsv' if present; otherwise
expect 'lost_pairs.tsv'.
if Path("lost_in_all_newer.tsv").exists():
    lost_pairs_path = "lost_in_all_newer.tsv"
elif Path("lost_pairs.tsv").exists():
    lost_pairs_path = "lost_pairs.tsv"
else:
    lost_pairs_path = None
    print("No lost pairs input file found ('lost_in_all_newer.tsv' or
'lost_pairs.tsv'). Skipping domain mapping section.")

# Domain definitions for Spike (Wuhan-Hu-1 canonical coords; 1-based
inclusive)
domains = {
    "Signal peptide": (1, 13),
    "NTD": (14, 305),
    "RBD": (319, 541),
    "RBM": (437, 508),
    "Furin cleavage / S1/S2": (681, 686),
    "S2 (ecto)": (686, 1208),
    "TM": (1213, 1237),
    "CT": (1238, 1273)
}

def read_fasta_sequence(path):
    seq_lines = []
    with open(path, "r") as fh:
        for line in fh:
            if line.startswith(">"):
                continue
            seq_lines.append(line.strip())
    return "".join(seq_lines)

if lost_pairs_path:
    # Attempt to find a spike reference fasta to map against. Prefer
spike_reference.fasta, fallback to JN.1_reference.fasta
    if Path("spike_reference.fasta").exists():
        spike_fasta_path = "spike_reference.fasta"
    elif Path("JN.1_reference.fasta").exists():
        spike_fasta_path = "JN.1_reference.fasta"
    else:
        spike_fasta_path = None
        print("No spike FASTA found (checked 'spike_reference.fasta' and
'JN.1_reference.fasta'). Provide a FASTA or set 'spike_seq' variable inline.")
```

```
    if spike_fasta_path:
        spike_seq = read_fasta_sequence(spike_fasta_path).upper()
        print(f"Loaded spike sequence from {spike_fasta_path} (length
{len(spike_seq)} aa).")
    else:
        spike_seq = None

    # Load lost pairs table
    if spike_seq is not None:
        mp_df = pd.read_csv(lost_pairs_path, sep="\t",
dtype=str).rename(columns=str.strip)
        if "peptide" not in mp_df.columns:
            raise ValueError("Input lost pairs file must contain a 'peptide'
column.")
        if "allele" not in mp_df.columns:
            mp_df["allele"] = ""
        mp_df["peptide"] =
mp_df["peptide"].astype(str).str.strip().str.upper()

        # mapping helper
        def find_all_matches(seq, peptide):
            matches = []
            start_idx = 0
            while True:
                idx = seq.find(peptide, start_idx)
                if idx == -1:
                    break
                matches.append((idx+1, idx+len(peptide)))  # 1-based
                start_idx = idx + 1
            return matches

        rows = []
        has_coords = ("start" in mp_df.columns) and ("end" in mp_df.columns)
        for _, row in mp_df.iterrows():
            pep = row["peptide"].upper()
            allele = row.get("allele", "")
            matches = []

            # If coords present and valid, use them
            if has_coords and pd.notna(row.get("start")) and
pd.notna(row.get("end")):
                try:
                    s = int(row["start"])
                    e = int(row["end"])
                    if 1 <= s <= e <= len(spike_seq):
                        matches = [(s, e)]
                except Exception:
                    matches = []

            # Otherwise search sequence
            if not matches:
                matches = find_all_matches(spike_seq, pep)

            if not matches:
                rows.append({
                    "peptide": pep,
                    "allele": allele,
                    "matches_count": 0,
                    "matched_positions": "",
                    "domain_list": "",
                    "notes": "not_found_in_reference"
                })
            else:
                pos_strs = []
                domain_set = set()
                for s, e in matches:
                    pos_strs.append(f"{s}-{e}")
```

```
                    for dname, (ds, de) in domains.items():
                        if not (e < ds or s > de):
                            domain_set.add(dname)
                rows.append({
                    "peptide": pep,
                    "allele": allele,
                    "matches_count": len(matches),
                    "matched_positions": ";".join(pos_strs),
                    "domain_list": ";".join(sorted(domain_set)),
                    "notes": ""
                })

        mapped_df = pd.DataFrame(rows)
        # Merge original columns (if any extras) for convenience
        mapped_df = pd.concat([mp_df.reset_index(drop=True),
mapped_df.drop(columns=["peptide", "allele"])], axis=1)

        # Save mapping outputs
        mapped_df.to_csv("lost_pairs_mapped.tsv", sep="\t", index=False)
        mapped_df.to_excel("lost_pairs_mapped.xlsx", index=False)
        print(f"Saved mapped results to lost_pairs_mapped.tsv and
lost_pairs_mapped.xlsx (rows: {len(mapped_df)})")

        # Create summary plots (if any mapped)
        found = mapped_df[mapped_df["matches_count"].astype(int) > 0].copy()
        if not found.empty:
            found["first_start"] =
found["matched_positions"].str.split(";").str[0].str.split("-
").str[0].astype(int)

            # Histogram of start positions
            plt.figure(figsize=(10, 5))
            counts, bins, patches = plt.hist(found["first_start"], bins=30,
edgecolor="black", color="#007994")
            plt.xlabel("Spike amino acid position (reference, 1-based)")
            plt.ylabel("Number of epitopes")
            plt.title("Distribution of mapped epitope start positions")
            plt.grid(axis="y", linestyle="--", color="gray", alpha=0.7,
zorder=0)
            for patch in patches:
                patch.set_zorder(3)
            # Add numeric labels for non-zero bars (center of bins)
            bin_width = bins[1] - bins[0] if len(bins) > 1 else 1
            for idx, cnt in enumerate(counts):
                if cnt > 0:
                    center = bins[idx] + bin_width / 2
                    plt.text(center, cnt, str(int(cnt)), ha="center",
va="bottom", color="white", fontsize=9, fontweight="bold")
            plt.tight_layout()
            plt.show()

            # Domain summary bar chart
            exploded =
found.assign(domain=found["domain_list"].str.split(";")).explode("domain")
            domain_counts =
exploded["domain"].value_counts().sort_values(ascending=False)
            if not domain_counts.empty:
                plt.figure(figsize=(8, 4))
                domain_counts.plot(kind="bar", color="#007994",
edgecolor="black")
                plt.ylabel("Number of mapped peptides")
                plt.title("Mapped peptides per Spike domain (overlap
allowed)")
                plt.tight_layout()
                plt.show()
        else:
```

```
            print("No peptides were mapped to the reference sequence; no plots
generated.")
    else:
        print("Spike reference not available; domain mapping skipped.")
# End of pipeline
```

Kod 5: SARS-CoV-2 varyantlarında gözlemlenen wild type epitop-allel kaybı analizi

```
# ============================================================
# VARIANT-SPECIFIC EPITOPE-ALLELE LOSS ANALYSIS + BAR CHART
# ============================================================

import pandas as pd
import os
import glob
import matplotlib.pyplot as plt

# ============================================================
# 1. EXTRACT LOST EPITOPE-ALLELE PAIRS PER VARIANT
# ============================================================

ancestral_file = "ancestral.tsv"
variant_files = [f for f in glob.glob("*.tsv") if not
f.startswith("ancestral") and not f.endswith("_lost_pairs.tsv")]

if not os.path.exists(ancestral_file):
    raise FileNotFoundError("Missing 'ancestral.tsv' file in the directory.")

# Load ancestral data
ancestral_df = pd.read_csv(ancestral_file, sep="\t", dtype=str)
if not {"peptide", "allele"}.issubset(ancestral_df.columns):
    raise ValueError("Ancestral file must contain 'peptide' and 'allele'
columns.")

ancestral_pairs = set(zip(ancestral_df["peptide"], ancestral_df["allele"]))

# Loop through each variant file and identify lost pairs
for file in variant_files:
    variant = os.path.basename(file).replace(".tsv", "")
    print(f"Processing variant: {variant}")

    try:
        variant_df = pd.read_csv(file, sep="\t", dtype=str)
        if not {"peptide", "allele"}.issubset(variant_df.columns):
            print(f"Skipping {variant} (missing 'peptide' or 'allele'
columns).")
            continue

        variant_pairs = set(zip(variant_df["peptide"], variant_df["allele"]))
        lost_pairs = ancestral_pairs - variant_pairs

        lost_df = pd.DataFrame(list(lost_pairs), columns=["peptide",
"allele"])
        lost_df.to_csv(f"{variant}_lost_pairs.tsv", sep="\t", index=False)
        print(f"→ Saved {variant}_lost_pairs.tsv ({len(lost_df)} lost pairs)")

    except Exception as e:
        print(f"Error processing {variant}: {e}")

print("\nAll lost-pairs files generated successfully.\n")

# ============================================================
# 2. VARIANT-SPECIFIC LOSS COUNTS (BAR CHART)
```

```
# ============================================================

lost_files = glob.glob("*_lost_pairs.tsv")
loss_data = []

for file in lost_files:
    variant = os.path.basename(file).replace("_lost_pairs.tsv", "")
    try:
        df = pd.read_csv(file, sep="\t", dtype=str)
        lost_count = len(df)
    except Exception:
        lost_count = 0
    loss_data.append({"Variant": variant, "Lost Pairs": lost_count})

loss_df = pd.DataFrame(loss_data)

if not loss_df.empty:
    loss_df = loss_df.sort_values("Variant")

    plt.figure(figsize=(8, 5))
    bars = plt.bar(loss_df["Variant"], loss_df["Lost Pairs"], color="#007994",
zorder=3)
    plt.ylabel("Number of Ancestral Epitope-Allele Pairs Lost")
    plt.title("Variant-Specific Losses from Ancestral Spike Epitope Set")
    plt.grid(axis='y', linestyle='--', alpha=0.7, zorder=0)

    # Label bars with counts
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        plt.text(bar.get_x() + bar.get_width() / 2, height - 0.05*height,
                 f"{int(height)}", ha='center', va='top', color='white',
fontsize=10)

    plt.tight_layout()
    plt.show()
else:
    print("No '*_lost_pairs.tsv' files found — skipping variant-specific loss
counts plot.")
```

Kod 6: CD8+ T hücresi epitop-HLA çiftlerinin varyantlar arası korunum (conservation) analizi, farklı bağlanma eşik değerlerine göre filtrelenmesi ve allel/lokus bazlı dağılımlarının görselleştirilmesi

```
# ============================================================
# CD8 T CELL CONSERVED EPITOPE-HLA PAIR ANALYSIS PIPELINE
# ============================================================
# ANALYSES
# 1. Strict conserved pairs (without threshold filtering)
#    - Load raw variant data
#    - Identify conserved epitope-HLA pairs across all variants
#    - Save results (TSV + Excel)
#    - Plot per-allele and per-locus conserved counts
#
# 2. Threshold-based conserved analysis
#    - Filter by NetMHCIIpan percentile thresholds
#    - Identify conserved epitope-HLA pairs across all variants
#    - Optional heatmap visualization
#    - Plot per-allele and per-locus conserved counts
# ============================================================

# ============================================================
```

```python
# 1. IMPORTS
# ============================================================
import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
import math
import os # Import os to handle file paths if needed

# ============================================================
# 2. INPUT FILES
# ============================================================
# Ensure these files exist in the same directory as the script
# or provide full paths to them.
variant_files = {
    "Ancestral": "ancestral.tsv",
    "BA.2.86": "ba286.tsv",
    "JN.1": "jn1.tsv",
    "LP.8.1": "lp81.tsv",
    "NB.1.8.1": "nb181.tsv",
    "XEC": "xec.tsv"
}

# ============================================================
# 3. HELPER FUNCTION TO CHECK FILES
# ============================================================
def check_input_files():
    """Checks if all input files exist before running."""
    print("Checking for input files...")
    all_files_found = True
    missing_files = []
    for variant, filepath in variant_files.items():
        if not os.path.exists(filepath):
            print(f"  [ERROR] File not found for {variant}: {filepath}")
            missing_files.append(filepath)
            all_files_found = False
        else:
            print(f"  [FOUND] File for {variant}: {filepath}")

    if not all_files_found:
        print("\n*** ABORTING SCRIPT ***")
        print("The following input files are missing:")
        for f in missing_files:
            print(f" - {f}")
        print("Please make sure all .tsv files are in the correct location.")
    return all_files_found

# ============================================================
# BLOCK 1: Strict conserved pairs (no threshold filtering)
# ============================================================

def run_strict_analysis():
    print("\n================================================")
    print("Running BLOCK 1: Strict Conserved Pairs")
    print("================================================")

    # --- Load epitope-HLA pairs for each variant ---
    variant_pairs = {}
    for variant, filepath in variant_files.items():
        try:
            df = pd.read_csv(filepath, sep="\t")
            df["peptide"] = df["peptide"].str.strip()
            df["allele"] = df["allele"].str.strip()
            variant_pairs[variant] = set(zip(df["peptide"], df["allele"]))
            print(f"  Loaded {len(variant_pairs[variant])} pairs for
{variant}.")
        except Exception as e:
            print(f"  [ERROR] Could not process file {filepath}: {e}")
```

```
            return # Stop if a file fails to load

    # --- Find conserved pairs across all variants ---
    conserved_pairs = set.intersection(*variant_pairs.values())
    print(f"\nNumber of strictly conserved epitope-HLA pairs:
{len(conserved_pairs)}")

    if not conserved_pairs:
        print("No conserved pairs found. Skipping plots for Block 1.")
        return

    # --- Save conserved pairs (TSV + Excel) ---
    conserved_df = pd.DataFrame(list(conserved_pairs), columns=["peptide",
"allele"])
    conserved_df.to_csv("conserved_epitope_HLA_pairs_strict.tsv", sep="\t",
index=False)
    conserved_df.to_excel("conserved_epitope_HLA_pairs_strict.xlsx",
index=False)
    print("  Saved strict conserved pairs to .tsv and .xlsx files.")

    # --- FIGURE 1: Per-allele conserved counts ---
    allele_counts = {}
    for pep, allele in conserved_pairs:
        allele_counts[allele] = allele_counts.get(allele, 0) + 1

    allele_df = pd.DataFrame(list(allele_counts.items()), columns=["allele",
"count"])
    allele_df = allele_df.sort_values(by="count", ascending=False)
    allele_df.to_csv("conserved_epitope_counts_per_allele_strict.tsv",
sep="\t", index=False)

    plt.figure(figsize=(10, 6))
    bars = plt.barh(
        allele_df["allele"],
        allele_df["count"],
        color="#007994",
        edgecolor="dimgray"
    )
    plt.gca().invert_yaxis()
    plt.xlabel("Number of Conserved Epitopes", fontsize=12)
    plt.ylabel("HLA Allele", fontsize=12)
    plt.title("Conserved Epitope-HLA Pairs per Allele (no threshold)",
fontsize=12, color="black")
    plt.yticks(fontsize=10)
    plt.grid(axis="x", linestyle="--", alpha=0.7, color="dimgray", zorder=0)
    for bar in bars:
        bar.set_zorder(3)
    plt.tight_layout()
    plt.savefig("figure_1_strict_per_allele.png", dpi=300)
    plt.show()
    print("  Generated and saved strict per-allele plot.")

    # --- FIGURE 2: Per-locus conserved counts ---
    locus_counts = {}
    for pep, allele in conserved_pairs:
        try:
            # Assumes format HLA-A*... or HLA-B*...
            locus = allele.split("-")[1][0]  # <-- CHANGED LOGIC for HLA-A,
HLA-B
            locus_counts[locus] = locus_counts.get(locus, 0) + 1
        except IndexError:
            print(f"  Warning: Could not parse locus from allele '{allele}'.
Skipping.")


    locus_df = pd.DataFrame(list(locus_counts.items()), columns=["locus",
"count"])
```

```
    locus_df = locus_df.sort_values(by="count", ascending=False)
    locus_df.to_csv("conserved_epitope_counts_per_locus_strict.tsv", sep="\t",
index=False)

    plt.figure(figsize=(6, 5))
    bars = plt.bar(
        locus_df["locus"],
        locus_df["count"],
        color="#007994",
        edgecolor="dimgray"
    )

    # Add numbers inside bars
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        if height > 0:
            plt.text(
                bar.get_x() + bar.get_width()/2., height - (0.25 * height),
                f"{int(height)}", ha="center", va="bottom",
                color="white", fontsize=11
            )

    plt.ylabel("Number of Conserved Epitopes", fontsize=12)
    plt.xlabel("HLA Locus", fontsize=12)
    plt.title("Per-locus Conserved Epitope Counts (no threshold)",
fontsize=12, color="black")
    plt.grid(axis="y", linestyle="--", alpha=0.7, color="dimgray", zorder=0)
    for bar in bars:
        bar.set_zorder(3)
    plt.tight_layout()
    plt.savefig("figure_2_strict_per_locus.png", dpi=300)
    plt.show()
    print("  Generated and saved strict per-locus plot.")

# ============================================================
# BLOCK 2: Threshold-based conserved analysis
# ============================================================

def analyze_conserved(threshold, label, chunk_size=50, show_heatmap=False):
    """
    Analyze conserved epitope-HLA pairs across variants
    with a given NetMHCIIpan percentile threshold.
    """

    print(f"\n================================================")
    print(f"Running BLOCK 2: Threshold Analysis {label}")
    print(f"================================================")


    # --- Load filtered epitope-HLA sets ---
    variant_pairs = {}
    for variant, filepath in variant_files.items():
        try:
            df = pd.read_csv(filepath, sep="\t")

            # Check if the required column exists
            if "netmhcpan_el percentile" not in df.columns:
                print(f"  [ERROR] Column 'netmhcpan_el percentile' not found
in {filepath}.")
                print("  Make sure the column name matches exactly.")
                return # Stop this analysis

            df["peptide"] = df["peptide"].str.strip()
            df["allele"] = df["allele"].str.strip()

            # Apply threshold filter
            df = df[df["netmhcpan_el percentile"] <= threshold]
```

```
            variant_pairs[variant] = set(zip(df["peptide"], df["allele"]))
            print(f"  Loaded {len(variant_pairs[variant])} pairs for {variant}
(Threshold {label}).")
        except Exception as e:
            print(f"  [ERROR] Could not process file {filepath}: {e}")
            return # Stop if a file fails to load

    # --- Conserved across all variants ---
    conserved_pairs = set.intersection(*variant_pairs.values())
    print(f"\nNumber of conserved epitope-HLA pairs ({label}):
{len(conserved_pairs)}")

    if not conserved_pairs:
        print(f"No conserved pairs found at threshold {label}. Skipping
plots.")
        return

    # --- 1. Heatmap of conserved pairs ---
    if show_heatmap:
        print("  Generating heatmap...")
        heatmap_df = pd.DataFrame(index=[f"{pep}_{hla}" for pep, hla in
conserved_pairs])
        for variant, pairs in variant_pairs.items():
            heatmap_df[variant] = heatmap_df.index.map(
                lambda x: tuple(x.split("_")) in pairs
            )
        heatmap_data = heatmap_df.astype(int)

        n_chunks = math.ceil(len(heatmap_data) / chunk_size)
        print(f"  Heatmap will be split into {n_chunks} chunk(s).")

        for i in range(n_chunks):
            chunk = heatmap_data.iloc[i*chunk_size:(i+1)*chunk_size]
            if chunk.empty:
                continue
            plt.figure(figsize=(10, max(5, 0.25*len(chunk)))) # Ensure min
height
            sns.heatmap(
                chunk,
                cmap=["#007994", "lightgray"],
                cbar=False,
                linewidths=0.3,
                linecolor="white"
            )
            plt.title(f"Conserved Epitope-HLA Pairs ({label} percentile) [Part
{i+1}/{n_chunks}]")
            plt.xlabel("Variants")
            plt.ylabel("Peptide-HLA Pairs")
            plt.yticks(rotation=0, fontsize=6)
            plt.tight_layout()
            plt.savefig(f"figure_3_heatmap_{label.replace('≤','')}_{i+1}.png",
dpi=300)
            plt.show()
        print("  Saved heatmap plot(s).")

    # --- 2. Per-allele conserved counts ---
    allele_counts = {}
    for pep, allele in conserved_pairs:
        allele_counts[allele] = allele_counts.get(allele, 0) + 1

    allele_df = pd.DataFrame(list(allele_counts.items()), columns=["allele",
"count"])
    allele_df = allele_df.sort_values(by="count", ascending=False)
    # Save allele counts for this threshold
```

```
allele_df.to_csv(f"conserved_epitope_counts_per_allele_{label.replace('≤','')}
.tsv", sep="\t", index=False)


    plt.figure(figsize=(10, 6))
    plt.barh(allele_df["allele"], allele_df["count"], color="#007994",
edgecolor="dimgray", zorder=2)
    plt.gca().invert_yaxis()
    plt.xlabel("Number of Conserved Epitopes", fontsize=12)
    plt.ylabel("HLA Allele", fontsize=12)
    plt.title(f"Conserved Epitope-HLA Pairs per Allele ({label} percentile)",
fontsize=12)
    plt.yticks(fontsize=10)
    plt.grid(axis="x", linestyle="--", alpha=0.6, color="dimgray", zorder=0)
    plt.tight_layout()
    plt.savefig(f"figure_4_per_allele_{label.replace('≤','')}.png", dpi=300)
    plt.show()
    print(f"  Generated and saved per-allele plot ({label}).")


    # --- 3. Per-locus conserved counts ---
    locus_counts = {}
    for pep, allele in conserved_pairs:
        try:
            locus = allele.split("-")[1][0]  # <-- CHANGED LOGIC for # HLA-A,
HLA-B
            locus_counts[locus] = locus_counts.get(locus, 0) + 1
        except IndexError:
            print(f"  Warning: Could not parse locus from allele '{allele}'.
Skipping.")


    locus_df = pd.DataFrame(list(locus_counts.items()), columns=["locus",
"count"])
    locus_df = locus_df.sort_values(by="count", ascending=False)
    # Save locus counts for this threshold

locus_df.to_csv(f"conserved_epitope_counts_per_locus_{label.replace('≤','')}.t
sv", sep="\t", index=False)


    plt.figure(figsize=(6, 5))
    bars = plt.bar(locus_df["locus"], locus_df["count"], color="#007994",
edgecolor="dimgray", zorder=2)

    # Add numbers inside bars
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        if height > 0:
            plt.text(
                bar.get_x() + bar.get_width()/2., height - (0.3 * height),
                f"{int(height)}", ha="center", va="bottom",
                color="white", fontsize=11
            )

    plt.ylabel("Number of Conserved Epitopes", fontsize=12)
    plt.xlabel("HLA Locus", fontsize=12)
    plt.title(f"Per-locus Conserved Epitope Counts ({label} percentile)",
fontsize=12)
    plt.grid(axis="y", linestyle="--", alpha=0.6, color="dimgray", zorder=0)
    plt.tight_layout()
    plt.savefig(f"figure_5_per_locus_{label.replace('≤','')}.png", dpi=300)
    plt.show()
    print(f"  Generated and saved per-locus plot ({label}).")
```

```python
# ============================================================
# 4. RUN ANALYSES
# ============================================================
def main():
    if check_input_files():
        # --- Run Block 1 ---
        run_strict_analysis()

        # --- Run Block 2 with new thresholds ---
        analyze_conserved(0.5, "≤0.5", show_heatmap=False)
        analyze_conserved(0.2, "≤0.2", show_heatmap=False)
        analyze_conserved(0.1, "≤0.1", show_heatmap=True)
        analyze_conserved(0.05, "≤0.05", show_heatmap=True)

        print("\n================================================")
        print("All analyses complete.")
        print("================================================")

if __name__ == "__main__":
    main()
```