T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OMİCRON VARYANTINA ÖZGÜ YARDIMCI T HÜCRELERİN COVID-19 KONVALESAN BİREYLERDE İNCELENMESİ VE ORİJİNAL ANTİJENİK SİN KAVRAMININ CD4+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

MERVE SAİDE 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 çalışmamın planlanmasından sonuçlanmasına kadar geçen tüm süreçte, engin bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden, karşılaştığım her türlü zorlukta çözüm odaklı yaklaşımıyla yolumu açan ve bilimsel desteğini benden hiç esirgemeyen kıymetli danışman hocam İmmünoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Sevgi KALKANLI TAŞ'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Tezimin deneysel süreçlerini laboratuvarında yürütmemi sağlayan, gerek katılımcı örneklerinin temininde gerekse sarf malzemelerin sağlanmasında sunduğu geniş olanaklarla çalışmamın başarıyla tamamlanmasına büyük katkı sunan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nilgün IŞIKSAÇAN'a akademik ve idari destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmamın klinik aşamalarını yürütmeme olanak tanıyan, bu yoğun süreçte her zaman nazik, anlayışlı ve destekleyici yaklaşımıyla yardımcı olan Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye KART YAŞAR'a ve yardımlarını esirgemeyen tüm klinik hemşirelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin en yoğun geçen laboratuvar aşamalarında ve özellikle akan hücre ölçer analizlerinde beni yalnız bırakmayan, yardımlarıyla iş yükümü hafifleten, tez çalışmamla kendi çalışmaları gibi ilgilenen sevgili çalışma arkadaşlarım Tamay Seda TAŞÇI ve Melis İrem KUYAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tıbbi Biyokimya Birimi çalışanlarına ve özellikle katılımcıların çalışmaya dahil edilmesi sürecindeki özverili yardımları ve titiz çalışmaları için Songül İNCEOKUR'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı Flow Sitometri Laboratuvarı'nda yürütülen analiz süreçlerindeki teknik destek ve özverili katkılarından dolayı Evrim YILMAZ, Hatice KINALI ve Havva KAŞIKÇI'ya şükranlarımı sunarım.

Doktora sürecimin her aşamasında manevi desteğini her zaman hissettiğim, motivasyonumu kaybettiğim anlarda dostluğuyla bana güç veren; bunun yanı sıra gerçekleştirdiğimiz bilimsel sohbetler ve fikir alışverişleriyle tez sürecime entelektüel katkı sağlayan sevgili arkadaşım ve değerli meslektaşım Bengü AKÇAM ÇELİK'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca lojistik aksaklıklarda malzeme temini ve teknik destek konusundaki cömert yardımlarıyla işimi kolaylaştıran arkadaşım Sümeyya ÇAPUK'a çok teşekkür ederim.

Çalışmanın planlama aşamasında, özellikle antikor panelinin oluşturulması konusundaki değerli katkıları ve desteği için Pınar ATAR'a teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi'nde yürüttüğüm deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları ve desteği için Sibel KURAŞ'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi bu çalışmada da yanımda olan, tüm deney ve analiz aşamalarını başından sonuna kadar omuz omuza gerçekleştirdiğimiz, benim için sadece bir kardeş değil, aynı zamanda en güvenilir çalışma ortağı olan kıymetli meslektaşım ve ikiz kardeşim Aylin Seher UZUNOĞLU'na varlığı ve emeği için sonsuz teşekkürler.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu süreçte de varlıklarıyla bana güç veren, her koşulda yanımda olan ve sevgilerini her zaman hissettiğim kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Onların varlığından aldığım güçle; bu zorlu sürecin her aşamasında karşılaştığım engellere, uykusuz gecelere ve zaman zaman hissettiğim tükenmişliğe rağmen pes etmeyen, içindeki başarma inancını kaybetmeyip bu çalışmayı nihayete erdiren kendime teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince Enfeksiyon Hastalıklarının İmmünolojisi alt alanı kapsamında 100/2000 YÖK Doktora Bursu ile beni destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından 2023-A3-02 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında, 37769 proje numaralı ve "Omicron Varyantına Özgü Yardımcı T Hücrelerin COVID-19 Konvalesan Bireylerde İncelenmesi ve Orijinal Antijenik Sin Kavramının CD4+ T Hücre Epitopları Üzerindeki Etkisinin Araştırılması" başlıklı proje ile desteklenmiştir. Sağladıkları proje desteğiyle doktora tez çalışmalarımı başarıyla yürütmemi mümkün kılan TÜSEB'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF IV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER VII
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ XI
SİMGELER VE KISALTMALAR XIV
ÖZET XVII
ABSTRACT XIX
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. KORONAVİRÜSLER VE SARS-CoV-2 3
2.1.1. SARS-CoV-2'nin Yapısal Özellikleri ve Genom Organizasyonu 4
2.1.2. Spike Glikoproteininin Yapısı ve Fonksiyonu 4
2.1.3. SARS-CoV-2'nin Viral Evrimi ve Varyantlar 5
2.1.4. Omicron Varyantı ve Alt Soyları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) 7
2.2. VİRAL ENFEKSİYONLARA KARŞI BAĞIŞIKLIK YANITI 8
2.2.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı 8
2.2.2. Edinsel Bağışıklık Yanıtı 9
2.3. $CD4^+$ T HÜCRELERİ (YARDIMCI T HÜCRELERİ) 10
2.3.1. $CD4^+$ T Hücrelerinin Gelişimi, Aktivasyonu ve Farklılaşması 11
2.3.2. $CD4^+$ T Hücrelerinin Antiviral Bağışıklıktaki Rolü 12
2.4. BELLEK $CD4^+$ T HÜCRESİ VE ALT TİPLERİ 13
2.4.1. Merkezi Bellek T hücreleri 14
2.4.2. Efektör Bellek T hücreleri 15
2.4.3. Terminal Farklılaşmış Efektör T Hücreleri 16
2.5. SARS-CoV-2'YE KARŞI OLUŞAN $CD4^+$ T HÜCRE YANITLARI 17
2.5.1. COVID-19 Enfeksiyonu Sonrası Hafıza $CD4^+$ T Hücresi Oluşumu 19
2.6. T HÜCRESİ AKTİVASYON DİNAMİKLERİ VE TEMEL YÜZEY BELİRTEÇLERİ 20
2.7. ORİJİNAL ANTİJENİK SİN (IMMUNE IMPRINTING) KAVRAMI 22
2.7.1. Original Antigenic Sin ve SARS-CoV-2 23
2.7.2. Original Antigenic Sin'in SARS-CoV-2'ye Karşı Oluşturulan $CD4^+$ T Hücre Yanıtlarına Etkisi 24
2.8. İMMÜNOİNFORMATİK VE EPİTOP ANALİZ YÖNTEMLERİ 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. ÇALIŞMA KAPSAMI VE ETİK İZİN 27
3.2. KATILIMCILARIN BELİRLENMESİ VE ÖRNEKLEME SÜRECİ 27
3.2.1. Birinci çalışma grubu (Grup 1, Wt (+)) 27
3.2.2. İkinci çalışma grubu (Grup 2, Wt (–)) 28
3.2.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri 29
3.3. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI 29
3.4. PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU 30
3.5. SARS-CoV-2 PEPTİD HAVUZLARI İLE T HÜCRE STİMÜLASYONU 30
3.5.1. Wild Type Referans Havuzu 31
3.5.2. Mutasyon Havuzu 31
3.5.3. Peptid Havuzlarına Göre Deney Grubunun Belirlenmesi 31
3.5.3.1. Pozitif Kontrol 31
3.5.3.2. Negatif Kontrol 32
3.5.3.3. Wild Type 32
3.5.3.4. Mutasyon 32
3.5.4. Stimülasyon Protokolü 32
3.6. BELLEK CD4$^+$ T HÜCRELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN İMMÜNOFENOTİPLEME 33
3.7. ORİJİNAL ANTİJENİK SİN KAVRAMININ SARS-COV-2 CD4$^+$ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİ ARAŞTIRILMASI 38
3.7.1. BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC Varyantlarının Deneysel Olarak Tanımlanmış CD4$^+$ T Hücre Epitopları Üzerindeki Etkisinin Analizi 38
3.7.1.1. Seçilen HLA Sınıf II allel listesi 40
3.8. NİCEL ANALİZ VE KARŞILAŞTIRMALAR 41
3.9. KOD ERİŞİLEBİLİRLİĞİ VE ANALİTİK TEKRARLANABİLİRLİK 45
3.10. İSTATİSTİK ANALİZ 47
4. BULGULAR 49
4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 49
4.2. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE SPİKE-SPESİFİK CD4$^+$ T HÜCRE POPÜLASYONLARININ ÖLÇÜLMESİ 50
4.3. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE CD4$^+$ T HÜCRELERİNİN BELLEK ALT POPÜLASYONLARININ DAĞILIMI VE GRUP KARŞILAŞTIRMALARI 55
4.4. KORELASYON ANALİZLERİ 65
4.5. VARYANTA ÖZGÜ MUTASYONLARIN DENEYSEL CD4$^+$ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ 68
4.6. OMİCRON ALT VARYANTLARINA AİT İMMÜNOJENİK VE İMMÜNODOMİNANT EPİTOPLARIN HLA SINIF II BAĞLANMA ANALİZİ 78
5. TARTIŞMA 105

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 123
KAYNAKLAR 126
EKLER 137

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: T hücre immün fenotipleme çalışması için kullanılan antikor paneli 34

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar, malzemeler, cihazlar, yazılım ve algoritmaların listesi 37

Tablo 3.3: GitHub (mervesuzunoglu) üzerinden erişime sunulan hesaplamalı analiz iş akışının modüler yapısı ve dosya içerikleri. 46

Tablo 4.1: Çalışma grubuna dahil edilen katılımcıların demografik ve klinik parametreleri 49

Tablo 4.2: SARS-CoV-2 S^{WT} ve S^{O} peptit uyarımı sonrası Wt(+) ve Wt(−) gruplarındaki $CD4^{+}$ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı frekansları 58

Tablo 4.3: Wt(+) ve Wt(–) bireylerde TCM, TEM1, TEM2 ve TEM3 $CD4^{+}$ T hücre frekanslarının karşılaştırmalı analizi 63

Tablo 4.4: Omicron alt varyantlarında tanımlanan epitopların Wild-type SARS-CoV-2 epitopları ile örtüşme düzeyi ve varyantlardaki örtüşmeyen epitoplar listesi 72

Tablo 4.5: BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC Omicron alt varyantlarına ait spike varyantlarının her birinde tanımlanan proteini mutasyonları 72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3.1: T hücre aktivasyonu ve hafıza $CD4^+$ T hücrelerinin immün fenotiplemesine ait kapılama stratejisi 36

Şekil 3.2: SARS-CoV-2 varyantlarının küresel dolaşımı ve bölgesel frekans değişimleri (GISAID verileri, Temmuz 2025) (151) 39

Şekil 4.1: Katılımcıların aşılanma geçmişlerinin gruplara göre dağılımı 50

Şekil 4.2: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde toplam $CD4^+$ T hücre frekanslarının karşılaştırılması 51

Şekil 4.3: SARS-CoV-2-spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin stimüle edilmemiş örnekte, pozitif kontrolde, wilde-type havuzu (S^{WT}) ve omicron havuzu (S^{O}) ile stimüle edilmiş örneklerdeki hücre popülasyonları 52

Şekil 4.4: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında $CD4^+CD69^+CD137^+$ T hücre frekansları 53

Şekil 4.5: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde naive $CD4^+$ T hücrelerinde antijen-spesifik aktivasyonun karşılaştırılması 54

Şekil 4.6: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında, SARS-CoV-2 spike antijenlerine yanıt olarak aktive olan ($CD69^+CD137^+$) $CD4^+$ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının yüzdelik frekansları 56

Şekil 4.7: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin varyanta özgü ikili eşleştirilmiş analizi ve alt küme dağılımlarını gösteren temsili akan hücre ölçer kapılama şemaları ile birlikte, Spike spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin ($CD69^+CD137^+$) kanonik bellek farklılaşma profilleri 59

Şekil 4.8: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı dağılımı 61

Şekil 4.9: (A) Wt(+) ve (B) Wt(−) gruplarında S^{WT} ve S^{O} spesifik $CD4^+$ T hücre yanıtları arasındaki korelasyon. (C-F) Wt(+) ve Wt(−) gruplarında aşı dozu ile antijen spesifik $CD4^+$ T hücre yanıtları arasındaki ilişki 66

Şekil 4.10: Wild type ve Omicron alt varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) spike proteinleri boyunca $CD4^+$ T hücre epitop yanıt frekansı dağılımları IEDB ImmunomeBrowser aracı kullanılarak görselleştirilmiştir 69

Şekil 4.11: SARS-CoV-2 Spike proteini üzerinde deneysel olarak tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitoplarının Omicron varyantları arasındaki dağılımı 71

Şekil 4.12: SARS-CoV-2 Omicron varyantlarına özgü mutasyonların Wild-type Spike proteininde tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitopları üzerindeki etkileri 75

Şekil 4.13: Varyantlar arası epitopların konumsal haritalanması 76

Şekil 4.14: SARS-CoV-2 varyantları arasında epitop ilişkili Spike mutasyonlarının grafiği 77

Şekil 4.15: Wild-type Spike proteini ile varyant Spike proteinleri arasında bağlanma gücü değişimlerinin analizi 80

Şekil 4.16: Farklı SARS-CoV-2 varyantlarının belirli HLA sınıf II allelleri tarafından sunulan güçlü bağlayıcı epitop sayılarının karşılaştırılması 80

Şekil 4.17: SARS-CoV-2'nin Ancestral, BA.2.86 ve JN.1 varyantları için güçlü bağlayıcı epitopların HLA sınıf II allelleri arasındaki dağılım hiyerarşisi 83

Şekil 4.18: SARS-CoV-2'nin LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantları için güçlü bağlayıcı epitopların HLA sınıf II allelleri arasındaki dağılım hiyerarşisi 84

Şekil 4.19: Tanımlanan güçlü bağlayıcı $CD4^+$ T hücre epitop-HLA sınıf II çiftlerinin, belirli Omicron varyantlarındaki varlığı ve epitopların varyant belirleyici mutasyonlardan etkilenme durumu 85

Şekil 4.20: Varyant belirleyici mutasyonların güçlü bağlayıcı peptit–HLA çiftleri ile çakışma matrisi (Part 1/2) 88

Şekil 4.21: Varyant belirleyici mutasyonların güçlü bağlayıcı peptit–HLA çiftleri ile çakışma matrisi (Part 2/2) 90

Şekil 4.22: JN.1 ve BA.2.86 varyantlarında korunan ancak daha yeni Omicron varyantlarında ortak olarak kaybedilen $CD4^+$ T hücre epitop-HLA çiftlerinin varlık-yokluk profili 92

Şekil 4.23: JN.1 sonrası varyantlarda gözlemlenen $CD4^+$ T hücre epitop kayıplarının spike proteini üzerindeki konumsal dağılımı ve domain analizi 95

Şekil 4.24: SARS-CoV-2 varyantları arasında korunan $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤10 yüzdelik eşiği) 97

Şekil 4.25: SARS-CoV-2 varyantları arasında korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤5 yüzdelik eşiği) 98

Şekil 4.26: Yüksek afiniteli korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤2 yüzdelik eşiği) 100

Şekil 4.27: En yüksek afiniteli korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤1 yüzdelik eşiği) 101

Şekil 4.28: En yüksek afiniteli (≤1 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arasındaki varlığının doğrulanması (Part 1/2) 102

Şekil 4.29: En yüksek afiniteli (≤1 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arasındaki varlığının doğrulanması (Part 2/2) 103

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE2 : Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2

AIM : Aktivasyon İle İndüklenen Belirteç (Activation-Induced Marker)

APC : Antijen Sunan Hücreler

BİDEB : Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı

CGAS : Siklik GMP-AMP Sentaz

CMV : Sitomegalovirüs

CT : Sitoplazmik Kuyruk

CTL : Sitotoksik T Lenfositleri

DC : Dendritik Hücreler

DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü

E : Zarf (Envelope) Proteini

FBS : Fetal Bovin Serum

FSC : İleri Saçılım (Forward Scatter)

HLA : İnsan Lökosit Antijeni

ICS : Hücre İçi Sitokin Boyama (Intracellular Cytokine Staining)

IEDB : Immune Epitope Database

IFN : İnterferon

IL : İnterlökin

IQR : Çeyrekler Arası Aralık

ISG : İnterferon Uyarımlı Genler

M : Membran Proteini

MHC : Majör Histouyumluluk Kompleksi

N : Nükleokapsid Proteini

NK : Doğal Öldürücü (Natural Killer)

NSP : Yapısal Olmayan Proteinler

NTD : N-Terminal Alanı

OAS : Orijinal Antijenik Sin (Original Antigenic Sin)

ORF : Açık Okuma Çerçevesi

PAMP : Patojen İlişkili Moleküler Paternler

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PKMH : Periferik Kan Mononükleer Hücreler

PRR : Patern Tanıma Reseptörleri

RBD : Reseptör Bağlama Bölgesi

RBM : Reseptör Bağlanma Motifi

RNA : Ribonükleik Asit

S : Spike Proteini

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

SSC : Yan Saçılım (Side Scatter)

TCM : Merkezi Bellek T Hücreleri

TCR : T Hücre Reseptörü

TEM : Efektör Bellek T Hücreleri

TEMRA : Terminal Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri

Tfh : T Foliküler Yardımcı Hücreleri

TGF-β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

Th : T Yardımcı (Helper) Hücreleri

TLR : Toll-benzeri Reseptörler

TM : Transmembran

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TRM : Doku Yerleşik Bellek T Hücreleri

TSCM : Kök Hücre Benzeri Bellek T Hücreleri

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

TÜSEB : Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı

UTR : Translasyona Uğramayan Bölgeler

VOC : Endişe Verici Varyantlar (Variants of Concern)

VOI : İzlenen Varyantlar (Variants of Interest)

Wt : Wild type

YÖK : Yükseköğretim Kurulu

OMİCRON VARYANTINA ÖZGÜ YARDIMCI T HÜCRELERİN COVID-19 KONVALESAN BİREYLERDE İNCELENMESİ VE ORİJİNAL ANTİJENİK SİN KAVRAMININ CD4+ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Türk popülasyonunda COVID-19 konvalesan bireylerde Omicron varyantına özgü bellek $CD4^+$ T hücre yanıtlarının değerlendirmek; önceki enfeksiyon öyküsünün bu yanıtlar üzerindeki etkisini Orijinal Antijenik Sin kavramı çerçevesinde incelemektir. Hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle, SARS-CoV-2 varyantları arasındaki epitop düzeyinde çapraz reaktiviteyi, korunmuşluk durumunu ve immünodominant bölgeleri belirleyerek aşı stratejilerine katkı sağlayacak immünolojik veriler sunmak hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: COVID-19 konvalesan bireylerin PKMH'leri, Wild type ve Omicron varyantlarına özgü Spike peptid havuzları ile *in vitro* uyarılmıştır. $CD4^+$ T hücre aktivasyonu ve bellek alt popülasyonları, çok renkli akan hücre ölçer ile analiz edilerek immün fenotiplemeleri gerçekleştirilmiştir. Python tabanlı pipeline ve NetMHCIIpan EL 4.1 algoritması kullanılarak varyantlara özgü mutasyonların $CD4^+$ T hücre epitopları üzerindeki etkisi, bağlanma afinitesi ve epitop kayıpları incelenmiştir. Potansiyel $CD4^+$ T hücre epitopları tanımlanmış; farklı varyantlar arasında çapraz reaktif olma potansiyeli taşıyan epitoplar ile immünodominant, immünojenik, korunmuş ve HLA-kısıtlı epitoplar belirlenmiştir.

Bulgular: Konvalesan bireylerde, Omicron varyantlarına karşı güçlü $CD4^+$ T hücre aktivasyonu ve varyantlar arası yüksek çapraz reaktivite saptanmıştır. Wt(–) grubunda Omicron'a özgü TEM2 ve TEM3 yanıtlarının, Wild type'a kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu belirlenmiştir. Güçlü bağlayıcı epitopların yaklaşık %85'inin varyant mutasyonlarından etkilenmeyerek korunduğu; ancak JN.1 sonrası varyantlarda NTD bölgesinde yoğunlaşan epitop kayıpları olduğunu gösterilmiştir. Tüm varyantlarda korunan, yüksek afiniteli 89 epitop-HLA çifti tanımlanmış, immunodominant HLA sınıf II alleleri belirlenmiştir.

Sonuç: Önceki enfeksiyon ve aşılamanın, Omicron varyantına karşı çapraz reaktif ve kalıcı bir $CD4^+$ T hücre hafızası oluşturduğu gösterilmiştir. SARS-CoV-2 varyantlarındaki mutasyonlara rağmen hücresel bağışıklığın korunduğu ve özellikle DR ve DP allelleri tarafından sunulan immünodominant epitopların evrensel aşı tasarımları için kritik adaylar olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Bellek $CD4^+$ T Hücreleri, COVID-19, İmmünoinformatik, NetMHCIIpan, Original Antigenic Sin, SARS-CoV-2

INVESTIGATION OF OMICRON-SPECIFIC HELPER T CELLS IN COVID-19 CONVALESCENT INDIVIDUALS AND ANALYZING THE EFFECT OF ORIGINAL ANTIGENIC SIN ON CD4+ T CELL EPITOPES

ABSTRACT

Aim: The aim is to evaluate Omicron variant–specific memory $CD4^+$ T cell responses in COVID-19 convalescent individuals within the Turkish population and to investigate the impact of prior infection history within the framework of the Original Antigenic Sin. The study aims to provide immunological data contributing to future vaccine strategies by determining epitope-level cross-reactivity, conservation status, and immunodominant regions among variants.

Materials and Methods: PBMCs from COVID-19 convalescent individuals were stimulated *in vitro* with Wild type and Omicron Spike peptide pools. $CD4^+$ T cell activation and memory subpopulations were analyzed through multicolor flow cytometry to determine immunophenotypic profiles. Using a Python-based pipeline and NetMHCIIpan EL 4.1 algorithm, the impact of variant-specific mutations on $CD4^+$ T cell epitopes were defined, including binding affinity and epitope loss. Cross-reactive, immunodominant, immunogenic, conserved, and HLA-restricted $CD4^+$ T cell epitopes across different variants were characterized.

Results: Convalescent individuals exhibited robust $CD4^+$ T cell activation and high cross-reactivity against Omicron variants. In the Wt(–) group, Omicron-specific TEM2 and TEM3 responses were significantly higher compared to those against the Wild type. Approximately 85% of strong-binding epitopes remained conserved and unaffected by variant mutations. Across all variants, 89 conserved, high-affinity epitope–HLA pairs were identified, and immunodominant HLA class II alleles were determined.

Conclusion: Prior infection and vaccination were shown to establish a cross-reactive and durable $CD4^+$ T cell memory against Omicron variant. Cellular immunity remains preserved, and immunodominant epitopes—particularly those presented by DR and DP alleles—emerge as critical candidates for universal vaccine design.

Key Words: COVID-19, Immunoinformatics, Memory $CD4^+$ T Cells, NetMHCIIpan, Original Antigenic Sin, SARS-CoV-2,

1. GİRİŞ VE AMAÇ

SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile ortaya çıkan COVID-19 pandemisi, küresel ölçekte ciddi bir sağlık krizine yol açmış ve hastalığın kontrolünde hücresel bağışıklığın rolünü odak noktası hâline getirmiştir. Özellikle $CD4^+$ T hücrelerinin, antiviral bağışıklık yanıtının koordinasyonunda kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu hücreler; B hücrelerinin antikor üretimini, $CD8^+$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini ve immün yanıtın uzun süreli hafıza oluşumunu destekleyerek enfeksiyona karşı uzun süreli koruma sağlar. Virüsle ilk karşılaşmadan sonra oluşan bellek $CD4^+$ T hücrelerinin, yeniden enfeksiyon durumunda patojeni hızlı bir şekilde tanıdığı ve etkili bir immün yanıt oluşturduğu bilinmektedir. Bu nedenle, SARS-CoV-2 varyantlarına karşı bellek $CD4^+$ T hücre yanıtlarının anlaşılması, koruyucu bağışıklığın niteliğini değerlendirmek açısından büyük önem taşımaktadır.

Omicron'un taşıdığı çok sayıda spike proteini mutasyonları ile, $CD4^+$ T hücrelerinin koruyucu etkisinin daha belirgin bir hâle geldiği gösterilmiştir. Bu durum, varyanta özgü bellek T hücresi yanıtlarının değerlendirilmesini bilimsel açıdan öncelikli kılmıştır. Türkiye'deki popülasyona yönelik çalışmaların sınırlı olması, farklı varyantlarla karşılaşmış bireylerde Omicron-spesifik $CD4^+$ T hücre hafızasının kapsamını ve işlevselliğini ortaya koymayı daha da önemli hâle getirmektedir.

Bağışıklık yanıtını şekillendiren faktörlerden biri de Orijinal Antijenik Sin (Original Antigenic Sin, OAS) olarak bilinen olgudur. OAS, bir bireyin daha önce karşılaştığı viral suşa karşı geliştirdiği bağışıklık yanıtının, aynı virüsün yeni bir varyantına karşı verilen yanıtı yönlendirebileceğini ifade eder. SARS-CoV-2 bağlamında, geçmiş enfeksiyonların veya önceki nesil aşıların, yeni varyantlara karşı oluşan T hücre yanıtlarını nasıl etkilediği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, konvalesan bireylerde varyanta özgü $CD4^+$ T hücresi aktivasyonunun OAS kapsamında değerlendirilmesi, bağışıklık sisteminin varyantlara karşı verdiği yanıtın evrimsel dinamiklerini anlamak açısından kritik bir araştırma alanıdır.

Bu çalışma, Omicron varyantına karşı gelişen bellek $CD4^+$ T hücre yanıtlarının Türk popülasyonunda ayrıntılı olarak değerlendirilmesini amaçlamaktadır. Bu

kapsamda, COVID-19 geçirmiş bireylerden izole edilen periferik kan mononükleer hücreleri (PKMH), Omicron ve wild type SARS-CoV-2 peptid havuzları ile uyarılmış; akan hücre ölçer ile Omicron-spesifik bellek $CD4^+$ T hücrelerinin frekansı ve immün fenotipleri analiz edilmiştir. Bu yaklaşım sayesinde, bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonları, fonksiyonel kapasiteleri ve uzun ömürlülük özellikleri ortaya konmuştur.

Ayrıca, SARS-CoV-2 proteinlerindeki dizi değişkenliğinin $CD4^+$ T hücre epitopları üzerindeki etkisini incelemek amacıyla hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılmıştır. Farklı varyantlarda potansiyel $CD4^+$ T hücre epitopları belirlenmiş; mutasyon içeren ve korunmuş bölgeler karşılaştırılmış; çapraz reaktif, immünodominant, immünojenik ve HLA-kısıtlı epitoplar tanımlanmıştır. Böylece, OAS olgusunun T hücresi epitop düzeyindeki yansımaları değerlendirilmiş ve varyantlar arası bağışıklık çaprazlamasının kapsamı ortaya çıkarılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, Türk popülasyonunda COVID-19 geçirmiş bireylerde Omicron'a özgü bellek $CD4^+$ T hücre yanıtlarının frekansını, özgüllüğünü ve fonksiyonel özelliklerini ortaya koymak ve geçmiş enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen bağışıklığın Omicron varyantına karşı $CD4^+$ T hücresi yanıtlarını nasıl şekillendirdiğini değerlendirmektir. Ayrıca, hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle SARS-CoV-2 varyantları arasında $CD4^+$ T hücre çapraz reaktivitesini ve OAS etkisini epitop düzeyinde incelemek ve korunmuş ve immünodominant epitopları tanımlayarak gelecekteki aşı ve tedavi stratejilerine katkı sağlayabilecek bağışıklık belirteçleri önermek amaçlanmıştır.

Bu çalışma, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenmiş olup, SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen hücresel bağışıklığın anlaşılmasına ve varyantlara karşı koruyucu yanıtların değerlendirilmesine önemli katkılar sunmayı hedeflemektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KORONAVİRÜSLER VE SARS-CoV-2

Coronaviridae ailesi içinde önemli bir grup olan koronavirüsler; zarflı, pozitif iplikçikli (pozitif sens), tek sarmallı RNA virüsleri olarak karakterize edilirler. Latince taç anlamına gelen kelimeden türetilen "korona" adını alırlar. Genellikle 26 ila 32 kilobaz arasında değişen genom boyutlarıyla, bilinen virüsler arasında en büyük RNA genomuna sahiptirler (1,2). Koronavirüslerin sınıflandırılması, temel olarak genetik özelliklerine ve filogenetik ilişkilerine dayanmaktadır. Günümüzde koronavirüsler, Alphacoronavirus, Betacoronavirus, Gammacoronavirus ve Deltacoronavirus olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır. Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü (SARS-CoV) ve SARS-CoV-2'yi de içeren Betakoronavirüsler, insanlarda görülen şiddetli hastalıklardan sorumludur (3,4,5,6). Bu cinslerin her biri, memelileri ve kuşları enfekte edebilen çeşitli türleri içermekte olup, geniş bir konakçı yelpazesi ve önemli bir genetik çeşitlilik sergilemektedir.

Koronavirüslerin yapısal ve fonksiyonel çerçeveleri, karmaşık bir genomik organizasyonu içerir. Koronavirüsler, tam uzunluktaki genomun; viral montaj ve immün kaçış için kritik öneme sahip çeşitli proteinleri kodlayan subgenomik RNA'lara transkripsiyonunu içeren karmaşık bir replikasyon döngüsüne sahiptir (7) Viral genom genellikle, RNA replikasyonu ve transkripsiyonu için gerekli olan Yapısal Olmayan Proteinlerin (NSP'ler) üretiminde kritik öneme bir dizi Açık Okuma Çerçevesi (ORF) kodlamaktadır (1,7). Koronavirüsler, NSP'lerin yanı sıra; virüsün konak hücreye girişi ve patojenezinde hayati roller oynayan Spike (S), zarf (E), membran (M) ve nükleokapsid (N) proteinleri gibi yapısal proteinleri de kodlamaktadır (8,9). Özellikle Spike proteini, viral enfektivite için gerekli olan reseptör bağlanması ve membran füzyonundaki rolü nedeniyle kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır (8).

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

SARS-CoV-2, yaşam döngüsü ve patojenitesi için kritik öneme sahip çeşitli benzersiz yapısal özelliklere ve karmaşık bir genom organizasyonuna sahiptir. Yapısal olarak SARS-CoV-2, yüzeyinden dışarı uzanan Spike (S) proteinleri nedeniyle karakteristik taç benzeri bir görünüme sahip, zarflı bir virüs olarak sınıflandırılır. Viral partikül; montaj, konak etkileşimi ve immün kaçışta hayati roller oynayan dört temel yapısal proteinden oluşur. Bunlar spike glikoproteini, zarf proteini, membran proteini ve nükleokapsid proteinidir (10, 11). Özellikle S proteini, Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE2) reseptörüne bağlanarak virüsün konak hücrelere girişini kolaylaştırır ve enfeksiyon sürecini başlatır (12).

SARS-CoV-2 genomu yaklaşık 29.9 kb uzunluğundadır ve pozitif iplikçikli, tek sarmallı bir RNA'dan oluşur (13). Bu genom, viral replikasyon ve transkripsiyonda görev alan NSP'ler, kodlayan ve 5' ucunda yer alan birbiriyle örtüşen iki büyük ORF (ORF1a ve ORF1b) dahil olmak üzere, çok sayıda ORF halinde organize olmuştur. Toplamda SARS-CoV-2, dört ana yapısal protein ve çeşitli aksesuar proteinlerin yanı sıra, yaklaşık 16 adet yapısal olmayan protein kodlamaktadır. Genomun 3' ucu, viral partiküllerin oluşumu ve enfektiviteleri için gerekli olan S, E, M ve N proteinlerine ait yapısal genleri içerir (10,14).

Protein kodlama yeteneklerine ek olarak, SARS-CoV-2 genomu, RNA molekülünün her iki ucunda bulunan translasyona uğramayan bölgeler (UTR'ler) dahil olmak üzere önemli kodlamayan bölgeler içerir. Bu UTR'ler, viral replikasyonun ve protein sentezinin düzenlenmesinde kritik bir rol oynar (15). Özellikle, genom içerisinde viral replikasyonu ve konak etkileşimlerini etkileyebilecek G-quadruplex yapıları tanımlanmıştır (16,17). SARS-CoV-2 genomunun organizasyonu ve işlevselliği, virüsün replikasyonu için konak hücre mekanizmasını etkili bir şekilde kullanmasını sağlarken aynı zamanda immün yanıtlardan kaçmasına olanak tanır (18).

2.1.2. Spike Glikoproteininin Yapısı ve Fonksiyonu

SARS-CoV-2'nin Spike (S) glikoproteini, virüsün konak hücrelere girme ve enfeksiyonu başlatma yeteneğinde temel bir rol oynayan kritik bir yapısal bileşendir. Yapısal olarak Spike proteini, homotrimerik bir glikoproteindir; yani birbirinin aynısı (özdeş) üç alt birimden oluşur. Her bir alt birim iki fonksiyonel bölgeden meydana

gelir. Bunlar, S1 alt biriminde bulunan reseptör bağlama bölgesi (RBD) ve S2 alt biriminde yer alan füzyon mekanizması (19). S1 alt birimi, yaklaşık 1273 amino asit uzunluğundaki SARS-CoV-2 Spike proteininde 14 ila 685. kalıntılar (rezidüler) arasını kapsar. S1 alt birimi temel olarak insan hücrelerinin yüzeyindeki ACE2 reseptörünü tanımaktan ve ona bağlanmaktan sorumludur. 686 ila 1273. kalıntılardan oluşan S2 alt birimi, bağlanma olayı gerçekleştikten sonra viral zarfın konak hücre zarı ile füzyonu (kaynaşması) için hayati önem taşır (20).

S glikoproteini, işlevi için gerekli olan bir dizi konformasyonel değişiklik ile karakterize edilir. ACE2'ye bağlandıktan sonra RBD, reseptör ile etkili bir etkileşim için kritik olan "yukarı" ("up") konformasyonuna geçiş yapar (21). Bu konformasyonel değişim, nihayetinde viral ve hücresel membranların kaynaşmasına izin veren daha geniş bir yapısal yeniden düzenlenmeler dizisinin bir parçasıdır (19,14). Bağlanma afinitesine ek olarak, Spike proteininde bir furin kesim bölgesinin varlığı, virüs konak hücrelerle etkileşime girmeden önce proteinin ön aktivasyonuna izin vererek enfektivitesini artırır (12,22).

Spike proteininin glikozilasyonu da proteinin işlevinde ve immün kaçışta (bağışıklık sisteminden kaçış) önemli bir rol oynar. Protein yoğun bir şekilde glikozile edilmiştir; bu durum sadece doğru katlanmaya ve stabiliteye yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda virüsün konağın bağışıklık yanıtlarından kaçmasına da yardımcı olur. Spike glikoproteini, ACE2 ile etkileşimi yoluyla viral girişe aracılık etmekle kalmayıp, aynı zamanda aşı geliştirme ve terapötik müdahaleler için de ana hedef görevi gören çok fonksiyonlu bir proteindir. Proteini çevreleyen glikan kalkanları antikor erişimini engelleyebilir; bu durum, güçlü nötralize edici yanıtlar oluşturmayı amaçlayan aşı ve tedavi geliştirme çabaları için bir zorluk teşkil eder (12,22).

2.1.3. SARS-CoV-2’nin Viral Evrimi ve Varyantlar

SARS-CoV-2'nin viral evrimi; bulaşıcılık, patojenite ve aşı direncinde farklılıklar gösteren çeşitli varyantların ortaya çıkmasına yol açan dinamik bir mutasyon ve seçilim süreciyle karakterize edilmektedir. SARS-CoV-2'nin evrimsel yörüngesi; genomik mutasyonlar, seçilim baskıları ve varyant gelişiminde kronik enfeksiyonların rolü dahil olmak üzere çeşitli açılardan incelenebilir (23).

SARS-CoV-2, ilk tanımlanmasından bu yana önemli genomik değişikliklere uğramış, bu da çeşitli endişe verici varyantların (VOC'ler) ve izlenen varyantların (VOI'ler) ortaya çıkmasına neden olmuştur. Özellikle, dikkat çeken ilk büyük varyant, Birleşik Krallık'ta tanımlanan B.1.1.7 idi. Bu varyant, artan bulaşıcılık ve hastalık şiddeti ile ilişkilendirilen Spike proteinindeki bir değişiklik de dahil olmak üzere çeşitli mutasyonlar içeriyordu (24,25). Benzer şekilde, Delta varyantı (B.1.617) ve Omicron varyantı (B.1.1.529); ACE2 reseptörüne artan bağlanma ve artan bulaşma ile bağlantılı olan N501Y ve E484K gibi, özellikle Spike proteininde belirgin mutasyonlar sergilemiştir (26).

SARS-CoV-2'nin mutasyon oranı, diğer betakoronavirüslerle tutarlı olarak, replikasyon döngüsü başına nükleotid başına yaklaşık 1×10^{-6} ila 2×10^{-6} mutasyondur. Bazı çalışmalar, özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde uzun süreli enfeksiyonların, konak içi evrimi (intra-host evolution) kolaylaştırabileceğini ve sonunda yeni varyantların ortaya çıkmasına yol açan mutasyonların birikmesine izin verebileceğini öne sürmüştür (27-28).

Genomik sürveyans, SARS-CoV-2 varyantlarının ortaya çıkışını ve yayılmasını izlemede merkezi bir rol oynamıştır. Sekanslama çabaları, B.1.1.7 ve B.1.617 gibi varyantların küresel olarak nasıl yayıldığını gösteren karmaşık viral evrim ağlarını ortaya çıkarmıştır. Nextstrain gibi platformlar, bu varyantların dağılımına dair filogenetik içgörüler sağlayarak evrimin coğrafi ve zamansal modellerini vurgulamaktadır (29).

Yeni varyantların ortaya çıkışı, aşı etkinliği de dahil olmak üzere halk sağlığı yanıtları için zorluklar teşkil etmektedir. Spike proteinindeki, özellikle Reseptör Bağlama Alanını (RBD) ve N-Terminal Alanını (NTD) etkileyen mutasyonlar; aşılar veya önceki enfeksiyonlar tarafından oluşturulan antikorların nötralize etme yeteneğini etkileyerek immün kaçış ile ilişkilendirilmiştir (30). Özellikle Omicron varyantı, nötralizasyondan kaçma konusunda önemli bir yetenek göstermiş, bu da aşı formülasyonlarında güncellemeleri ve hatırlatma dozlarına (booster) ilişkin politikalarda değişiklikleri tetiklemiştir (25).

2.1.4. Omicron Varyantı ve Alt Soyları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC)

SARS-CoV-2'nin Omicron varyantının (B.1.1.529) ortaya çıkışı; büyük ölçüde kapsamlı mutasyonları ve bunun sonucunda bulaşıcılık, immün kaçış ve aşılama stratejileri üzerindeki etkileri nedeniyle COVID-19 pandemisinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. BA.2.86, JN.1 ve diğer alt soylar (sublineages) gibi varyantlar evrimleşmeye devam ederek pandemiye yönelik küresel yanıtı daha da karmaşık hale getirmiştir. Omicron varyantı ilk olarak Kasım 2021'de tanımlanmış ve kısa bir süre sonra Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından Endişe Verici Varyant (VOC) olarak belirlenmiştir (31). Bu varyant, önceki varyantlara kıyasla önemli bir değişiklik olan ve artan bulaşıcılık ile potansiyel immün kaçışa katkıda bulunan, spike proteinindeki 30'dan fazla mutasyonla karakterize edilir (32). Omicron'da bulunan, özellikle RBD mutasyonlar, önceki enfeksiyonlardan veya aşılardan üretilen nötralize edici antikorlardan kaçma yeteneği konusunda endişeler yaratmıştır (33). Örneğin; E484A ve N501Y gibi mutasyonlar, ACE2 reseptörü için artan bağlanma afinitesi ile ilişkilendirilmiş ve bu da daha yüksek bir bulaşma oranına yol açmıştır (26).

Omicron'un çeşitli alt soyları arasında BA.2.86 ve JN.1, dikkat çeken suşlar olarak ortaya çıkmıştır. BA.2.86 varyantı, bulaşıcılığını ve immün kaçış yeteneklerini potansiyel olarak artırabilecek bir dizi mutasyona sahiptir (34). JN.1 varyantı da Omicron'un evrimleşen doğasına ilişkin endişelerin ortasında ortaya çıkmış olup, aşı etkinliğini ve tedavi stratejilerini daha da etkileyebilecek mutasyonlar sergilemektedir (35).

Yeni Omicron alt soylarının, özellikle LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC'nin ortaya çıkışı, devam eden COVID-19 pandemisinde önemli bir gelişmeyi temsil etmektedir. Bu alt soylar; viral bulaşmayı, immün kaçışı ve genel hastalık dinamiklerini etkileyebilecek önemli mutasyonlar sergilemektedir. LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC alt soyları; reseptör bağlanma ve nötralizasyon profillerini değiştirdiği bilinen amino asit değişiklikleri de dahil olmak üzere, spike proteininde benzersiz mutasyon setleri sergilemektedir (36,37). Bu tür mutasyonlar, konak hücrenin ACE2 reseptörüne bağlanmayı artırabilir veya önceki enfeksiyonlardan ya da aşılamalardan üretilen nötralize edici antikorlara karşı direnç kazandırabilir (38). Bu mutasyonların varlığı

viral bulaşmayı kolaylaştırabilir ve önceki Omicron alt varyantlarına kıyasla artan enfeksiyon oranlarına yol açabilir.

Bu alt soylar, popülasyondaki aşılama ve doğal bağışıklığın oluşturduğu seçilim baskıları altında ortaya çıktıkları için, SARS-CoV-2'nin devam eden edinsel evriminin altını çizmektedir. Önceki çalışmalar, bulaşıcılığı ve immün kaçışı artıran mutasyonlara sahip varyantların çoğalma eğiliminde olduğunu göstermiştir (37). Örneğin XEC varyantı, antikorlardan kaçma yeteneğiyle dikkat çekmiştir ve bu nedenle mevcut aşıların ve monoklonal antikor tedavilerinin etkinliğini zayıflatabilir (39).

2.2. VİRAL ENFEKSİYONLARA KARŞI BAĞIŞIKLIK YANITI

Viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtı, virüsün konak tarafından tespit edilmesiyle hemen başlayan karmaşık bir sistemdir. Bu yanıt temel olarak doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarına ayrılır; doğal yanıt ilk savunma hattı olarak görev yapar. Viral enfeksiyon üzerine, konak hücrelerdeki Patern Tanıma Reseptörleri (PRR'ler), virüsten kaynaklanan Patojen İlişkili Moleküler Paternleri (PAMP'ler) tanımlayarak; doğal bağışıklık yanıtının kritik bileşenleri olan Tip I İnterferonların (IFN'ler) ve pro-inflamatuar sitokinlerin üretimine yol açan hücre içi sinyal yolaklarını aktive eder. Bu başlangıç aktivasyonu, viral replikasyonu ve yayılımı kısıtlamaya yardımcı olur (40,41).

2.2.1. Doğal Bağışıklık Yanıtı

Doğal bağışıklık yanıtı temel olarak; antiviral mediyatörlerin indüklenmesine yol açan bir dizi alt sinyal yolağını tetikleyen PRR'ler tarafından viral bileşenlerin tanınmasını içerir. Viral giriş üzerine konak hücreler; virüslere özgü olan PAMP'ları tespit etmek için Toll-Benzeri Reseptörler (TLR'ler) ve Siklik GMP-AMP Sentaz (cGAS) gibi PRR'leri kullanır. PRR'lerin aktivasyonu, IFN'ler ve çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin üretimiyle sonuçlanan sinyal kaskadlarını başlatır. Bu tip I IFN'ler, İnterferon Uyarımlı Genlerin (ISG'ler) ekspresyonu yoluyla viral replikasyonu inhibe ederek çevre hücrelerde bir antiviral durum oluşturmak üzere hareket eder (42).

Doğrudan antiviral mekanizmalara ek olarak doğal bağışıklık yanıtı; virüsle enfekte olmuş hücrelerin tanımlanmasında ve ortadan kaldırılmasında kritik roller

oynayan Doğal Öldürücü (NK) hücreler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu kapsar. NK hücreleri stres altındaki hücreleri tanıyabilir ve onları apoptoza teşvik ederek viral yayılımı sınırlar (43). Dendritik hücreler; viral antijenleri yakalayıp T hücrelerine sunarak onların aktivasyonunu kolaylaştırdıkları için, doğal ve edinssel bağışıklık yanıtları arasında köprü kurmada özellikle önemlidir (44).

Doğal bağışıklık yanıtının düzenlenmesi çok önemlidir; aşırı inflamasyon, konak için zararlı olabilen sitokin fırtınaları gibi patolojik durumlara yol açabilir (44). Etkili antiviral savunmalar ile bağışıklık sistemi içindeki homeostazın (dengenin) korunması arasındaki dengeyi anlamak, her iki husus da viral enfeksiyonların çözümlenmesi ve kapsamlı doku hasarının önlenmesi için hayati olduğundan, aktif bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir (45).

2.2.2. Edinsel Bağışıklık Yanıtı

Viral enfeksiyonlara karşı edinsel bağışıklık yanıtı, viral bir patojenle ilk karşılaşmayı takiben gelişen oldukça özelleşmiş bir mekanizmadır. Bu yanıt temel olarak; spesifik viral antijenlerin tanınmasında, bellek yanıtlarının oluşturulmasında ve sonraki enfeksiyonlara karşı etkili bir savunma geliştirilmesinde kritik roller oynayan B ve T lenfositlerini içerir (46).

Viral enfeksiyon üzerine DC'ler, viral antijenleri yakalayan, işleyen ve ardından bunları lenf düğümlerindeki naif T hücrelerine sunan kritik antijen sunan hücreler olarak hareket eder (47). Bu etkileşim, hem $CD4^+$ yardımcı T hücrelerinin hem de $CD8^+$ sitotoksik T lenfositlerin (CTL) aktivasyonu ve farklılaşması için esastır. $CD4^+$ T hücreleri, B hücresi yanıtlarını uyaran ve $CD8^+$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artıran sitokinler üreterek yardım sağlarken; $CD8^+$ T hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri doğrudan parçalamaktan (lizis) sorumludur (46). Bu yanıtın amplifikasyonu, viral enfeksiyonların etkili bir şekilde kontrol altına alınması ve elimine edilmesi için kritiktir.

B hücreleri de viral antijenleri spesifik olarak hedefleyen antikorlar üreterek çok önemli bir rol oynar. Antikorlar; virüsleri doğrudan nötralize ederek konak hücrelere girişlerini önleyebilir veya opsonizasyon ve kompleman aktivasyonu yoluyla enfekte hücreleri yıkım için işaretleyebilir (48). Nötralize edici antikorlar,

virüsün konak hücrelerdeki reseptörüne bağlanmasını engelleyebilir, böylece viral girişi ve replikasyonu sekteye uğratır. B hücreleri tarafından oluşturulan humoral bağışıklık yanıtı, immünolojik bellek yaratarak sonraki enfeksiyonlara karşı koruma sağlamak için hayati önem taşır. Çalışmalar, SARS-CoV-2 gibi viral enfeksiyonlardan iyileşmenin, yeniden maruz kalma durumunda koruma sağlayabilen güçlü antikor yanıtları ortaya çıkardığını göstermektedir (49).

Edinsel bağışıklık yanıtının önemli bir yönü, immünolojik bellek olgusudur. Bir virüse ilk maruziyetin ardından hem bellek T hücreleri hem de bellek B hücreleri uzun süre varlıklarını sürdürür; bu da aynı veya benzer patojenlerle sonraki enfeksiyonlara karşı daha hızlı ve daha güçlü bir yanıt verilmesini sağlar (50). Örneğin, SARS-CoV-2'nin uzun süreli hücresel bağışıklık oluşturduğu gösterilmiştir; bu da bireylerin akut enfeksiyonun çözülmesinden sonra bile yeniden enfeksiyona karşı koruyucu bağışıklığı koruyabileceklerini düşündürmektedir (46). Ancak, Omicron gibi varyantlarda görüldüğü üzere viral evrim; virüsün immün yanıttan kaçmasına izin veren kilit antijenik bölgelere mutasyonlar getirerek önceden var olan bağışıklığın etkinliğini etkileyebilir (51).

2.3. $CD4^+$ T HÜCRELERİ (YARDIMCI T HÜCRELERİ)

$CD4^+$ T hücrelerinin yapısı, bağışıklık yanıtındaki işlevlerini yerine getirmelerini sağlayan çeşitli temel özelliklerle karakterize edilir. T yardımcı hücreleri olarak da bilinen $CD4^+$ T hücreleri; yüzeylerinde T Hücre Reseptörü (TCR) için bir eş reseptör (ko-reseptör) görevi gören CD4 glikoproteinini eksprese eden bir T lenfosit alt tipidir. Bu eş reseptör; dendritik hücreler, makrofajlar ve B hücreleri gibi profesyonel Antijen Sunan Hücrelerde (APC'ler) bulunan Majör Histouyumluluk Kompleksi (MHC) sınıf II molekülleri tarafından sunulan antijenlerin tanınması için çok önemlidir (52).

CD4 proteini, TCR-CD3 kompleksi ile ilişkili olan yaklaşık 55 kDa'lık tek zincirli bir glikoproteindir. Bu kompleks, antijen tanınması üzerine T hücresi aktivasyonu için esastır (53). T hücresi aktivasyonu sürecinde, TCR'nin bir antijen-MHC sınıf II kompleksine bağlanması hem TCR hem de CD4 moleküllerinde konformasyonel değişiklikleri indükleyerek hücre aktivasyonuna, proliferasyonuna (çoğalmasına) ve çeşitli fonksiyonel alt kümelere farklılaşmasına yol açan alt sinyal yolaklarını kolaylaştırır (54).

$CD4^+$ T hücreleri sitokin üretim yetenekleri ile ayırt edilirler. Aktivasyon üzerine, aktivasyon fazı sırasında ortamlarında bulunan sitokinlere bağlı olarak Th1, Th2, Th17 ve T Foliküler Yardımcı Hücreleri (Tfh) gibi çeşitli yardımcı alt kümelere farklılaşabilirler. Bu alt kümelerin her biri benzersiz bir sitokin profiline ve işleve sahiptir; örneğin Th1 hücreleri hücresel bağışıklığı teşvik eden IFN-γ üretirken, Th2 hücreleri humoral bağışıklık yanıtlarını destekleyen IL-4 salgılar (55).

Morfolojik olarak $CD4^+$ T hücreleri, tipik olarak 8 ila 20 mikrometre arasında değişen bir çapa sahip yuvarlak bir hücre gövdesi ve hücre hacminin önemli bir kısmını kaplayan büyük bir çekirdek sergiler. Sitoplazma; hücrenin bağışıklık yanıtlarındaki işlevi için kritik olan yüksek metabolik aktivitesini ve protein sentezi yeteneklerini yansıtan mitokondri. Yüzey belirteçleri açısından, aktive olmuş $CD4^+$ T hücreleri CD4'e ek olarak; APC'ler üzerindeki B7 moleküleriyle etkileşim üzerine gerekli ko-stimülatör sinyalleri sağlayan CD28 ve B hücrelerini aktive etmek ve antikor üretimini kolaylaştırmak için önemli olan CD40L (CD154) gibi diğer belirteçleri de eksprese eder (56,57).

2.3.1. $CD4^+$ T Hücrelerinin Gelişimi, Aktivasyonu ve Farklılaşması

$CD4^+$ T hücrelerinin gelişimi, aktivasyonu ve farklılaşması; viral enfeksiyonlara karşı edinsel bağışıklık yanıtında kritik süreçlerdir ve bu süreçler, naif $CD4^+$ T hücrelerini viral patojenlerle savaşabilen spesifik efektör fenotiplere yönlendiren çeşitli hücre dışı uyaranlar ve hücre içi sinyallerden etkilenir. Naif $CD4^+$ T hücreleri kemik iliğinden köken alır ve timusta olgunlaşır; burada güçlü bir otoreaktivite göstermeden kendi MHC moleküllerini tanıma yeteneklerini garanti altına alan seçilim süreçlerinden geçerler. Bu hücreler periferik kana salındıktan sonra, lenf düğümleri ve dalak gibi ikincil lenfoid organlarda dolaşırlar ve burada dendritik hücreler gibi APC'ler tarafından sunulan spesifik antijenlerle karşılaştıklarında aktivasyonları gerçekleşir. MHC sınıf II molekülleri bağlamında TCR aracılığıyla antijen tanınması üzerine, naif CD4+ T hücreleri ko-stimülatör moleküllerden (örneğin, APC'ler üzerindeki CD80/CD86 ile etkileşime giren CD28) ek sinyaller alırlar. Bu birincil sinyal; çevreleyen mikroçevreden gelen (IL-12, IL-4 veya Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF-β) gibi) sitokin sinyalleri ile birleşerek aktivasyon sürecini başlatır ve T hücresi proliferasyonu ve klonal genişleme ile sonuçlanır (55,58,59).

Aktivasyonu takiben $CD4^+$ T hücreleri, maruz kaldıkları spesifik sitokinlere bağlı olarak farklı efektör fonksiyonlara sahip çeşitli alt kümelere farklılaşır. Örneğin, IL-12 ve IFN-γ tarafından indüklenen Th1 hücreleri; özellikle hücre içi patojenlerle mücadelede sitotoksik $CD8^+$ T hücrelerinin ve makrofajların işlevselliğini artırarak hücresel bağışıklık yanıtı için kritik öneme sahiptir. Buna karşılık, IL-4 tarafından teşvik edilen Th2 hücreleri, hücre dışı parazitlere karşı bağışıklık yanıtına katkıda bulunur ve İmmunoglobulin E (IgE) antikorları üretmek üzere B hücresi sınıf değişimini etkileyerek alerjik reaksiyonlarda rol oynar. Bir diğer önemli grup olan T Tfh hücreleri ise germinal merkezlerdeki B hücrelerine yardım sağlamakla görevlidir. Kemokin reseptörü CXCR5 ekspresyonları ve IL-21 üretimleri ile karakterize edilen bu hücreler, viral enfeksiyonlar sırasında antikorların afinite olgunlaşmasında çok önemli bir rol oynar. Ayrıca, TGF-β ve IL-6 tarafından yönlendirilen Th17 hücreleri, IL-17 üretimi yoluyla inflamasyonu teşvik ederek belirli mantarlara ve bakterilere karşı savunmada önemli bir işlev üstlenir (60,61,62).

2.3.2. $CD4^+$ T Hücrelerinin Antiviral Bağışıklıktaki Rolü

$CD4^+$ T hücrelerinin antiviral bağışıklıktaki rolü çok yönlüdür ve viral enfeksiyonlara karşı hem hücresel hem de humoral bağışıklık yanıtlarını koordine etmek için esastır. $CD4^+$ T yardımcı hücreleri; doğrudan efektör işlevler aracılığıyla ve başta B hücreleri ile $CD8^+$ sitotoksik T hücreleri olmak üzere diğer lenfositlere yardım sağlayarak, bağışıklık yanıtının çeşitli bileşenlerini yönetir. APC'ler üzerindeki MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan bir viral antijenle karşılaşılması üzerine, naif $CD4^+$ T hücreleri aktivasyona uğrar. Bu aktivasyon; antijenin TCR'si tarafından tanınmasını ve bununla birlikte CD28 ve diğer ko-stimülatör moleküller aracılığıyla eş sinyal iletimini içerir (58,63).

Aktivasyonu takiben $CD4^+$ T hücreleri; her biri belirgin sitokin profilleri ve efektör işlevlerle karakterize edilen Th1, Th2, Tfh ve Th17 dahil olmak üzere çeşitli alt kümelere farklılaşır (64, 65). Th1 hücreleri, makrofajları aktive eden ve $CD8^+$ T hücresi yanıtlarını artıran IFN-γ üreterek, virüsler dahil olmak üzere hücre içi patojenlerle mücadelede özellikle önemlidir (66,67). Th1 hücreleri ayrıca, virüsle enfekte olmuş hücreleri doğrudan öldüren CTL'ler üretimini teşvik eder (66).

Tfh hücrelerinin rolü, virüse özgü antikorlar üreten plazma hücrelerine farklılaşmaya yol açan B hücresi aktivasyonunda kritiktir. Bu humoral yanıt, virüsleri nötralize etmek ve yeniden enfeksiyonu önlemek için esastır (64,65).

$CD4^+$ T hücreleri, $CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinin etkinliğine önemli ölçüde yardımcı olur. $CD4^+$ T hücreleri tarafından sağlanan yardım, viral enfeksiyonlar sırasında $CD8^+$ T hücrelerinin genişlemesini (ekspansiyonunu) ve fonksiyonel kapasitesini artırır. Çalışmalar, $CD4^+$ T hücrelerinin tükenmesinin virüslerin yetersiz temizlenmesine yol açtığını göstererek, viral enfeksiyonlara karşı güçlü $CD8^+$ T hücresi yanıtlarının sağlanmasındaki kritik rollerini ortaya koymuştur (64).

$CD4^+$ T hücreleri, viral enfeksiyonlar sırasında bağışıklık manzarasını şekillendiren sitokin üretiminde çok önemli bir rol oynar. $CD4^+$ T hücreleri tarafından üretilen IL-2, IFN-γ ve IL-4 gibi sitokinlerin; B hücresi yanıtlarını artırmak ve $CD8^+$ T hücrelerinin sitotoksik işlevlerini teşvik etmek de dahil olmak üzere, diğer bağışıklık hücrelerini aktive etme ve düzenleme üzerinde yaygın etkileri vardır. Örneğin IL-2, T hücresi proliferasyonu için esas iken; IFN-γ, makrofaj aktivasyonu ve genel antiviral yanıtın iyileştirilmesi için hayati öneme sahiptir (66, 67).

Patojen temizliğindeki anlık işlevlerine ek olarak, $CD4^+$ T hücreleri immünolojik belleğin oluşturulmasında da önemli bir yere sahiptir. Bellek $CD4^+$ T hücreleri uzun ömürlüdür ve aynı viral patojene yeniden maruz kalındığında hızla yanıt vererek, daha hızlı ve daha verimli bir bağışıklık yanıtını kolaylaştırır (64, 67). İkincil yanıtlar sırasında B hücrelerine ve $CD8^+$ T hücrelerine yardım sağlama yetenekleri, önceden karşılaşılmış virüslere karşı uzun süreli bağışıklığın sürdürülmesi için kritiktir (68).

2.4. BELLEK $CD4^+$ T HÜCRESİ VE ALT TİPLERİ

İmmünolojik belleğin, özellikle de bellek T hücresi alt kümelerini içeren önemi, önceden karşılaşılmış patojenlere karşı uzun süreli koruma ve verimli bağışıklık yanıtları oluşturmada son derece büyüktür. İmmünolojik bellek, bağışıklık sisteminin antijenlere yeniden maruz kalındığında daha hızlı ve etkili bir şekilde yanıt vermesini sağlar; bu da enfeksiyonlarda ve aşılamalarda sonuçları önemli ölçüde iyileştirebilir (69, 70).

İmmünolojik bellek, bir antijene ilk maruziyetten sonra oluşur ve aktive olmuş T hücrelerinin bellek T hücrelerine farklılaşmasına yol açar. Bu bellek T hücreleri, antijen temizlendikten sonra uzun süre varlığını sürdürerek, aynı patojene sonraki maruziyetlerde konağa daha hızlı ve daha güçlü bir yanıt sağlar. Bu süreç; Merkezi Bellek T Hücreleri (TCM), Efektör Bellek T Hücreleri (TEM) ve Terminal Farklılaşmış Efektör Bellek T Hücreleri (TEMRA) gibi farklı bellek T hücresi alt kümelerinin ortaya çıkışını içerir (69,70).

2.4.1. Merkezi Bellek T hücreleri

Merkezi bellek T hücreleri, edinsel bağışıklık yanıtı için kritik öneme sahip belirgin fenotipik ve fonksiyonel özelliklerle karakterize edilen bellek T hücrelerinin bir alt kümesidir. Spesifik antijenlerle yeniden karşılaşma durumunda hızlı ve duyarlı bir koruma sunarak uzun süreli bağışıklıkta kilit bir rol oynarlar. Merkezi bellek T hücreleri tipik olarak; başta CD45RO (bellek belirteci), CD27 (hayatta kalma ve idame) ve CCR7 (lenfoid dokulara yönelim belirteci) olmak üzere spesifik yüzey belirteçleri ile tanımlanır (71,72). Bu kombinasyon, lenf düğümleri ve dalak gibi ikincil lenfoid organlarda dolaşmalarına ve burada daha önce karşılaşılmış antijenlere hızla yanıt vermelerine olanak tanır. TCM hücreleri, bağışıklık sisteminde uzun ömürlülüğü sağlayan kendi kendini yenileme yeteneklerine sahiptir. Anında yanıt oluşturmak için dokulara göç eden efektör bellek T hücrelerinin aksine, TCM hücreleri lenfoid organlarda kalır; böylece antijene yeniden maruz kalma durumunda yeniden aktive olmaya hazır, antijene özgü T hücrelerinden oluşan önemli bir rezervuar sağlar (72,73). Yeniden aktive olduklarında merkezi bellek T hücreleri, hızla çoğalabilir ve daha önce karşılaşılmış patojenlere karşı güçlü bağışıklık yanıtları oluşturabilen efektör T hücrelerine farklılaşabilir (74). Bu özellik, etkili ikincil bağışıklık yanıtları için esastır.

TCM hücreleri, bir antijene yeniden maruz kalındığında hızlı bir bağışıklık yanıtını kolaylaştırır ve naif T hücrelerine kıyasla daha hızlı ve daha verimli bir ikinci dalga yanıtına olanak tanır (75). Efektör hücrelere farklılaşarak; $CD8^+$ T hücreleri ve B hücreleri dahil olmak üzere diğer bağışıklık bileşenlerini aktive etmek için kritik olan IFN-γ ve IL-2 gibi sitokinleri üretebilirler (72,76). Ayrıca TCM hücreleri, antikor üretimi için B hücrelerine hayati yardım sağlar. Sitokin üretimi ve doğrudan hücre etkileşimleri yoluyla B hücrelerinde afinite olgunlaşmasını ve sınıf değişimini teşvik

ederek, antikor yanıtının kalitesini ve miktarını artırırlar (77). Merkezi bellek T hücreleri, immünolojik belleğin oluşturulması ve sürdürülmesi için hayati öneme sahiptir. Sonraki enfeksiyonlar veya aşılamalar sırasında ihtiyaç duyulduğunda hızla yeniden aktive olabilen, uzun ömürlü bir popülasyonu idame ettirerek patojenlere karşı sürdürülebilir koruma sağlarlar (71,72,75,78).

2.4.2. Efektör Bellek T hücreleri

Efektör bellek T hücreleri, önceden karşılaşılmış patojenlere karşı hızlı koruyucu bağışıklık sağlayarak edinsel bağışıklık yanıtında hayati bir rol oynayan, bellek T hücrelerinin kritik bir alt kümesidir. Özellikleri ve işlevleri, ani yanıt için uzmanlaşmalarını ve hem viral hem de bakteriyel enfeksiyonlardaki rollerini yansıtır. Efektör bellek T hücreleri, öncelikli olarak CD45RO (bir bellek T hücresi belirteci) gibi spesifik yüzey belirteçlerinin ekspresyonu ve CD62L'nin yokluğu ile karakterize edilir. TEM hücreleri genellikle, efektör işlevlerini yerine getirebilecekleri dokulara göçlerini kolaylaştıran CCR5 veya CXCR3 gibi diğer belirteçleri de eksprese eder (75). TEM hücreleri, ağırlıklı olarak inflamasyonlu bölgeler dahil olmak üzere periferik dokularda bulunur ve ikincil lenfoid organlara yeniden yerleşmeye gerek duymadan antijenle yeniden karşılaşmaya hızla yanıt verebilir; bu da hızlı bir bağışıklık yanıtına olanak tanır (75). Uzun bir yaşam süresine sahip olan ve lenfoid dokularda kendi kendini yenileyebilen merkezi bellek T hücrelerinin aksine, efektör bellek T hücreleri genellikle kısa ömürlüdür ancak antijenle karşılaşma üzerine hızla yeniden çoğalma yeteneğine sahiptir. Bu durum, sitokin üretebilen ve sitotoksik işlevler sergileyebilen efektör hücrelere hızla farklılaşmalarını sağlar (54,79).

TEM hücrelerinin birincil rollerinden biri, enfeksiyonlara karşı hızlı yanıtlara aracılık etmektir. Spesifik antijenleriyle yeniden karşılaştıklarında hızla çoğalabilir ve bağışıklık yanıtlarını yönetmek ve diğer bağışıklık hücrelerini aktive etmek için gerekli olan IFN-γ, TNF-α ve IL-2 gibi çeşitli efektör sitokinleri üretebilirler (80). Bazı TEM hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini doğrudan öldürmelerini sağlayan sitotoksik yeteneklere sahiptir. Bu işlev, özellikle efektör bellek $CD4^+$ T hücrelerinin $CD8^+$ T hücresi yanıtlarını artırabildiği ve enfekte hücrelerin eliminasyonuna katılabildiği viral enfeksiyonlarda önemlidir (81,82). Ayrıca TEM hücreleri, B hücrelerine yardım sağlayarak humoral bağışıklığa da katkıda bulunur. Sitokin üretimi ve doğrudan hücre etkileşimleri yoluyla TEM

hücreleri; B hücresi aktivasyonunu, sınıf değişimini (class switching) ve afinite olgunlaşmasını kolaylaştırarak güçlü antikor üretimine yol açar (83). TEM hücrelerinin periferik dokulardaki lokalizasyonu, o bölgelerdeki viral ve bakteriyel enfeksiyonlara süratle yanıt vermelerine olanak tanır. Bu doku yerleşik özelliği, anında koruma sağlamak ve patojen yayılımını en aza indirmek için hayati önem taşır (84).

2.4.3. Terminal Farklılaşmış Efektör T Hücreleri

TEMRA, özellikle kronik enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtında temel olan belirgin özellikler ve işlevler sergileyen benzersiz bir bellek T hücresi alt kümesini temsil eder. TEMRA hücreleri, CD45RA ekspresyonu ve beraberinde CCR7 yokluğu ile karakterize edilir; bu durum onları merkezi bellek ve efektör bellek hücreleri gibi diğer bellek T hücresi alt kümelerinden ayırır (85,86). Tipik olarak $CD45RA^{+}$ $CD62L^{-}$ $CCR7^{-}$ fenotipinde sunulan bu hücreler, sıklıkla CD57 gibi belirteçlerin yüksek ekspresyonu ve azalmış çoğalma kapasitesi dahil olmak üzere hücresel yaşlanma (senesens) ile ilişkili özellikler sergiler (87). Bu belirteçler, TEMRA hücrelerinin inatçı antijen stimülasyonuna yanıt olarak kapsamlı bölünmeler geçirerek farklılaşmanın ileri aşamasında olduklarını gösterir. Ayrıca, lenf düğümleri içinde dolaşan TCM hücrelerinin aksine, TEMRA hücreleri birincil olarak periferik kanda ve inflamasyon veya doku hasarı bölgelerinde lokalize olarak yeniden enfeksiyona anında yanıt verilmesini sağlar (88).

TEMRA hücrelerinin işlevleri açısından bakıldığında, aynı antijenle (genellikle bir patojen tarafından yeniden enfeksiyon) karşılaşılması üzerine hızla çoğalabilir ve efektör işlevler sergileyebilirler. Hızlı yanıtları, kronik enfeksiyonların veya yeniden enfeksiyonların kontrol altına alınması ve temizlenmesi için çok önemlidir ve bu da onları etkili bağışıklık için hayati kılar (89). TEMRA hücreleri, virüsle enfekte olmuş hücreleri veya tümör hücrelerini doğrudan ortadan kaldırmalarına olanak tanıyan granzim B ve perforin gibi sitotoksik moleküllerin artmış üretimi ile bilinir (90). Bu sitotoksik yetenek, enfekte hücrelerin hızlı hücre ölümünün gerekli olduğu senaryolarda kritiktir. Bu hücreler, inatçı viral yüklerin yönetimine katkıda bulundukları HIV ve Sitomegalovirüs (CMV) gibi kronik viral enfeksiyonlar sırasında sıklıkla çoğalırlar. Ancak varlıkları, özellikle $CD57^{+}$ olduklarında ve azalmış fonksiyonel kapasite gösterdiklerinde, immün tükenmişlik

(exhaustion) ile korelasyon gösterebilir (91). Bu ikilik, etkili bağışıklık ile potansiyel patolojiyi dengelemek için TEMRA hücresi aktivitelerinin dikkatli bir şekilde düzenlenmesi gerekliliğini vurgular. Ayrıca TEMRA hücreleri, antikor üretiminde B hücrelerine yardım etmek de dahil olmak üzere diğer bağışıklık hücrelerine destek sağlayarak genel adaptif bağışıklık yanıtını güçlendirebilir. Enfeksiyonlara karşı koordineli bağışıklık yanıtını pekiştirmek adına doğal bağışıklık hücreleri ile de etkileşime girebilirler (88,89).

Kronik inflamasyon ve immünosenesens içindeki rolleri nedeniyle, TEMRA hücrelerinin otoimmün hastalıklar ve yaşlanma üzerinde klinik etkileri vardır. Birikimleri, yaşlı yetişkinlerde sıklıkla gözlemlenen değişmiş bağışıklık yanıtlarına katkıda bulunabilir (87,92). TEMRA, spesifik yüzey belirteci ekspresyonu ve sınırlı çoğalma kapasitesi gibi benzersiz özelliklere sahip olmanın yanı sıra, kronik enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtında ve hızlı antijene özgü yanıtlarda önemli işlevler üstlenirler. Yetenekleri, T hücresi farklılaşmasının karmaşıklığını ve senesens belirteçleriyle ilişkili potansiyel zararlı etkileri yönetirken yeniden enfeksiyonlarla etkili bir şekilde mücadele etmek için dengeli bir bağışıklık stratejisinin gerekliliğini vurgular (92).

2.5. SARS-CoV-2'YE KARŞI OLUŞAN $CD4^+$ T HÜCRE YANITLARI

SARS-CoV-2'ye karşı hem doğal enfeksiyon hem de aşılamada $CD4^+$ T hücrelerini içeren bağışıklık yanıtı hayati bir rol oynar. İşlevsellikleri ve özellikleri hem humoral hem de hücresel bağışıklığı etkileyerek bağışıklık yanıtının genel etkinliğini belirler. SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile, naif $CD4^+$ T hücreleri, profesyonel antijen sunan hücreler üzerindeki MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulan viral antijenleri tanıyan T hücre reseptörleri aracılığıyla aktive edilir (93).

Aktive olan bu hücreler, viral replikasyonu kontrol etmek ve $CD8^+$ T hücresi yanıtlarını teşvik etmek için gerekli sitokinleri üreten Th1 başta olmak üzere çeşitli alt kümelere farklılaşır. COVID-19 hastalarında, dayanıklı antikor yanıtlarıyla korelasyon gösteren, ağırlıklı olarak TNFα üreten bir $CD4^+$ T hücresi popülasyonu gözlemlenmiştir (93). Ayrıca, $CD4^+$ T hücreleri tarafından IFN-γ gibi sitokinlerin üretimi, $CD8^+$ T hücrelerinin sitotoksik aktivitesini artırmak ve B hücrelerini uyarmak için kritiktir; bu da güçlü bir bağışıklık yanıtını kolaylaştırır (94).

İyileşen COVID-19 hastalarında gözlemlenen $CD4^+$ T hücresi yanıtları, yeniden enfeksiyon durumunda hızla yeniden aktive olabilen bir bellek T hücresi havuzunun oluşturulmasıyla devam eder. Çalışmalar, bellek $CD4^+$ T hücrelerinin Omicron varyantı dahil olmak üzere endişe verici varyantlara karşı işlevselliğini koruduğunu göstermiş ve uzun vadeli korumadaki rollerini vurgulamıştır (95,96). Bununla birlikte, yaygın soğuk algınlığı koronavirüslerine daha önce maruz kalmış bireylerin, SARS-CoV-2'ye karşı işlevsel olan çapraz reaktif $CD4^+$ T hücrelerine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, COVID-19'u atlatan bazı aşısız bireylerde görülen bağışıklık korumasına katkıda bulunabilir (97).

Aşılamanın etkinliği açısından bakıldığında; mRNA aşıları da dahil olmak üzere COVID-19 aşıları, güçlü Th1 sitokin profilleriyle karakterize edilen kuvvetli $CD4^+$ T hücresi yanıtları ortaya çıkarır. Aşılama sonrası $CD4^+$ T hücresi aktivasyonu ile nötralize edici antikor seviyeleri arasındaki korelasyonların gösterdiği üzere, bu yanıtlar etkili bir antikor yanıtı için çok önemlidir (94,98). Farklı aşılar, $CD4^+$ T hücresi yanıtlarının büyüklüğü ve işlevselliği açısından değişken sonuçlara yol açabilir. Çalışmalar, mRNA aşılarının, doğal enfeksiyonlara kıyasla daha yüksek seviyelerde spike spesifik $CD4^+$ T hücreleri ve genel olarak daha güçlü bağışıklık yanıtları indüklediğini göstermiştir (99).

Bu bulgu, aşılı bireylerin hafif veya semptomsuz enfeksiyon geçirenlere kıyasla daha uzun süreli bağışıklığa sahip olabileceği fikrini desteklemektedir. Öte yandan, HIV ile yaşayan bireylerde aşılama, $CD4^+$ T hücresi sayılarıyla ilişkili değişken bağışıklık yanıtları göstermektedir. Bu bireylerdeki düşük $CD4^+$ T hücresi sayıları, aşılara karşı antikor yanıtlarını olumsuz etkileyebilir (100,101).

Aşılama sonrası $CD4^+$ T hücrelerinin varlığı, şiddetli enfeksiyonlara karşı bireysel koruma hakkında önemli bilgiler sunar. Güçlü $CD4^+$ T hücresi yanıtları hastalığın şiddetinin azalmasına katkıda bulunur ve bu hücrelerin aşı dağıtımı ve etkinlik değerlendirmesine ilişkin klinik kararları yönlendirmedeki potansiyel rolünü destekler (96). COVID-19 enfeksiyonu ve aşılamasında $CD4^+$ T hücresi yanıtları, etkili bir bağışıklık oluşturmak için temeldir. Sadece sitotoksik hücrelerin aktivasyonu yoluyla viral replikasyonun önlenmesini koordine etmekle kalmayıp, aynı zamanda B hücresi etkileşimi yoluyla humoral yanıtların artırılmasını da sağlama yetenekleri hem doğal hem de aşı kaynaklı bağışıklıkta önemlidir.

2.5.1. COVID-19 Enfeksiyonu Sonrası Hafıza $CD4^+$ T Hücresi Oluşumu

SARS-CoV-2 ile doğal enfeksiyonun ardından bellek $CD4^+$ T hücresi oluşumunun önemi, kalıcı bağışıklık sağlamak ve vücudun virüse sonraki maruziyetlere hızla yanıt verme yeteneğini artırmak için kritiktir. Bu edinsel bağışıklık yanıtı, COVID-19'a karşı uzun süreli korumada hayati bir rol oynar ve etkili aşılama stratejileri için temel bir unsur görevi görür. SARS-CoV-2 ile doğal enfeksiyonun ardından, $CD4^+$ T hücreleri aktive olur ve ilk enfeksiyonun çözülmesinden uzun süre sonra da varlığını sürdüren bellek T hücrelerine farklılaşır. Bu bellek hücreleri, aynı virüse yeniden maruz kalındığında hızlı yeniden aktivasyon için çok önemlidir ve bağışıklık sisteminin naif T hücrelerine kıyasla daha hızlı ve daha etkili bir yanıt vermesini sağlar (76,102). Bu hücrelerin kalıcılığı, bağışıklık sisteminin patojene dair bir "bellek" tutmasını sağlar ve sonraki maruziyetlerde yeniden enfeksiyon veya şiddetli hastalık riskini önemli ölçüde azaltır (103).

COVID-19 vakalarında, özellikle hafif ila orta şiddette hastalıktan iyileşen hastalar arasında; Th1 ve Tfh hücreleri dahil olmak üzere spike-spesifik $CD4^+$ T yardımcı hücrelerinin kayda değer bir indüksiyonu gözlemlenmiştir. Bu hücreler, B hücrelerinin aktivasyonunu ve virüsü nötralize etmek için gerekli yüksek afiniteli antikorların üretimini artırarak bağışıklık yanıtını yönetmede kritik bir rol oynar (104). Spesifik olarak Tfh hücreleri, dayanıklı antikor yanıtlarının oluşturulmasına yol açan germinal merkez reaksiyonlarını destekler ve uzun ömürlü bağışıklığı beslemedeki önemlerini gösterir (105). Çalışmalar, COVID-19'dan iyileşen bireylerin, spike-spesifik $CD4^+$ bellek T hücrelerinin güçlü bir oluşumunu sergilediğini göstermiştir (106). Bu bellek T hücreleri sadece bir Th1 yanıtı ile sınırlı değildir; hem humoral hem de hücresel bağışıklığa katkıda bulunan çeşitli fonksiyonel fenotipleri kapsayarak, endişe verici varyantlar dahil olmak üzere virüsün değişen suşlarına karşı direnci artırırlar (107). Bu T hücresi popülasyonlarının varlığı, SARS-CoV-2'ye daha fazla maruz kalındığında yeniden aktive olup antikor üretimini ve sitotoksik yanıtları hızla kolaylaştırabildikleri için uzun vadeli bağışıklığın sürdürülmesi adına kritiktir.

Doğal SARS-CoV-2 enfeksiyonunu takiben bellek $CD4^+$ T hücrelerinin güçlü bir şekilde üretilmesinin, aşı geliştirme ve halk sağlığı stratejileri üzerinde önemli etkileri vardır. Benzer bellek yanıtlarını ortaya çıkarmayı amaçlayan aşılar, COVID-19'dan konvalesan bireylerde görülen bağışıklık yanıtlarının genişliğini ve derinliğini

taklit ederek aşılı popülasyonlarda korumayı artırabilir (108). Bu bellek $CD4^+$ T hücrelerinin özelliklerini anlamak, uzun süreli bağışıklık ve çeşitli viral varyantlara karşı etkili koruma sağlayan aşıların tasarımına rehberlik edebilir (109). Ayrıca, bellek $CD4^+$ T hücrelerinin seviyelerini ve işlevselliğini değerlendirmek, bir bireyin SARS-CoV-2'ye karşı koruyucu statüsünü belirlemede önemli bir immün korelasyon görevi görebilir. Güçlü humoral yanıtları kolaylaştırmadaki, viral varyantlara uyum sağlamadaki ve aşı geliştirmeye rehberlik etmedeki rolleri, etkili hastalık kontrolü ve önlenmesi için bir strateji olarak bellek $CD4^+$ T hücresi dinamikleri üzerine devam eden araştırmaların öneminin altını çizmektedir (108,109).

2.6. T HÜCRESİ AKTİVASYON DİNAMİKLERİ VE TEMEL YÜZEY BELİRTEÇLERİ

T hücresi aktivasyonu hem edinsel bağışıklık yanıtı hem de etkili immünolojik belleğin gelişimi için kritik bir süreçtir. Uyarılma üzerine T hücrelerinde aktivasyon belirteçlerinin ekspresyonu; aktivasyon durumlarının, fonksiyonel hazır bulunuşluklarının ve farklılaşmalarının ana göstergelerinden biri olarak hizmet eder. Enfeksiyonlar ve aşılamalar sırasında bağışıklık yanıtı dinamikleri hakkında fikir veren temel aktivasyon belirteçleri arasında CD69, CD137, CD25 ve diğerleri yer almaktadır (110).

Aktive olmuş bu hücrelerin bir alt grubu, antijene tekrar maruz kalındığında bağışıklık sağlamak üzere uzun süre varlığını sürdüren bellek T hücrelerine dönüşür. Bu bağlamda T hücresi popülasyonu; naif T hücreleri, TSCM, TCM, TEM ve TEMRA olmak üzere, her biri flow sitometri ile izlenebilen belirgin fenotipik özelliklere, işlevsel rollere ve farklılaşma yollarına sahip çeşitli alt gruplara ayrılır (69,70). Bu alt popülasyonların en başında, henüz spesifik antijenleriyle karşılaşmamış olan ve lenfatik dokular ile kanda dolaşan naif T hücreleri yer alır. Tipik olarak CD45RA ve CCR7 eksprese eden bu hücreler, antijen sunan hücreler üzerindeki MHC molekülleri tarafından sunulan antijeni tanıdıklarında klonal genişlemeye uğrayarak efektör veya bellek hücrelerine farklılaşma sürecini başlatırlar. Bu sürecin erken aşamalarında ortaya çıkan TSCM hem CD45RA hem de CCR7 ekspresyonunu korurken pluripotent progenitörlere özgü belirteçler taşır ve kendi kendini yenileme kapasitesine sahiptir (75,87).

Farklılaşma spektrumunun devamında, lenf nodlarına yerleşimi sağlayan CD45RO ve CCR7 ekspresyonu ile karakterize edilen TCM bulunur. Bu hücreler, antijene tekrar maruz kalındığında hızla çoğalıp farklılaşarak lenfoid dokularda uzun süreli bir koruma sağlarlar. Buna karşılık, periferik dokularda ve kanda dolaşan TEM, CD45RA ve CCR7 ekspresyonunu kaybetmiş ($CD45RA^{-}CCR7^{-}$) farklılaşmış hücrelerdir. TEM hücreleri, patojenle tekrar karşılaşıldığında IFN-γ gibi sitokinler salgılayarak ve sitotoksik işlevler sergileyerek enfekte hücreleri hızla elimine etmeye hazırdır. Son aşamada ise, genellikle kronik enfeksiyonlarda veya persistan patojenlere verilen yanıtlarda görülen, CD45RA'yı yeniden eksprese eden ancak CCR7 taşımayan ($CD45RA^{+}CCR7^{-}$) TEMRA yer alır (72,79,88).

Aktive olmuş T hücrelerinde eksprese edilen en erken belirteçlerden biri olan CD69, TCR etkileşiminden kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve yaygın olarak aktive olmuş T hücrelerini tanımlamak için kullanılır (110). CD69, kalsiyum girişini ve T hücresi proliferasyonu ile IL-2 ve IFN-γ dahil olmak üzere sitokin üretimini kolaylaştıran hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazların (ERK1/2) aktivasyonunu teşvik eden yolaklar aracılığıyla sinyal verir (111). Bir aktivasyon belirteci olarak CD69, $CD4^{+}$ ve $CD8^{+}$ T hücrelerinin erken aktivasyonu için önemlidir; bu hücrelerin antijenlere anında yanıt verdiğini ve işlevsel olarak aktif bir duruma geçişlerini gösterir (112). Bir diğer önemli belirteç olan CD137 (4-1BB), tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör ailesinin bir üyesi olarak işlev gören ve T hücresi aktivasyonu üzerine eksprese edilen ko-stimülatör bir moleküldür. Ekspresyonu, T hücresi proliferasyonu ve hayatta kalımı ile korelasyon gösterir; bu da onu T hücresi aktivasyonunu ve işlevselliğini değerlendirmede çok önemli bir belirteç haline getirir (113,114). CD137'nin ligandı (CD137L) aracılığıyla bağlanması, sitokin üretimi ve sitotoksik aktivite dahil olmak üzere T hücresi efektör işlevlerini artırarak genel bağışıklık yanıtını güçlendirir (115). Çalışmalar, CD137'nin daha farklılaşmış bir T hücresi durumunu işaret ettiğini ve bağışıklık yanıtında T hücresi genişlemesini ve uzun süreli kalıcılığını artıran kritik sinyaller sağladığını göstermiştir (110).

IL-2 reseptörünün alfa zinciri olan CD25, iyi bilinen bir diğer aktivasyon belirtecidir. Ekspresyonu T hücresi aktivasyonu ile ilişkilidir ve T hücresi proliferasyonu için kritiktir (116). Yüksek CD25 seviyeleri, T hücrelerinin büyüme

ve farklılaşma için kilit bir sitokin olan IL-2'ye yanıt verebilirliğini kolaylaştırarak bağışıklık yanıtını daha da güçlendirir (117).

Tüm bu alt popülasyonların ve gelişimsel süreçlerin analizinde flow sitometri, immünolojide merkezi bir analitik araç olarak öne çıkmaktadır. Araştırmacılar; CD45RA, CCR7 ve CD27 gibi soy ve CD69, CD137 ve CD25 gibi aktivasyon belirteçlerine yönelik florokrom işaretli antikor panelleri kullanarak, sağlık ve hastalık durumlarında T hücresi popülasyonlarının detaylı profillerini çıkarabilirler. Bu analizler, aşılama ve enfeksiyon dahil olmak üzere çeşitli bağlamlarda immün yanıt dinamiklerini aydınlatır. İmmünoinformatik ve flow sitometri teknolojilerindeki gelişmeler, bu mekanizmaların anlaşılmasını derinleştirerek immünolojik hastalıkların tanı, izlem ve tedavisinde daha etkili stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyacaktır.

2.7. ORİJİNAL ANTİJENİK SİN (IMMUNE IMPRINTING) KAVRAMI

İmmünolojik imprinting olarak da bilinen Orijinal Antijenik Sin, bağışıklık sisteminin sonraki enfeksiyonlara veya aşılamalara verdiği yanıtın, belirli bir antijene ilk maruziyetten nasıl etkilendiğini tanımlayan bir olgudur. İlk kez 1960 yılında Thomas Francis Jr. tarafından influenza çalışmalarıyla ortaya konan OAS, ilk maruziyetler sırasında oluşan bağışıklık belleklerinin, ilişkili ancak antijenik olarak farklı patojenlere karşı sonraki bağışıklık yanıtlarını baskılama eğilimini yansıtır; böylece benzer antijenlerle gelecekteki karşılaşmalarda antikor üretiminin hem kalitesini hem de genişliğini şekillendirir (118,119).

OAS kavramı, belirli bir suşa karşı aşılanmış veya bu suşla enfekte olmuş bireylerin, yeni varyantlarla karşılaştıklarında neden kısıtlı bir bağışıklık yanıtı gösterebildiklerini açıklar. Örneğin kanıtlar, eğer orijinal suş baskın bellek olarak korunuyorsa, son viral suşlara verilen yanıtların bu varyantlara özel olarak uyarlanmış güçlü antikor üretimi sağlamadığını öne sürmektedir (120). Bu durum, bireylerin çocukluklarında karşılaştıkları suşlara karşı güçlü bir bağışıklık eğilimi sergilediği ve bunun da yeni varyantlara karşı optimal olmayan yanıtlara yol açtığı influenza çalışmalarında gözlemlenmiştir (121,122). Temel anlayış şudur ki; bağışıklık sistemi uyum sağlama ve yeni yanıt verme yeteneğine sahip olsa da sıklıkla öncelikli olarak önceki maruziyete dayalı bir yanıtı devreye sokar; bu eğilim, hızla evrimleşen virüslere karşı aşı etkinliğini zayıflatabilir (123, 124)

Dahası, SARS-CoV-2 bağlamında ortaya çıkan araştırmalar da benzer immün damgalama modellerinin oluşabileceğini doğrulamakta; virüsün daha önceki varyantlarına karşı geçirilen enfeksiyonların veya aşılamaların, Omicron gibi daha yeni varyantlara verilen bağışıklık yanıtını etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bulgular, daha önceki SARS-CoV suşlarına veya varyantlarına maruz kalma geçmişi olan bireylerin, Omicron varyantına karşı etkili ve spesifik antikor yanıtları oluşturma olasılığının daha düşük olduğunu göstermekte ve "orijinal antijenik sin"ın etkilerini vurgulamaktadır (120,125). Çalışmalar, hatırlatma dozu (booster) aşılamaların, belirli bir yöne kaymış/eğilimli önceki immünolojik bellekler bağlamında uygulandığında bazen güçlü bir bağışıklık yanıtı ortaya çıkarmada başarısız olabileceğini bildirmiştir (124)

2.7.1. Original Antigenic Sin ve SARS-CoV-2

OAS, atasal SARS-CoV-2 suşu ile geçirilen önceki enfeksiyonların, Omicron gibi yeni ortaya çıkan varyantlara karşı bağışıklık yanıtını şekillendirmesinde kritik bir rol oynar. OAS, bağışıklık sisteminin; sonraki antijenik olarak ilişkili suşlarla karşılaştığında, belirli bir viral suşa ilk maruziyet sırasında oluşturulan bellek hücrelerini tercihli olarak kullanması şeklindeki immünolojik olguyu yansıtır. Bu doğal eğilim, mutasyonlar nedeniyle önemli antijenik değişikliklere uğramış varyantlara karşı optimal olmayan koruyucu yanıtlara yol açabilir (126,127).

Araştırmalar, daha önce wild type SARS-CoV-2 virüsü ile enfekte olmuş hastalarda gözlemlenen immün imprinting etkisinin, Omicron gibi varyantlarla sonraki enfeksiyonlarda belirgin antikor ve T hücresi yanıtlarına yol açtığını göstermektedir. Örneğin çalışmalar, Omicron'a karşı antikor yanıtının genellikle atasal suşa spesifik olarak yanıt veren önceden mevcut bellek B hücreleri tarafından domine edildiğini ve bunun da nihayetinde varyanta karşı nötralize edici aktivitenin kapsamını sınırladığını göstermiştir (128,129,130). Bu olgu, bağışıklık sisteminin daha fazla mutasyona uğramış Omicron varyantına özel olarak uyarlanmış güçlü bir yanıt oluşturma yeteneğini engellemekte ve aşılı bireylerde bile görülen enfeksiyonlara (breakthrough infections) ilişkin endişelere yol açmaktadır (129,130).

Önceki enfeksiyonlar ve yeni varyant maruziyetleri arasındaki etkileşim, etkili aşılama stratejileri geliştirmenin zorluğunu vurgulamaktadır. Wild type SARS-CoV-2 spike proteinine dayalı aşılar, şiddetli hastalığa karşı etkili olsa da daha yeni

varyantlardan ziyade orijinal suşa yönelik yanıtları destekleyen bir "imprinting" etkisine katkıda bulunabilir. Sonuç olarak bu durum, önemli ölçüde değişmiş spike proteinleri sunan Omicron gibi belirgin antijenik sapmaya (antigenic drift) sahip, yeni ortaya çıkan varyantlara karşı uygun yanıtların uyarılmasında aşı etkinliğini azaltabilir (123,126).

Çalışmalar, wild type temelli aşılarla aşılanmış bireylerin daha sonra bir Omicron enfeksiyonu geçirdiklerinde, ortaya çıkan bağışıklık yanıtlarının büyük ölçüde, Omicron varyantını hedefleyen *de novo* (yeni/sıfırdan) antikorların üretilmesinden ziyade, önceden var olan belleğin geri çağrılmasıyla karakterize edildiğini göstermektedir (128,129). Wildytpe suşlara karşı önceki bağışıklığın, daha yeni aşıların ve doğal enfeksiyonların etkinliğini olumsuz etkileyebilmesi, OAS'nin daha geniş kapsamlı etkilerini yansıtmaktadır.

2.7.2. Original Antigenic Sin'in SARS-CoV-2'ye Karşı Oluşturulan $CD4^+$ T Hücre Yanıtlarına Etkisi

SARS-CoV-2 bağlamında OAS, $CD4^+$ T hücresi bağışıklığını ve COVID-19'a karşı bağışıklık yanıtının etkilerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu durum, virüsün mutasyona uğraması ve Omicron dahil olmak üzere yeni varyantlar oluşturması nedeniyle özellikle önemlidir. Araştırmalar, SARS-CoV-2'ye özgü $CD4^+$ T hücrelerinin; wild type suşa veya ilişkili koronavirüslere daha önce maruz kalıp kalmadıklarına bağlı olarak farklı profiller sergilediğini göstermektedir (131, 132). Özellikle akut COVID-19 vakaları; $CD4^+$ T hücrelerinin birincil olarak sınırlı IFNγ üretimi ile karakterize edilen erken farklılaşmış bir bellek fenotipi sergilediğini göstermiştir. Buna karşılık, maruziyeti olmayan bireyler sıklıkla sitotoksik T hücreleri açısından zenginleşmiş geç farklılaşmış bellek yanıtları sunmaktadır (133, 134). T hücresi yanıtlarındaki bu varyasyon hastalık şiddeti ile korelasyon göstermekte olup, daha güçlü yanıtlar viral kontrolün ve sonuçların iyileşmesine yol açabilir (134).

OAS olgusu, mevsimsel koronavirüslere karşı önceden bağışıklığı olan bireyler SARS-CoV-2 ile karşılaştığında özellikle belirgindir. Araştırmalar, endemik koronavirüslerle geçirilen önceki enfeksiyonlardan kalan bellek T hücrelerinin SARS-CoV-2 ile çapraz reaksiyona girebildiğini ve böylece bağışıklık yanıtını etkileyebildiğini öne sürmektedir (132,135). Ancak, bu çapraz reaktivite karmaşık bir tablo sunar; SARS-CoV-2'ye karşı erken bağışıklık yanıtlarını artırabilirken, aynı

zamanda yeni ve varyanta özgü bağışıklık yanıtlarının oluşumunu saptırabilir (skew). Bu durum, Omicron gibi daha farklılaşmış suşlara karşı etkinliği potansiyel olarak tehlikeye atabilir (128,136).

Aşılamanın dikkate alınması, immünolojik yanıtları daha da karmaşık hale getirmektedir. Aşılamanın Spike proteinine karşı güçlü $CD4^+$ T hücresi yanıtlarını indüklediği gösterilmiştir, ancak bu yanıtlar önceki enfeksiyonlar tarafından şekillendirilebilir. Daha önce SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş bireyler, aşı kaynaklı T hücresi yanıtlarıyla önemli ölçüde örtüşme göstermekte; bu da söz konusu izlerin (imprints) yeni ortaya çıkan varyantlara karşı aşı etkinliğini nasıl etkilediği konusunda sorular doğurmaktadır (137). Örneğin, aşılama sonrası T hücresi yanıtları; spike proteininde önemli mutasyonlara sahip Omicron gibi varyantlara karşı ideal kapsamı sağlayamayabilecek farklı bellek T hücresi yeniden aktivasyon modelleri sergileyebilir (95,138).

Başlangıçta wild type suşa yanıt veren bellek T hücrelerinin tercihli aktivasyonu nedeniyle, Omicron varyantına verilen yanıtların geçmiş suşlara kıyasla daha zayıf olabileceğini öne sürmektedir (132,139). Bu bulgu, önceki enfeksiyon veya aşılamanın başlangıçtaki bağışıklık yanıtlarını artırabilmesine rağmen, virüsün yüksek oranda mutasyona uğramış versiyonlarını etkili bir şekilde nötralize etmek için gereken çeşitliliği (diversity) istemeden azaltabileceğini göstermektedir (135,140). Özetle, SARS-CoV-2'ye karşı $CD4^+$ T hücresi bağışıklığı bağlamında orijinal antijenik sin'in yansımaları, önceki bağışıklık ile yeni varyantlara karşı etkili yanıtlar oluşturma yeteneği arasındaki kritik etkileşimin altını çizmektedir. Bu dinamiği anlamak, viral manzara evrimleştikçe aşılama stratejilerini oluşturmak ve bağışıklık yanıt profillerini tahmin etmek için esastır.

2.8. İMMÜNOİNFORMATİK VE EPİTOP ANALİZ YÖNTEMLERİ

Hesaplamalı biyolojinin immünolojiye uygulanması olan immünoinformatik; bağışıklık yanıtlarını anlamak ve aşı tasarlamak için hayati önem taşıyan T hücresi epitoplarının tahmin edilmesinde önemli bir alan olarak ortaya çıkmıştır. NetMHCIIpan gibi T hücresi epitop tahmin algoritmaları bu alanda önemli bir rol oynamaktadır. Bu algoritmalar, bilinen MHC-peptid etkileşimlerine ait kapsamlı veritabanlarını entegre eder ve belirli peptid dizilerinin farklı İnsan Lökosit Antijeni (HLA) allellerine nasıl bağlanabileceğini tahmin etmek için makine öğrenmesi

tekniklerini kullanır. Biyoinformatik analizlerin epitop çeşitliliğini klinik sonuçlarla ilişkilendirdiği SARS-CoV-2 gibi çeşitli patojenlere odaklanan çalışmalarda gösterildiği üzere, bu tahminlerin doğruluğu esastır (141,142).

T hücresi epitop tahminindeki temel zorluklardan biri, aşı tasarımları için popülasyon kapsamını önemli ölçüde etkileyen HLA polimorfizmidir. Bilinen 15.000'den fazla HLA alleli ile, aşıların çeşitli insan popülasyonlarındaki etkinliğini artırmak için popülasyona özgü değişkenlik ele alınmalıdır (143). Örneğin kozmopolit ortamlarda, tahmin edilen epitopların bağlanma kapasitesi farklı HLA temsilleri nedeniyle popülasyonlar arasında değişebileceğinden, tek bir epitop tahminine güvenmek aşılara karşı heterojen yanıtlara yol açabilir (142). Bu durum, epitop tabanlı aşı geliştirmeyi karmaşık hale getirmekte; epitopların çeşitli kladlar (soylar) arasındaki korunumu değerlendirebilen ve evrensel olarak uygulanabilir adayların tanımlanmasını kolaylaştıran hesaplamalı yaklaşımları gerekli kılmaktadır (144).

In silico yöntemler, immün kaçış ve epitop korunumunu analiz etmek için de güçlü araçlar sağlamıştır. Bu analizler, başarılı bağışıklama stratejilerine önemli bir engel teşkil eden ve patojenlerin T hücresi tarafından tanınmaktan kaçınmasını sağlayan patojen genomlarındaki potansiyel mutasyonlara odaklanmaktadır (145). Örneğin, SARS-CoV-2 gibi hızlı mutasyon geçiren virüslerde epitop korunumuna ilişkin sistematik taramalar, genetik sürüklenmeye rağmen immünojenisiteyi koruyan ve aşı tasarımı için kritik olan spesifik bölgeleri tanımlamıştır (143,146,147). Bu tür çalışmalar, T hücresi yanıtlarından kaynaklanan immün baskının viral evrimi nasıl etkilediğine dair kapsamlı bir görüş oluşturmak için genellikle yüksek verimli dizileme verilerini epitop tahmin algoritmalarıyla birlikte kullanır (148,149).

Çeşitli hesaplamalı araçlardan elde edilen verilerin entegrasyonu, epitop analizi için sağlam bir çerçeveyi destekleyerek etkili aşı tasarımı beklentilerini artırır. Örneğin çalışmalar, virüslerin farklı suşları arasında korunan bölgelerden yararlanan çoklu epitop yapılarını başarıyla kullanmış ve bu da daha geniş bir varyant yelpazesine karşı iyileştirilmiş bağışıklık yanıtlarına yol açmıştır (146,147). T hücresi epitoplarını doğru bir şekilde tahmin etme ve farklı popülasyonlar arasındaki korunumlarını değerlendirme yeteneği, çağdaş aşı geliştirme çabalarında immünoinformatiğin önemini vurgulamaktadır (146,147,150).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA KAPSAMI VE ETİK İZİN

Bu tez çalışması, 2023-A3-02 - Doktora / Tıpta Uzmanlık Öğrencilerine Yönelik A Grubu Acil Ar-Ge Proje Çağrısı kapsamında 37769 nolu proje ile TÜSEB tarafından desteklenmiştir. Bu çalışmada, COVID-19 geçirmiş bireylerden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden, SARS-CoV-2 wild type ve Omicron varyantına özgü, bellek $CD4^+$ T hücrelerinin frekansı ve özgüllüğü akan hücre ölçer yöntemiyle analiz edilmiştir. Araştırmaya ait çalışmaların gerçekleştirilmesi için etik kurul izni, Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2023/424 No'lu Kurul Kararı (06.11.2023) (EK-1) ile temin edilmiştir. Çalışmaya dahil edilecek katılımcıların her birine çalışma ile ilgili bilgi verilerek Gönüllü Onam Formu (EK-2) alınmış ve hastalık ve aşılanma geçmişine yönelik bilgi edinme amacıyla Çalışma Anket Formu (EK-3) doldurulması istenmiştir.

3.2. KATILIMCILARIN BELİRLENMESİ VE ÖRNEKLEME SÜRECİ

Bu çalışmada, COVID-19 enfeksiyonunu geçirmiş ve 9 ay veya daha öncesinde Omicron varyantı ile enfekte olmuş konvalesan bireylerin katılımıyla, uzun süreli CD4+ T hücre hafıza yanıtları değerlendirilmiş ve immün fenotipleme gerçekleştirilmiştir.

Katılımcıların COVID-19 geçirmiş olduğu, SARS-CoV-2 PCR pozitiflik bilgileri e-Nabız sistemi üzerinden doğrulanarak tespit edilmiştir. Bireyler enfeksiyon ve aşılama geçmişlerine göre sınıflandırılmış ve çalışma iki alt gruba ayrılmıştır.

Başlangıçta her bir grup için 51 katılımcı, toplamda 102 katılımcı hedeflenmişken, çalışmada her grupta 47 kişiye ulaşılmış ve toplamda 94 katılımcı ile veri toplanmıştır. Araştırma, ilgili merkezde görevli sağlık çalışanlarının gönüllü katılımıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak belirlenen kriterlere uyan daha fazla sayıda katılımcıya ulaşmak mümkün olmamıştır.

3.2.1. Birinci çalışma grubu (Grup 1, Wt (+))

- 47 adet konvalesan kişiden oluşmuştur.

- Omicron öncesi varyantlar veya wild type virüs ile enfekte olmuş kişileri seçmek amacıyla, 2021 yılında veya öncesinde COVID-19 enfeksiyonu geçirmiştir. COVID-19 enfeksiyon geçmişi, SARS-CoV-2 PCR pozitif test sonucuna göre belirlenmiştir.
- En az 1 enfeksiyon geçmişinin ardından 2 veya 3 doz aşı olmuş olması gerekmektedir. Farklı aşı türlerinden aşılanmış kişiler seçilebilir.
- En son olarak, örnek toplama zamanından 9 ay veya daha öncesinde Omicron varyantı ile enfekte olmuş olmalıdır. Bu grubun 2022 yılından itibaren 1'den fazla enfeksiyon geçmişi olabilir. 2022 yılından sonra geçirilen COVID-19 enfeksiyonu Omicron varyantına aittir.

3.2.2. İkinci çalışma grubu (Grup 2, Wt (–))

- 47 adet konvalesan kişiden oluşmuştur.
- 2021 yılından önce ve 2 veya 3 doz aşı olmadan önce COVID-19 enfeksiyonu geçirmemiş olmalıdır.
- Aşılanmanın ardından, örnek toplama zamanından 9 ay veya daha öncesinde Omicron varyantı ile enfekte olmuş olmalıdır. Bu grubun 2022 yılından itibaren 1'den fazla enfeksiyon geçmişi olabilir. 2022 yılından sonra COVID-19 enfeksiyonu Omicron varyantına aittir.

Her iki grupta da 2022-2023 yılları arasında Omicron varyantı ile birden fazla kez enfeksiyon geçmişi olan kişiler çalışmaya dahil edilmiştir. 9 aydan uzun süre önce COVID-19 enfenkiyonu geçirmiş katılımcılarda mutlaka 2022'den itibaren Omicron varyantı ile enfeksiyon geçmişi olmasına dikkat edilmiştir. Wild type enfeksiyon geçmişine göre 2 gruba ayrılan çalışma grubunda katılımcıların tamamı mutlaka Omicron varyantı ile enfekte olmuş kişilerden seçilmiştir.

Bu doğrultuda, katılımcıların en son geçirdikleri enfeksiyonun üzerinden 9 ay, ortalama ise 15-18 ay gibi bir süre geçtiği saptanmıştır. Bu zaman aralığı, akut ve erken bellek evrelerinin çok ötesinde, olgunlaşmış ve stabilize olmuş 'long-term memory' (uzun süreli bellek) yanıtlarının incelenmesine olanak tanımıştır. Literatürde Omicron varyantına karşı gelişen hücresel bağışıklığın kalıcılığına dair veriler kısıtlı olduğundan,

enfeksiyon sonrası 1 yılı aşan bu takip süresi, $CD4^+$ T hücre alt gruplarının uzun dönemli kinetiğinin değerlendirmek için belirlenmiştir.

3.2.3. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Bu çalışmaya 18 yaşın üzerinde olan ve yazılı bilgilendirilmiş onam verebilen bireyler dahil edilmiştir. Katılımcıların en son COVID-19 enfeksiyonlarını en az dokuz ay önce geçirmiş olmaları gerekmektedir. Ayrıca pandemi döneminde en az iki doz COVID-19 aşısını tamamlamış olmaları çalışmanın temel gereklilikleri arasındadır. Bunun yanı sıra, COVID-19 aşılamasını takiben ve Ocak 2022 sonrasında COVID-19 enfeksiyonu geçirmiş bireyler çalışma kapsamına alınmıştır.

Yazılı onam veremeyen veya 18 yaşın altında olan kişiler çalışma dışında bırakılmıştır. Çalışma sırasında aktif enfeksiyonu bulunanlar, malignitesi olanlar, gebelik durumu bulunanlar ve immün yetmezlik öyküsü olan ya da immün baskılayıcı tedavi altında bulunan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir. Klinik durumu biyolojik örnek alınmasına uygun olmayan katılımcılar da değerlendirme dışı bırakılmıştır. Ayrıca çalışma sürecinde onamını geri çeken bireyler çalışma kapsamından çıkarılmıştır.

3.3. KAN ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Bu çalışma kapsamında, toplam 94 gönüllü katılımcıdan kan örnekleri alınmıştır. Örnek toplama süreci, Kasım 2024 – Şubat 2025 tarihleri arasında Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği'nde gerçekleştirilmiştir. Katılımcılar, SARS-CoV-2 PCR testi pozitifliği e-Nabız sistemi üzerinden doğrulanan sağlık çalışanları ve sağlık çalışanı olmayan gönüllüler arasından belirlenmiştir. Araştırma hakkında bilgilendirilen katılımcılardan Gönüllü Onam Formu alınmış ve etik kurallara uygun şekilde çalışmaya dahil edilmişlerdir.

Toplanan kan örnekleri, Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı araştırma laboratuvarında ve Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölüm Laboratuvarı'nda taze olarak işlenmiş ve soğuk zincir ihtiyacı olmadan hemen hücre izolasyonu için kullanılmıştır. Katılımcılardan alınan tam kan örnekleri, 1-1,5 saatlik transfer süresinin ardından Sağlık Bilimleri Üniversitesi İmmünoloji Ana Bilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'na ulaştırılmıştır. Burada periferik kan mononükleer hücre izolasyonu ve peptit stimülasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. Her katılımcıdan

yaklaşık 9 ml kan, lityum-heparinli tüplere alınarak aşağıda açıklanan protokol doğrultusunda PKMH izolasyonu yapılmıştır.

3.4. PERİFERİK KAN MONONÜKLEER HÜCRE İZOLASYONU

İzolasyon süreci, lityum-heparinli tüplerde toplanan 9 ml kanın 50 ml'lik Falcon tüplerine aktarılmasıyla başlamıştır. Kan örneği, 1:1 oranında PBS (Phosphate-Buffered Saline) ile dilüe edilmiş ve homojen bir süspansiyon oluşturacak şekilde karıştırılmıştır. Bu karışım, içinde 4 ml Ficoll bulunan 15 ml'lik Falcon tüplerine dikkatlice katman oluşturacak şekilde yüklenmiştir.

Tüpler, 1459 x g'de (2600 rpm) 20 dakika boyunca santrifüjlenmiştir (hızlanma ve yavaşlama ayarları: 0). Santrifüj sonrası oluşan plazma, mononükleer hücre (lenfosit) katmanı ve eritrosit katmanları arasında yer alan, lenfositten zengin beyaz katman (buffy coat) steril pastör pipeti kullanılarak dikkatlice toplanmıştır.

Toplanan hücre süspansiyonu, 15 ml'lik yeni bir tüpe alınarak 9 ml PBS ile yıkamak amacıyla 779 x g'de (1900 rpm) 5 dakika santrifüjlenmiştir (hızlanma/yavaşlama: 9). Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, pelet 5 ml PBS ile tekrar süspanse edilerek 624 x g'de (1700 rpm) ikinci bir santrifüj işlemi uygulanmıştır. Süpernatant yeniden uzaklaştırılmıştır. Hücre kaybını önlemek amacıyla fazla yıkamadan kaçınılmıştır.

İzole edilen hücrelerin çözdürülmesi için elde edilen hücre peleti üzerine standardize edilmiş zenginleştirilmiş %10'luk RPMI kültür medyumu eklenmiş ve hücreler sayım için hazırlanmıştır. Hücreler, aşağıdaki analizlerde kullanılmak üzere hemen işlenmiştir. %10'luk RPMI kültür medyumu; RPMI-1640 içerisine %10 fetal bovin serum (FBS), %1 L-Glutamin ve %1 Penicillin eklenerek hazırlanmıştır.

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

Bu çalışmada, SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) varyantına özgü Spike proteini hedef alan T hücre yanıtlarını değerlendirmek amacıyla *in vitro* T hücre stimülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 15 amino asit uzunluğunda ve 11 amino asit örtüşmeli peptit dizilerinden oluşan liyofilize peptid havuzları kullanılmıştır. Söz konusu havuzlar, Omicron'un Spike proteinindeki mutasyonları yansıtan alt varyantlara özgü T hücre yanıtlarını uyaracak şekilde özel olarak tasarlanmıştır.

Çalışmada iki ana peptid havuzu kullanılmıştır.

3.5.1. Wild Type Referans Havuzu

Wild Type Referans Havuzu olarak Miltenyi Biotec PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete (6 nmol/peptid) kullanıldı. Bu havuz, Wuhan soyuna ait Spike protein bölgelerini kapsayan peptid 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).

3.5.2. Mutasyon 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.

3.5.3. Peptid Havuzlarına Göre Deney Grubunun Belirlenmesi

Karşılaştırmalı analizlerde kontrol grupları ve peptit stimülasyonları kullanılmıştır. Bu yöntem, farklı varyantlara özgü antijen spesifik T hücre yanıtlarının kantitatif ve fonksiyonel olarak karşılaştırılmasına olanak tanımıştır.

3.5.3.1. Pozitif Kontrol: Miltenyi Biotec CytoStim™ human, T hücreleri hızlı ve güçlü biçimde aktive etmek amacıyla kullanılmıştır. CytoStim, T hücre reseptörlerine (TCR) bağlanarak antijen sunan hücrelerin MHC moleküleriyle çapraz bağlanmayı taklit eder ve böylece T hücre aktivasyonunu başlatır.

3.5.3.2. Negatif Kontrol: Stimülasyon uygulanmamış örnekler, antijen bağımsız arka plan aktivitesini değerlendirmek üzere kullanılmıştır.

3.5.3.3. Wild Type: Wuhan suşuna ait 83 adet 15-mer peptitten oluşan referans havuzu ile stimüle edilen örnekler, mutasyon havuzu ile elde edilen yanıtlarla karşılaştırılmıştır.

3.5.3.4. Mutasyon: Her biri 15 amino asit uzunluğunda 68 peptitten oluşan B.1.1.529/BA.2 mutasyon havuzu ve her biri 15 amino asit uzunluğunda 76 peptitten oluşan B.1.1.529/BA.5 mutasyon havuzu eşit oranlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

3.5.4. Stimülasyon Protokolü

Periferik kan mononükleer hücreleri izole edilip sayımı yapıldıktan sonra, her bir kuyucuğa ortalama 1×10^6 hücre / 0.15 mL %10'luk RPMI-1640 kültür medyumu içerecek şekilde, 96 oyuklu U tabanlı steril kültür plakalarına yerleştirildi. T hücrelerinin antijen-spesifik yanıtlarını değerlendirmek amacıyla hücreler aşağıdaki dört farklı koşul altında *in vitro* stimülasyona tabi tutuldu:

1. Wild Type Referans Havuzu: Wuhan suşuna ait Spike proteinini kapsayan, Miltenyi Biotec PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S Complete (6 nmol/peptid).
2. Mutasyon Havuzu: Omicron varyantına ait başlıca mutasyonları içeren, PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_S B.1.1.529/BA.2 ve BA.5 Mutation Pool (her biri 6 nmol/peptid oranında, eşit hacimlerde karıştırılmış).
3. Negatif Kontrol: Peptid eklenmemiş, stimüle edilmemiş hücreler ve yalnızca kültür medyumu eklenmiş.
4. Pozitif Kontrol: Miltenyi Biotec CytoStim™ human, T hücrelerinin antijen-bağımsız aktivasyonu için.

Tüm gruplarda stimülasyon, 1 µg/mL peptid konsantrasyonu kullanılarak 37 °C ve %5 CO_2 şartını sağlayan inkübatörde, 12 saat (overnight) süreyle gerçekleştirildi.

Bir gecelik (overnight) inkübasyon ve stimülasyon süreci tamamlanan PBMC örnekleri, immünofenotipleme analizi için Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya İleri Analiz Laboratuvarı Flow Sitometri Ünitesi'ne transfer edildi.

Hücre canlılığının (viability) transfer sürecinde korunması amacıyla üç farklı taşıma protokolü test edilerek optimizasyon çalışması yapıldı:

37°C Taşıma Koşulu: İnkübatörden çıkarılan hücreler 37°C'de tüplere aktarılmış ve transfer süresince taşıma kutusu 37°C sıcaklıkta sabit tutulmuştur.

Buz Üzerinde (0–4°C) Taşıma Ortamı: Hücrelerin buz üzerine yerleştirilerek soğuk zincir (0–4°C) koşullarında transfer edildiği koşuldur.

Oda Sıcaklığı (20-25°C) Taşıma Koşulu: Hücreler oda sıcaklığında tüplere alınmış ve strafor kutu içerisinde çevre sıcaklığında (20-25°C) transfer edilmiştir.

Yapılan karşılaştırmalı analizler sonucunda, oda sıcaklığında gerçekleştirilen transferlerin hücre canlılığını %60'ın üzerinde tutarak en iyi sonucu verdiği saptandı. Bu bulgu doğrultusunda mevcut çalışma için, tüm örneklerin transferinde oda sıcaklığı ve strafor kutu izolasyonu içeren protokol standart taşıma yöntemi olarak belirlendi.

İnkübasyon süresinin sonunda, T hücreleri üzerindeki hafıza ve aktivasyon belirteçleri flow sitometri yöntemiyle analiz edilerek, peptid havuzlarına özgü antijen-spesifik T hücre yanıtları değerlendirildi.

3.6. BELLEK $CD4^+$ T HÜCRELERİNİN BELİRLENMESİ İÇİN İMMÜNOFENOTİPLEME

Farklı bellek T hücresi alt tiplerinin fenotipik özelliklerini ortaya koymak amacıyla immünofenotipleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, izole edilen ve SARS-CoV-2 özgü peptid havuzlarıyla *in vitro* stimüle edilen periferik kan mononükleer hücreleri, flow sitometri yöntemiyle analiz edilmiştir.

Yüzey belirteçleri için kullanılan antikor paneli, CD3, CD4, CD8, CD45, CD69, CD137, CD45RA, CCR7 ve CD27 gibi T hücre fenotipini ve aktivasyon durumunu yansıtan moleküllere özgü, floresan işaretli antikorlardan oluşmuştur. Her örnek için antikorlardan 4 µL kullanılmıştır. Canlı ve ölü hücrelerin ayrımı için ise Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit ile canlılık boyaması uygulanmıştır.

İmmünofenotipleme çalışmasında kullanılan antikor panelinin detayları Tablo 3.1'te sunulmuştur.

Tablo 3.1: T hücre immün fenotipleme 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	N/A	Zombie Aqua™	BioLegend

Öncelikle, lenfosit popülasyonu hücrelerin boyut (FSC) ve granülaritesine (SSC) göre ayrımı akış sitometrisi ile tanımlandı. Ardından, canlı $CD3^+$ T hücreleri seçilerek, bu hücreler $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre alt gruplarına ayrıldı. Özellikle $CD4^+$ T hücreleri, aktivasyon ve farklılaşma belirteçlerine göre daha detaylı alt popülasyonlara bölündü. Kullanılan kapılama stratejisi ve analiz akışı ilgili şekil (Şekil 3.1) ile gösterilmiştir.

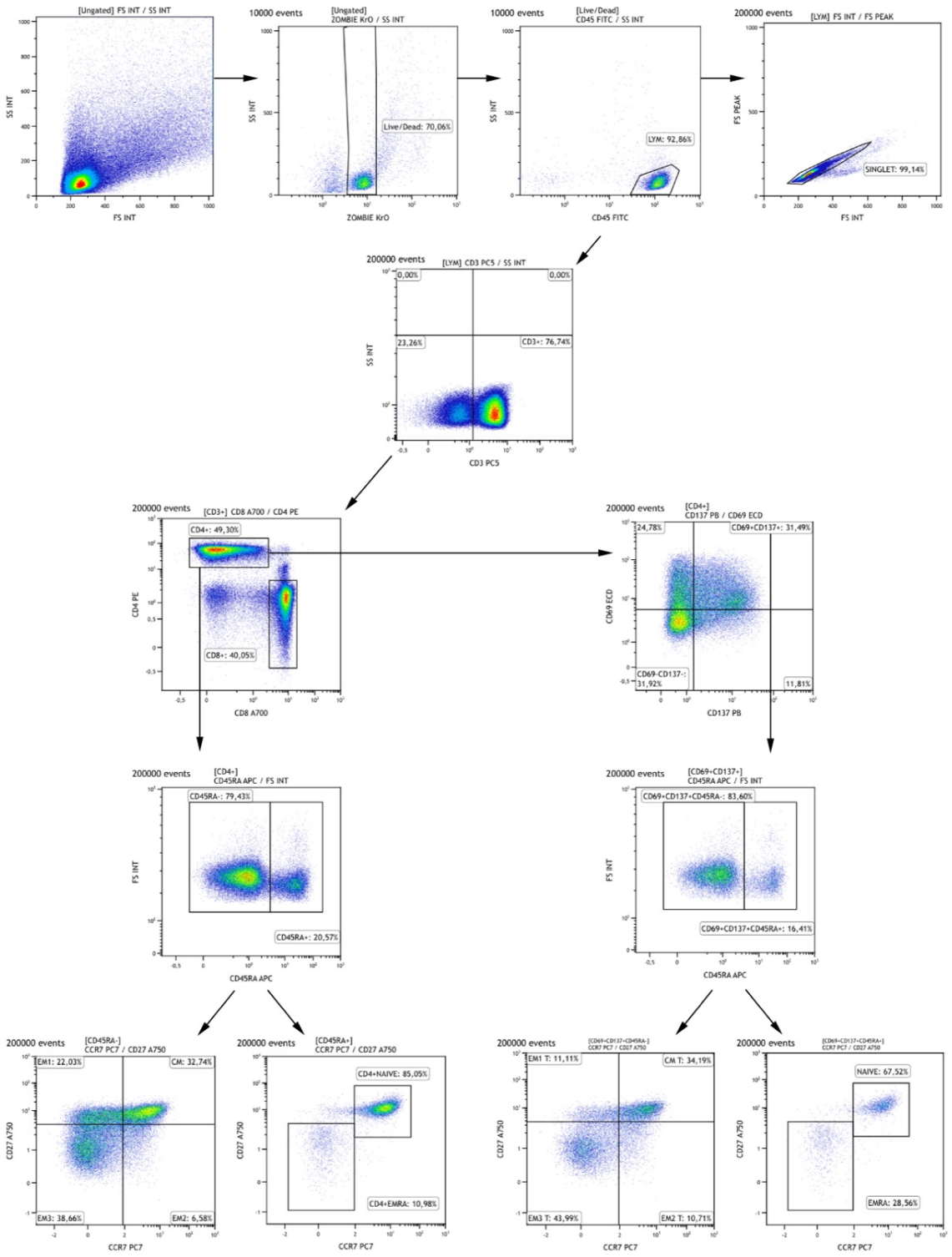
$CD4^+$ T hücre alt popülasyonları aşağıdaki fenotiplerle tanımlandı:

- Naive $CD4^+$ T hücreleri (TNAIVE): $CD45RA^+$ $CCR7^+$ $CD27^+$
- Merkezi bellek $CD4^+$ T hücreleri (TCM1): $CD45RA^-$ $CCR7^+$ $CD27^+$
- Efektör bellek $CD4^+$ T hücreleri (TEM1): $CCR7^-$ $CD27^+$ $CD45RA^-$
- Efektör bellek $CD4^+$ T hücreleri (TEM2): $CCR7^+$ $CD27^-$ $CD45RA^-$
- Efektör bellek $CD4^+$ T hücreleri (TEM3): $CCR7^-$ $CD27^-$ $CD45RA^-$

- Terminal farklılaşmış efektör bellek $CD4^+$ T hücreleri (TEMRA): $CD27^-$ $CCR7^-$ $CD45RA^+$

Ayrıca, T hücre aktivasyonunun erken belirteçleri olan CD69 ve geç aktivasyon belirteci CD137 (4-1BB) ekspresyonları da analiz edilerek, stimülasyon sonrası hücre aktivasyonu değerlendirildi.

Tüm alt popülasyonların yüzdesel dağılımları, akış sitometri cihazı ile kantitatif olarak belirlendi. Her örnek için, wild type (referans peptid havuzu ile stimüle edilen) bellek $CD4^+$ T hücre popülasyonları ile mutasyon-spesifik (Omicron varyantı) bellek $CD4^+$ T hücre popülasyonları karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Çalışmada kullanılan kimyasallar, malzemeler, cihazlar, yazılım ve algoritmalar Tablo 3.2'de listelenmiştir.



Şekil 3.1: T hücre aktivasyonu ve hafıza $CD4^+$ T hücrelerinin immün fenotiplemesine ait kapılama stratejisi

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasallar, malzemeler, cihazlar, yazılım ve algoritmaların listesi

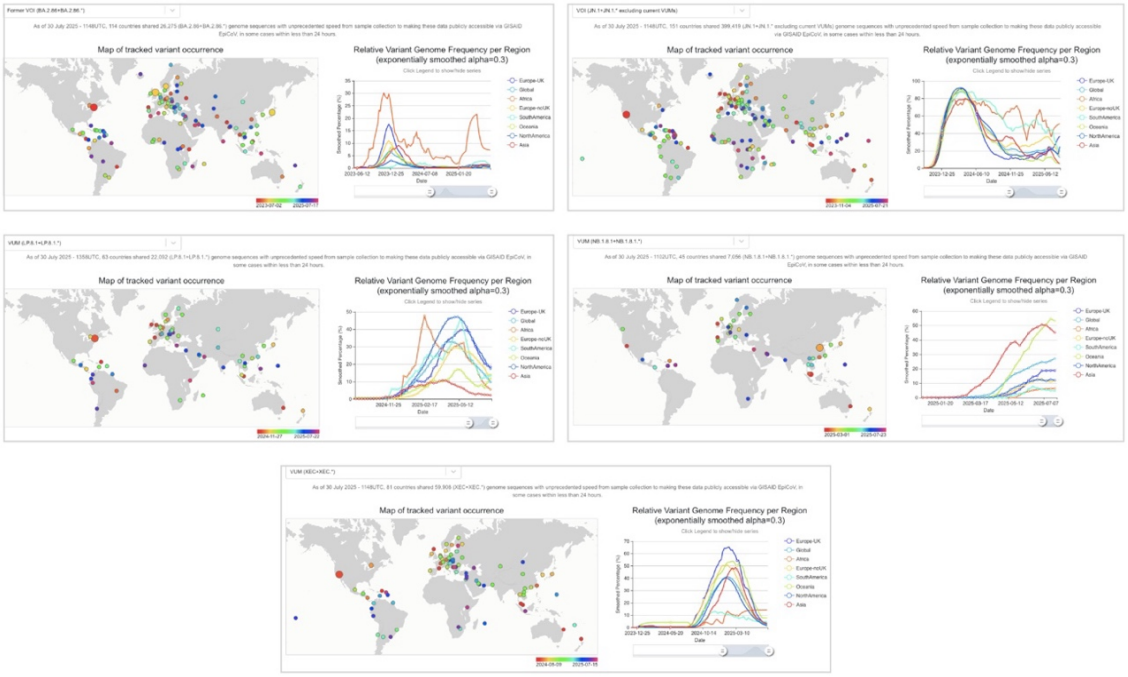
Kimyasal İsmi	**Markası**
Dulbeccos Phosphate Buffered Saline, Modified, Without Calcium Chloride and Magnesium Chloride, Sterile-Filtered	Sigma Aldrich, D8537
Ficoll® Paque Plus Cytiva, pack of 6 × 100 mL GE	Sigma Aldrich, GE17-1440-02
RPMI-1640 Medium – With Sodium Bicarbonate, Without L-Glutamine, 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 – DNA/RNA free – gamma steril (ve non-steril)	Isolab
Santrfüj tüpü – vidalı kapaklı – 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
Yazılım ve Algoritmalar	**Bağlantı**
Kaluza	https://kaluzasoftware.com
IEDB	https://www.iedb.org
GISAID	https://gisaid.org/hcov19-variants/
NetMHCIIpan EL 4.1	https://nextgen-tools.iedb.org/pipeline?tool=tc2
Google Colab	https://colab.google/
Python 3.14.0	https://www.python.org/
GraphPad Prism 8.0.2	https://www.graphpad.com
Adobe Illustrator	https://www.adobe.com
GitHub	https://github.com/mervesuzunoglu/SARS-CoV-2-Omicron-CD4-Tcell-Epitope-Analysis

3.7. ORİJİNAL ANTİJENİK SİN KAVRAMININ SARS-COV-2 $CD4^+$ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİ ARAŞTIRILMASI

Hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılarak orijinal antijenik sin kavramının SARS-CoV-2 varyantları arasında Spike proteininin $CD4^+$ T hücreleri tarafından tanınması üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmada ayrıca immünodominant CD4+ T hücre epitopları belirlenmiş ve SARS-CoV-2'nin varyantları arasında çapraz reaktivite gösteren epitoplar tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, immünodominant ve immünojenik $CD4^+$ T hücre epitoplarının popülasyonda sık görülen HLA allelleri ile ilişkisi ve HLA kısıtlamaları değerlendirilmiştir.

3.7.1. BA.2.86, JN.1, NB.1.8.1, LP.8.1 ve XEC Varyantlarının Deneysel Olarak Tanımlanmış $CD4^+$ T Hücre Epitopları Üzerindeki Etkisinin Analizi

Epitop tahminleri, referans olarak SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 izolatı için seçilen beş Omicron varyantının Spike proteini kullanılarak gerçekleştirildi. İlgili protein erişim numaraları şu şekildedir: NCBI: XTZ48487.1 (NB.1.8.1, toplanma tarihi: 30.4.2025), NCBI: XWN56510.1 (LP.8.1, toplanma tarihi: 14.5.2025), NCBI: XYC76357.1 (XEC, toplanma tarihi: 22.12.2024), NCBI: XAF39075.1 (JN.1, toplanma tarihi: 2023), NCBI: WPF43847.1 (BA.2.86, toplanma tarihi: 29.10.2023) ve Wild-type Spike glikoproteini: PDB UniProt: PODTC2. Varyantlar; yakın zamanda ortaya çıkan yeni varyantlar (LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) ve daha önce tanımlanmış Omicron varyantları (BA.2.86 ve JN.1) arasında, güncel dolaşımdaki Omicron varyantları dikkate alınarak belirlendi (Şekil 3.2). Bu sınıflandırma, GISAID Lineage Frequency ve Tracking of hCoV-19 Variants web sitesi (151) ve NextStrain (152) üzerinden elde edilen verile ile gerçekleştirildi.



Şekil 3.2: SARS-CoV-2 varyantlarının küresel dolaşımı ve bölgesel frekans değişimleri (GISAID verileri, Temmuz 2025) (151)

Sol panellerde, her bir varyantın genom dizilerinin raporlandığı ülkeler dünya haritası üzerinde işaretlenmiştir. Sağ panellerde ise, varyantların zaman içerisindeki göreli genomik frekans değişimleri farklı kıtalar bazında çizgi grafiklerle gösterilmiştir. Grafikler, üstel düzeltmeli hareketli ortalama (α=0.3) yöntemiyle pürüzsüzleştirilmiştir.

BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarına ait Spike protein dizileri, NCBI Virus Database, SARSCoV-2 Data Hub üzerinden aşağıdaki sorgu parametreleri kullanılarak elde edilmiştir: Pango soyları: NB.1.8.1/LP.8.1/XEC/JN.1/ veya BA.2.86 ayrı ayrı, Protein türü: yüzey glikoproteini (surface glycoprotein), Koleksiyon tarihi: en erken gönderimler. Her bir varyant için parametrelere uyan 40'tan fazla protein dizisi NCBI Virus Veritabanının Çoklu Hizalama (Multiple Alignment) aracı kullanılarak hizalanmış ve okuma çerçevesinde eksiklik veya boşluk (gap) içermeyen en uygun dizi seçilmiştir. Seçilen dizilere ait FASTA dosyaları her bir varyant için ayrı ayrı indirilmiştir.

Her varyanta özgü karakteristik Spike mutasyonları, GISAID referans suşu hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124) ile karşılaştırılarak GISAID CoVsurver

aracındaki Mutation Analysis of hCoV-19 variants analizi ve Outbreak.info (153) verileri kullanılarak tespit edilmiştir.

BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının Wild-type T hücre epitopları üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, deneysel olarak belirlenmiş CD4+ T hücre epitopları IEDB veritabanından (154,155) aşağıdaki sorgu kriterleri kullanılarak elde edilmiştir: Organizma: SARS-CoV-2 (ID: 2697049, SARS-CoV-2), Antijen: Spike glikoproteini (UniProt: PODTC2), yalnızca pozitif test sonuçları dahil, B hücreleri hariç, MHC testleri hariç, Konak: Homo sapiens (insan), MHC sınırlaması: Sınıf II (Class II) ve epitop uzunluğu kriteri: Sınıf II için 13–25 amino asit uzunluğunda epitoplar. Bu sorgu sonucunda Spike glikoproteine ait deneysel olarak tanımlanmış 541 adet Sınıf II epitopu elde edilmiştir. Elde edilen epitoplar, IEDB analiz kaynakları içerisinde yer alan ImmunomeBrowser aracı kullanılarak, hedef proteinin tam uzunluğu boyunca hizalanarak 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 287, LP.8.1 için 271, XEC için 286, JN.1 için 308 ve BA.2.86 için 294 adet örtüşen epitop belirlenmiştir.

SARS-CoV-2 T hücre epitoplarının ve ilgili varyantlardan türetilmiş peptitlerin öngörülen HLA Sınıf II allellerine bağlanma kapasiteleri, IEDB analiz platformu üzerinde uygulanmış olan NetMHCIIpan EL 4.1 aracı kullanılarak tahmin edilmiştir (156). NetMHCIIpan EL-4.1 aracı, bilinen dizilimlere sahip herhangi bir MHC II molekülüne peptit bağlanmasını Yapay Sinir Ağları (ANNs) kullanarak tahmin etmektedir. Sistem, Bağlanma Afinitesi (BA) ve Elute Edilmiş Ligand kütle spektrometrisi (EL) ölçümlerinden oluşan 500.000'in üzerinde veriyi içeren kapsamlı bir veri seti ile eğitilmiş bir araçtır. Bu veri seti, üç insan MHC sınıf II izotipi olan HLA-DR, HLA-DQ ve HLA-DP moleküllerini kapsamaktadır. Bu tahminler, IEDB tarafından sağlanan ve dünya genelinde en sık görülen ve temsil niteliği yüksek olan 27 HLA Sınıf II allelinden oluşan referans allel seti temel alınarak gerçekleştirilmiştir. İlgili referans setin, HLA sınıf II DP, DQ ve DR lokuslarını kapsayarak %99'dan fazla küresel popülasyon temsili sağladığı kabul edilmektedir.

3.7.1.1. Seçilen HLA Sınıf II allel listesi: HLA-DRB101:01, HLA-DRB103:01, HLA-DRB104:01, HLA-DRB104:05, HLA-DRB107:01, HLADRB108:02, HLA-DRB109:01, HLA-DRB111:01, HLA-DRB112:01, HLA-DRB113:02,

HLADRB115:01, HLA-DRB302:02, HLA-DRB401:01, HLA-DRB501:01, HLA-DQA105:01/DQB102:01, HLA-DQA105:01/DQB103:01, HLA-DQA103:01/DQB103:02, HLA-DQA101:01/DQB105:01, HLADQA101:02/DQB106:02, HLA-DPA102:01/DPB101:01, HLA-DPA101:03/DPB102:01, HLADPA103:01/DPB104:02, HLA-DPA102:01/DPB105:01, HLA-DPA101:03/DPB104:01, HLADPA102: 01/DPB114:01, HLA-DQA101:03/DQB104:02, HLA-DQA103:01/DQB104:01.

Sınıf II analizleri için yapılan bağlanma tahminleri yüzde (percentile) skoru cinsinden ifade edilmiştir. Analizlerde, 15 amino asit uzunluğundaki Sınıf II peptit dizileri, bağlayıcı olarak kabul edilebilmesi için karşılık geldiği allele ait yüzde skoru ≤10, ≤5, ≤2 ve ≤1 olacak şekilde filtrelenmiş ve böylece yalnızca güçlü bağlayıcılar değerlendirmeye alınmıştır. Her bir epitop–varyant çifti için bağlanma afinitesindeki değişimi göstermek amacıyla bir kat değişim (fold-change, FC) değeri hesaplanmıştır

3.8. NİCEL ANALİZ VE KARŞILAŞTIRMALAR

SARS-CoV-2 Spike proteini üzerindeki $CD4^+$ T hücre epitoplarının varyantlar arası dağılımı ve mutasyon etkileri, kapsamlı Python (sürüm 3.14.0) tabanlı bir pipeline kullanılarak incelendi (EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 1). İlk olarak, Omicron alt varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) ve Wild type için haritalanmış epitop kümeleri karşılaştırıldı. Epitop örtüşmeleri UpSet grafikleri ve heatmap ile görselleştirilerek varyantlar arası paylaşılan ve özgül epitop setleri sistematik biçimde değerlendirildi. Heatmap, her varyant çifti arasındaki ortak epitop sayılarını nicel olarak ortaya koydu.

SARS-CoV-2 Omicron varyantlarına özgü tanımlayıcı mutasyonların, Wild-type Spike proteini üzerinde tanımlanmış epitoplar üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla, epitop dizileri ve bunların başlangıç–bitiş konumlarını içeren veri setleri ile her varyanta ait mutasyon listeleri Python ortamında analiz edildi. Kod içerisinde tanımlanan bir fonksiyon aracılığıyla mutasyonların tipine göre aminoasit konumları belirlendi; substitüsyonlarda tek pozisyon, delesyonlarda ilgili aralık, insersiyonlarda ise ekleme konumu dikkate alındı. Bu şekilde her varyant için tüm mutasyonların Spike proteini üzerindeki kesin konumları elde edildi ve bu konumlar epitop aralıklarıyla sistematik olarak karşılaştırıldı. Mutasyonla örtüşen epitoplar “mutasyona uğramış”, mutasyon içermeyenler ise “korunmuş” olarak sınıflandırıldı. Bu sınıflandırma sonucunda her

varyant için mutasyona uğrayan ve korunmuş epitopların sayıları belirlendi ve toplam epitop sayısına oranlanarak yüzdesel dağılımlar elde edildi. Sonuçlar bar grafikleri ile görselleştirildi. Ayrıca, spesifik mutasyonların hangi epitoplarla çakıştığını göstermek için heatmap oluşturuldu. Bu görselleştirmede mutasyon–epitop ilişkileri varyant bazında sunularak epitop kaybı ve korunumu detaylı şekilde ortaya kondu. Böylece hem genel mutasyon etkisi hem de epitop düzeyindeki dağılım bütüncül olarak değerlendirildi. Analizin ileri aşamasında, wild-type epitop setinden elde edilen sınıflandırma varyantlara özgü deneysel epitop listeleri ile karşılaştırıldı. Mutasyona uğramış olmasına rağmen deneysel verilerde hâlâ varlığını sürdüren epitoplar belirlendi, varyant bazında kaydedildi. Elde edilen bulguların görselleştirilmesi için matplotlib kullanılarak pozisyonel haritalama yapıldı. Bu aşamada her epitop, Spike proteini üzerindeki başlangıç ve bitiş konumlarına karşılık gelen yatay çubuklarla gösterildi. Epitoplar üç kategoriye göre renklendirildi: mutasyona uğramamış ve deneysel verilerde doğrulanan epitoplar "korunmuş" (yeşil), mutasyona uğramış ancak deneysel olarak hâlâ mevcut epitoplar "mutasyona uğramış ancak mevcut" (sarı), mutasyona uğramış ve deneysel verilerde bulunmayan epitoplar ise "kaybolmuş" (kırmızı) olarak işaretlendi. Ayrıca Spike proteinin reseptör bağlanma bölgesi (RBD; 319–541. aminoasitler) grafik üzerinde bir arka plan şeridi ile vurgulandı. Bu sayede RBD içinde yer alan epitopların özel olarak izlenmesi sağlandı. Grafiklerde varyantlar y-ekseni boyunca sıralanmış, epitop konumları ise x-ekseni üzerinde temsil edildi. Tüm analizler pandas, seaborn, matplotlib ve upsetplot kütüphaneleri kullanılarak gerçekleştirildi. Böylece, epitop paylaşımı, korunumu ve mutasyon ilişkilerinin hem nicel hem de görsel olarak değerlendirilmesine olanak sağlayarak SARS-CoV-2 Spike proteini üzerindeki $CD4^+$ T hücre epitoplarının sistematik karakterizasyonu gerçekleştirildi.

Wild-type Spike proteini ile her bir varyant arasındaki peptit–HLA alleli bağlanma gücündeki değişimi karşılaştırmak amacıyla, aynı peptit ve allel çiftleri eşleştirilmiş; bu eşleşen çiftler için netmhciipan_el yüzde (percentile) değerleri karşılaştırılarak her bir çift için kat değişim (fold-change) hesaplanmıştır (EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 2). Aynı peptit–allel çiftinin hem wild type hem de varyant dizilerinde bulunup bulunmadığı ve güçlü bağlayıcı epitopların varyantlar arasında yüzde skorlarına göre nasıl farklılaştığını belirlemek amacıyla, formül her bir varyant ve wild-type spike için Python scripti ile hesaplanmıştır.

Bu çalışma kapsamında, SARS-CoV-2 spike proteini kaynaklı MHC sınıf II bağlayıcı peptidlerin çeşitli varyantlardaki korunmuşluk durumu ve varyant-belirleyici mutasyonlarla etkileşimleri sistematik olarak analiz edildi (EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 3). Analizler, NetMHCIIpan EL 4.1 yazılımı ile daha önce hesaplanmış güçlü bağlayıcı peptid-HLA çiftleri üzerinden gerçekleştirildi. Güçlü bağlayıcı peptid-HLA çiftleri, %10 veya daha düşük bağlanma yüzde skoruna sahip peptidler olarak tanımlandı. İlk aşamada, farklı SARS-CoV-2 varyantları ve wild type (ancestral) dizisine ait peptid-HLA çiftleri yüklendi ve yalnızca güçlü bağlayıcılar (≤%10) seçildi. Daha sonra, tüm varyantlarda ve wild-type dizide korunan peptid-HLA çiftleri belirlendi ve bu korunmuş peptidler, tüm varyantlarda bağlanma potansiyelini kaybetmemiş epitoplar olarak tanımlandı. Bu korunmuşluk analizi, varyantların T hücre epitoplarını ne ölçüde değiştirdiğini değerlendirmek için temel bir referans oluşturdu. İkinci aşamada, her bir varyantın tanımlayıcı mutasyonları ile peptid-HLA çiftlerinin örtüşme durumu değerlendirildi. Bu amaçla, her peptidin başlangıç ve bitiş pozisyonları dikkate alınarak varyant mutasyonlarının peptid dizisi ile örtüşüp örtüşmediği hesaplandı. Pozisyon örtüşmesi tespit edilen peptidler, "Mutation Overlap" olarak işaretlendi. Bu adım, varyant-belirleyici mutasyonların T hücre tanıma potansiyelini azaltabilecek epitopları belirlemek için gerçekleştirildi. Son aşamada, her varyant için mutasyonla etkilenen ve etkilenmeyen peptidlerin oranlarını görselleştirmek amacıyla pasta grafikleri oluşturuldu. Bu görselleştirme, varyantların güçlü bağlayıcı epitoplar üzerindeki potansiyel etkisinin görsel olarak anlaşılmasını sağlamak amacıyla gerçekleştirildi. Pasta grafiklerinde etkilenen ve etkilenmeyen peptid-HLA çiftlerinin sayıları ve yüzdelikleri belirtildi. Son olarak, tüm varyantlarda mutasyon çakışmasını kapsamlı şekilde göstermek için bir heatmap oluşturuldu. Bu aşamada, her varyanttaki peptit–HLA çiftleri bir araya getirildi ve herhangi bir varyantta en az bir mutasyonla etkilenen çiftler True olarak işaretlendi. Hiçbir mutasyonla etkilenmeyen peptit–HLA çiftleri çıkarıldı. Oluşturulan ikili matris (1 = mutasyon çakışması, 0 = çakışma yok) kırmızı–gri renk şeması ile görselleştirildi ve güçlü bağlanan epitoplarin varyantlara özgü mutasyon etkileri net bir şekilde gösterildi. Bu pipeline, epitope korunumu, mutasyon duyarlılığı ve varyantlar arasındaki karşılaştırmayı sistematik bir şekilde değerlendirerek T hücresi epitoplarının korunumu ve immün kaçış potansiyeli üzerine ileri analizleri içerir ve aşağıda paylaşılmıştır.

Bu analizde, SARS-CoV-2 Spike proteini üzerinden $CD4^+$ T hücre epitoplarının HLA sınıf II allelleri ile oluşturduğu bağlanma çiftlerinin korunma ve kayıp durumları incelendi. Bunun için Python tabanlı bir analiz pipeline'ı geliştirildi (EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 4). Pipeline'da varyantlara özgü epitope–HLA çiftleri içeren dosyalar yüklendi, birleştirildi ve kayıplar ile korunmaların belirlenmesi amacıyla karşılaştırmalar yapıldı. İlk olarak, varyantlara özgü kayıpların niceliksel dağılımı çıkarıldı. Bu kapsamda, wild-type Spike proteininden türetilen epitop–HLA çiftleri ile her bir varyantın dosyaları karşılaştırıldı ve her varyant için kaybedilen çiftlerin sayısı hesaplandı. Elde edilen veriler, varyant başına kayıp sayılarını gösteren çubuk grafikler ile görselleştirildi. İkinci olarak, JN.1 ve BA.2.86 varyantlarında korunmuş fakat daha yeni varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) kaybolmuş epitope–HLA çiftleri tespit edildi. Bu çiftler için, varyantlara göre korunma veya kayıp durumunu gösteren ikili matrisler oluşturuldu ve sonuçlar heatmap ile görselleştirildi. Alternatif bir analiz ile, JN.1 ve BA.2.86 varyantlarında birlikte korunan epitopların daha sonraki varyantlarda kaybolma durumu ayrıca incelendi. Üçüncü aşamada, kaybolan epitopların Spike proteini üzerindeki konumları JN.1 referans sekansı kullanılarak haritalandı. Bu işlemde, her epitopun başlangıç ve bitiş pozisyonları belirlendi ve elde edilen koordinatlar tablo halinde kaydedildi. Aynı zamanda, epitopların Spike proteini boyunca dağılımı grafiksel olarak sunuldu. Analizin son aşamasında, kaybolan epitoplar Spike proteininin bilinen yapısal ve fonksiyonel bölgelerine eşleştirildi. Bunun için, sinyal peptidi, N-terminal domain (NTD), reseptör bağlanma domaini (RBD), reseptör bağlanma motif (RBM), furin bölgesi, S2 bölgesi, transmembran (TM) ve sitoplazmik kuyruk (CT) bölgeleri tanımlandı. Epitopların bu bölgelerle olan örtüşmeleri belirlendi ve her domain için kaç epitope denk geldiği özetlenerek grafiklerle gösterildi. Bu pipeline aracılığıyla, SARS-CoV-2 varyantları arasında epitope–HLA çiftlerinin kayıp ve korunma dinamikleri sistematik olarak değerlendirildi.

Çalışmanın bu aşamasında, SARS-CoV-2 varyantlarının MHC sınıf II moleküllerinde sunulan CD4 T hücre epitoplarının korunma düzeylerini değerlendirmek amacıyla Python tabanlı bir analiz pipeline'ı oluşturuldu (EK-4.Hesaplamalı Biyoloji Analiz Kodları, Kod 5). Analizlerde NetMHCIIpan tahmin algoritması ile elde edilmiş epitop–HLA bağlanma verileri kullanıldı ve farklı varyantlardan türetilen veriler, standartlaştırılmış formatlarda programa dahil edildi. Her varyanta ait dosyalar yüklenerek epitop dizileri ve bunlara karşılık gelen HLA allelleri elde edildi, temizlendi

ve ikili eşleşmeler halinde kaydedildi. Yüzde (percentile) skoru cinsinden ifade edilen epitop-HLA allel bağlanma gücü için değer ≤%10 olarak filtrelendi ve böylece güçlü bağlayıcılar analiz edildi. İlk aşamada, güçlü bağlan ≤10 eşik değeri uygulanarak tüm varyantlar arasında ortak olan epitop–HLA çiftleri belirlendi. Bu işlem sonucunda, tüm varyantlar arasında korunan epitop–HLA çiftleri saptandı. Korunan çiftlerin her bir HLA alleline göre dağılımları hesaplandı. Benzer şekilde, HLA lokus düzeyinde (DP, DQ, DR) korunan epitop sayıları görselleştirildi. İkinci aşamada, korunan epitopların bağlanma gücünü değerlendirmek için NetMHCIIpan yüzdelik skorlarına dayalı en güçlü bağlanan çiflerin analizini gerçekleştirmek üzere eşik değerleri uygulandı. Bu kapsamda, sırasıyla ≤5, ≤2 ve ≤1 yüzdelik eşikleri kullanılarak varyantlara ait epitop–HLA eşleşmeleri filtrelendi. Her eşik için varyantlar arasında ortak olan epitop–HLA çiftleri yeniden belirlendi ve sonuçlar karşılaştırıldı. En güçlü bağlayıcılar için ≤1 yüzdelik değeri dilimine giren ve tüm varyantlar arasında korunan çiftlerin varyant bazlı dağılımları heatmap ile görselleştirildi. Bunun yanında, per-allel ve per-lokus düzeyinde korunan epitop sayıları için grafikler oluşturuldu. Böylece, farklı bağlanma güçlerine göre epitopların korunma düzeyi ayrıntılı biçimde analiz edildi. Bu pipeline aracılığıyla SARS-CoV-2 varyantları arasında $CD4^+$ T hücre epitoplarının korunma düzeyleri farklı bağlanma gücü eşikleri altında değerlendirildi.

3.9. KOD ERİŞİLEBİLİRLİĞİ VE ANALİTİK TEKRARLANABİLİRLİK

Hesaplamalı biyoloji analizleri için geliştirilen Python pipeline'ı, 'Test-Driven Development' (Test Odaklı Geliştirme) prensiplerine uygun olarak, bilinen referans diziler üzerinden manuel kontrollerle valide edilmiştir. Kodun doğruluğu; (1) Spike proteinindeki mutasyon konumlarının protein koordinatlarıyla %100 uyumu, (2) IEDB'den alınan deneysel epitop listeleriyle yazılımsal tahminlerin çapraz karşılaştırılması ve (3) sonuçların UpSet ve Heatmap gibi birden fazla görselleştirme yöntemiyle tutarlılığının teyit edilmesi aracılığıyla sağlanmıştır.

Ayrıca, analizlerin tekrarlanabilirliğini (reproducibility) garanti altına almak amacıyla, kullanılan tüm kütüphane versiyonları sabitlendi ve geliştirilen analiz hattı uçtan uca otomatize edildi. Bu sayede, aynı veri seti ve parametrelerle gerçekleştirilecek tekrarlı analizlerde özdeş sonuçların alınması güvence altına alındı. Şeffaflık ve açık bilim ilkeleri doğrultusunda, bu çalışmada gerçekleştirilen hesaplamalı analiz iş akışının şeffaflığını sağlamak ve bilimsel araştırmaların tekrarlanabilirliğini (reproducibility)

desteklemek amacıyla, geliştirilen tüm hesaplama süreçleri, veri işleme hatları ve tüm Python kodları, bağımsız araştırmacıların denetimine ve kullanımına sunulmak üzere GitHub platformu üzerinde açık kaynaklı bir depo (repository) olarak paylaşıldı (https://github.com/mervesuzunoglu/SARS-CoV-2-Omicron-CD4-Tcell-Epitope-Analysis). Bu süreçle, metodoloji bölümünde hedeflenen 'varyantlar arası korunmuşluk analizi'nin yazılımsal olarak hatasız, standartlara uygun ve doğrulanabilir bir şekilde gerçekleştirildiği gösterildi.

SARS-CoV-2 Omicron alt varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) CD4+ T hücresi epitopları üzerindeki etkilerini analiz etmek için hazırlanan Python tabanlı beş ana boru hattı (pipeline), bu çalışmada kullanıldı. Söz konusu analiz kodları, veri setleri ve görselleştirme araçları GitHub platformu üzerinden açık ve ulaşılabilir bir hale getirildi. Araştırmada kullanılan özgün yazılım dosyalarına ve analiz parametrelerine Tablo 3.2'de paylaşılan GitHub bağlantısı aracılığıyla erişilebilir. Repository içeriği ise Tablo 3.3'te paylaşıldı.

Tablo 3.3: GitHub (mervesuzunoglu) üzerinden erişime sunulan hesaplamalı analiz iş akışının modüler yapısı ve dosya içerikleri.

Dosya Adı (Script Name)	**Analiz Kapsamı (Analysis Scope)**
01_comparative_epitope_mapping.py	Varyant bazlı mutasyonların epitop haritalaması üzerindeki etkisi
02_binding_affinity_fold_change.py	HLA-II bağlanma afinitelerindeki kantitatif değişimlerin (fold-change) hesaplanması
03_peptide_HLA_pairs_overlap_visualization.py	Varyantlar arası epitop örtüşmelerinin görselleştirilmesi
04_spike_domain_epitope_loss.py	Spike proteini domainleri üzerindeki epitop kayıplarının konumsal haritalandırılması
05_conserved_immunome_analysis.py	Tüm varyantlarda korunan evrensel epitopların ve HLA lokus dağılımlarının analizi

Paylaşılan hesaplamalı analiz süreci şu aşamaları içermektedir:

1. Varyant bazlı mutasyonların epitop haritalaması üzerindeki etkilerinin belirlenmesi.
2. NetMHCIIpan 4.1 algoritması kullanılarak HLA-II bağlanma afinitelerindeki kantitatif değişimlerin (fold-change) hesaplanması.

3. Varyantlar arası epitop örtüşmelerinin ve korunmuş immünolojik bölgelerin (conserved core immunome) istatistiksel ve görsel analizi.
4. Spike proteini üzerindeki domain bazlı (RBD, NTD vb.) epitop kayıplarının konumsal haritalandırılması.
5. Farklı bağlanma eşik değerlerine göre filtrelenmiş evrensel korunmuş epitopların belirlenmesi ve bunların HLA allel/lokus bazlı dağılımlarının analiz edilerek stabil immünolojik hedeflerin tanımlanması.

Bu yaklaşım, çalışmanın verilerinin farklı araştırmacılar tarafından denetlenebilmesine ve metodolojinin benzer viral evrim çalışmalarında yeniden uygulanabilmesine olanak tanımaktadır.

3.10. İSTATİSTİK ANALİZ

Çalışmanın örneklem büyüklüğü, G*Power (v3.1.9.7) yazılımı kullanılarak çalışma öncesinde analiz edildi. Bağımsız iki grup arasında ortalama fark analizi (t-test) planlandı; etki büyüklüğü d=0.6, anlamlılık düzeyi α=0.05 ve istatistiksel güç $1-\beta$=0.85 olarak hedeflendi. Bu parametreler doğrultusunda yapılan *a* priori analiz sonucunda, her bir grup için 51, toplamda ise 102 katılımcının çalışmaya dahil edilmesi gerektiği saptandı. Çalışma sürecinde, belirlenen dahil edilme kriterlerine uygunluk ve gönüllü katılım oranındaki kısıtlılıklar nedeniyle her iki grupta 47'şer katılımcıya (Toplam N=94) ulaşılabildi. Mevcut örneklem sayısı ($n1$=47, $n2$=47) ve başlangıçtaki etki büyüklüğü (d=0.6) üzerinden gerçekleştirilen post-hoc güç analizi sonucunda, çalışmanın ulaştığı nihai istatistiksel güç yaklaşık %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} 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 kullanılmıştır. Bağımsız gruplar (Wt(+) ve Wt(−)) arasında WT-stimülasyonlu ve Omicron-stimülasyonlu yanıtların karşılaştırılması için Wilcoxon matched-pairs signed rank testi kullanıldı. Spearman korelasyon testi,

parametreler arası korelasyonu ölçmek için uygulandı. İki bağımsız grubun eşleşmeyen verilerinin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMA GRUPLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

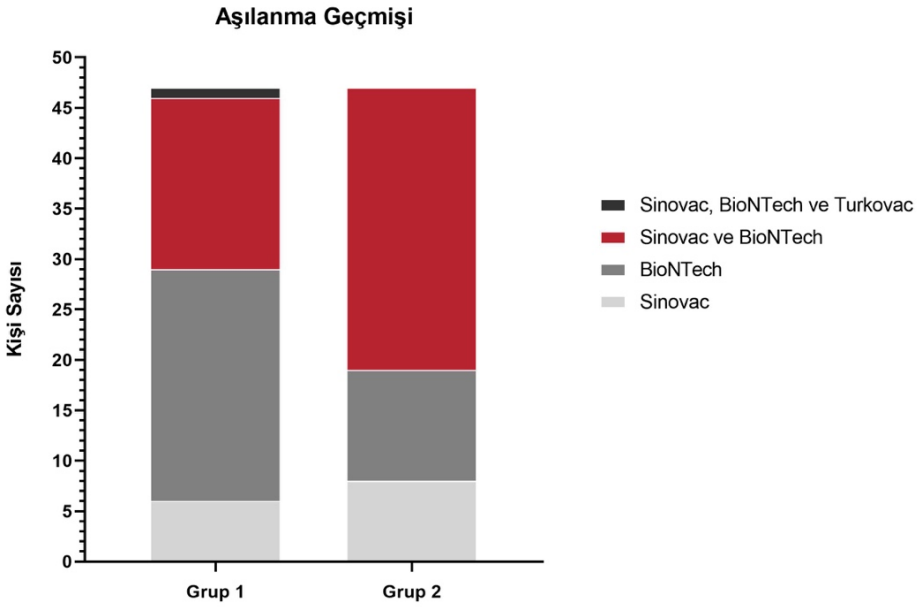
Wild type enfeksiyon geçmişine göre 2 gruba ayrılan çalışma grubunda, katılımcıların tamamı mutlaka Omicron varyantı ile enfekte olmuş kişilerden seçilerek çalışma tamamlanmıştır. Wild type enfeksiyon geçmişi olan kişiler Grup 1, Wt (+) olarak adlandırılırken wild type enfeksiyon geçmişi olmayan kişiler ise Grup 2, Wt (–) olarak isimlendirilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1: Çalışma grubuna dahil edilen katılımcıların 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 (%36,2)	36 (%38,3)	0,636[b]
Erkek (n, %)	13 (%13.8)	11 (%11.7)	
Aşılanma Geçmişi			
Sinovac (n, %)	6 (%6,4)	8 (%8,5)	0,028[c]
BioNTech (n, %)	23 (%24,5)	11 (%11,7)	
Sinovac ve BioNTech (n, %)	17 (%18,1)	28 (%29,8)	
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 (%3,2)	3 (%3,2)	1,000[c]
Son 9 ay içerisinde (n, %)	1 (%1,1)	0	
9 aydan daha uzun süre önce (n, %)	43 (%45,7)	44 (%46,8)	

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



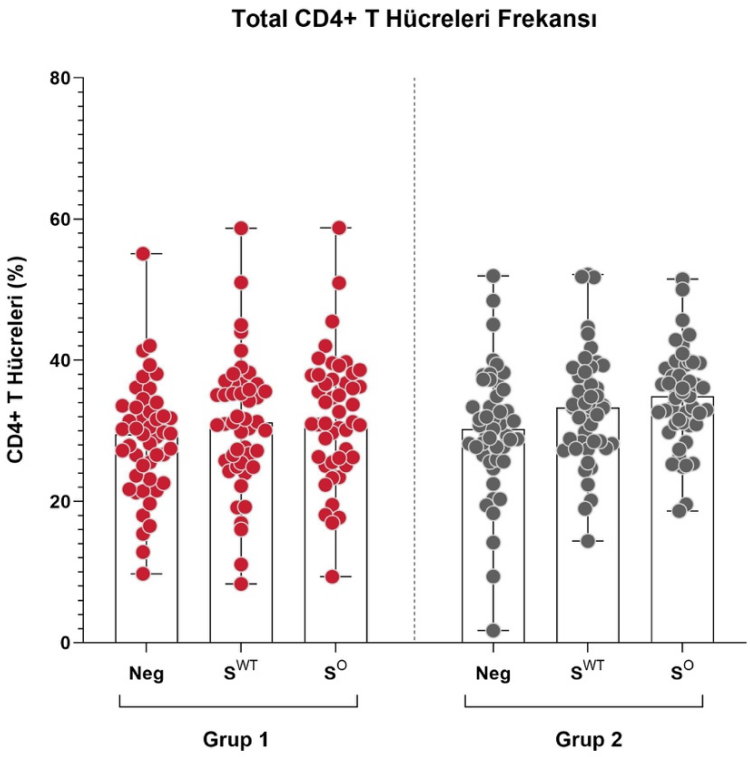
Şekil 4.1: Katılımcıların aşılanma geçmişlerinin gruplara göre dağılımı

4.2. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE SPİKE-SPESİFİK CD4$^+$ T HÜCRE POPÜLASYONLARININ ÖLÇÜLMESİ

Akan hücre ölçer ile gerçekleştirilen analizlerde, SARS-CoV-2 peptid havuzları ile stimüle edilen CD4$^+$ T hücrelerinin aktivasyon düzeyleri ve hafıza alt tiplerine ait yüzdesel dağılımlar başarılı bir şekilde değerlendirildi. Hem wild type hem de mutasyon taşıyan (Omicron varyantı) peptit havuzlarıyla yapılan stimülasyon sonrasında, bellek CD4$^+$ T hücre alt popülasyonlarında farklı yanıt profilleri gözlemlendi. Aktivasyon belirteçleri CD69 ve CD137'nin ekspresyonu, antijen-spesifik T hücre yanıtlarının tespit

edilmesine olanak sağladı. Bu veriler, uzun süreli T hücre hafızasının SARS-CoV-2 varyantlarına bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir.

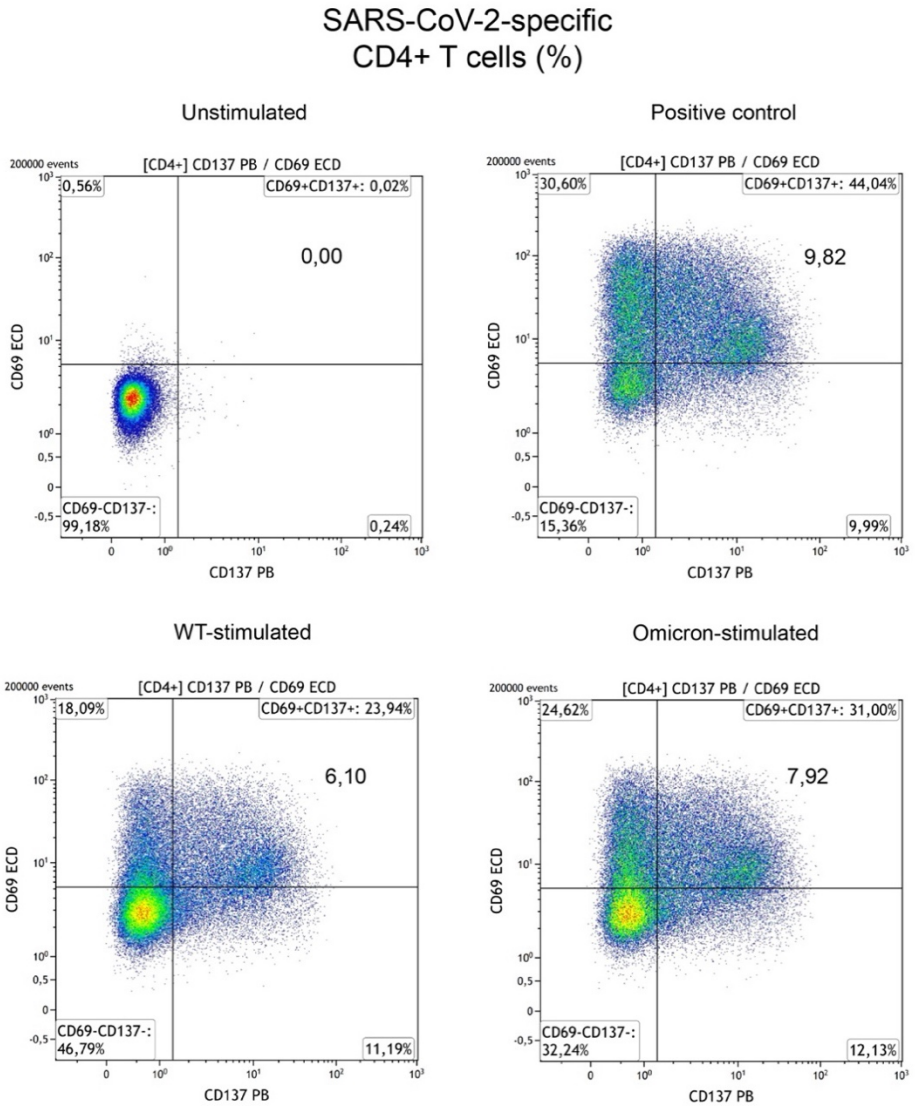
Çalışmaya dahil edilen tüm katılımcılar COVID-19 geçirmiş konvalesan bireylerden oluşmakta ve dahil edilme anında sağlıklı bireyler olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, total $CD4^+$ T hücre frekansları, wild type enfeksiyon öyküsü bulunan [Wt(+)] ve bulunmayan [Wt(–)] gruplar arasında benzerlik göstermiştir. Üç farklı stimülasyon koşulu incelendiğinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Total $CD4^+$ T hücre yüzdesi, antijen-spesifik yanıtları değil, genel $CD4^+$ T hücre dağılımını yansıtmaktadır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde toplam $CD4^+$ T hücre frekanslarının karşılaştırılması

Şekilde, stimülasyon uygulanmamış kontrol (Neg), SARS-CoV-2 orijinal spike proteinine ait peptid havuzu (S^{WT}) veya Omicron varyantına ait spike peptid havuzu (S^{O}) ile 12 saat inkübe edilmiş örnekler her bir grup için gösterilmiştir. İnkübasyon sonrası gerçekleştirilen akan hücre ölçer ile toplam $CD4^+$ T hücre frekans yüzdeleri analiz edilmiştir. Kutu grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiş olup,

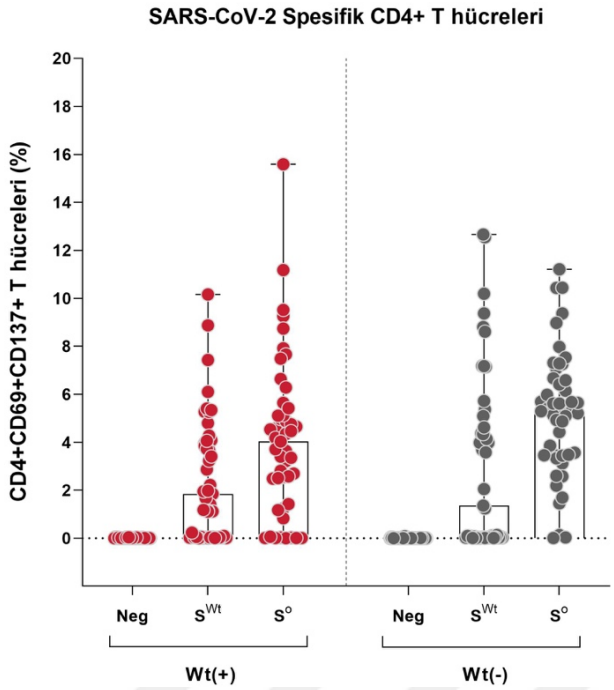
her bir nokta bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) grupları arasında stimülasyonlara bağlı olarak $CD4^+$ T hücre frekanslarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Wilcoxon matched-pairs signed rank testi, $p > 0,05$).



Şekil 4.3: SARS-CoV-2-spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin stimüle edilmemiş örnekte, pozitif kontrolde, wilde-type havuzu (S^{WT}) ve omicron havuzu (S^{O}) ile stimüle edilmiş örneklerdeki hücre popülasyonları

$CD69^+CD137^+$ hücre popülasyonu aktive olmuş $CD4^+$ T hücrelerini göstermektedir. Stimüle edilmemiş (unstimulated) hücre popülasyonu ile

karşılaştırıldığında S^{WT} (WT-stimulated) ve S^{O} (Omicron-stimulated) örneklerdeki hücre popülasyonu total % oranları grafikler üzerinde belirtilmiştir (Şekil 4.4).

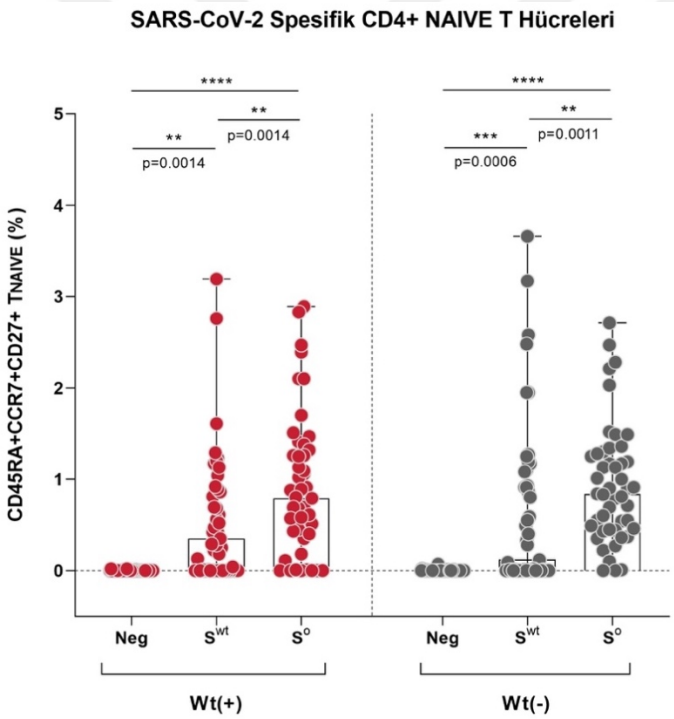


Şekil 4.4: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında $CD4^{+}CD69^{+}CD137^{+}$ T hücre frekansları

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 $CD4^{+}$ T hücre frekansları, antijen-spesifik yanıtları göstermektedir (Şekil 4.4). Her iki grupta da negatif kontrolde frekans %0'a yakınken, S^{WT} ve S^{O} stimülasyonları ile antijen-spesifik aktivasyon belirginleşmiştir. Peptit havuzu ile yapılan stimülasyonlar, negatif kontrolle karşılaştırıldığında antijen-spesifik $CD4^{+}$ T hücrelerinin aktivasyonunu tetiklemiştir. Kutu grafiği medyan ve çeyrekler arası aralığı (IQR) göstermektedir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) grupları arasında antijen-spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Akan hücre ölçer analizleri ile peptid havuzlarıyla stimülasyon sonrası $CD4^{+}$ T hücrelerinin SARS-CoV-2 spesifik NAIVE ($CD45RA^{+}CCR7^{+}CD27^{+}$) hücre

popülasyonuna ait yüzdesel aktivasyon frekansları belirlenmiştir (Şekil 4.5). $CD4^+$ T hücrelerinin bu NAIVE alt popülasyonu içerisinde, farklı antijen stimülasyonlarına (Neg, S^{WT}, S^{O}) yanıt olarak aktivasyon belirteçleri $CD69^+CD137^+$ ekspresyonu gösteren hücrelerin frekansı Şekil 4.5'te sunulmuştur. Negatif kontrol gruplarında, her iki çalışma grubu için de NAIVE $CD4^+$ T hücrelerinde aktivasyon sinyali oldukça düşüktür ve sıfıra yakın değerler gözlenmiştir. Wild-type spike (S^{WT}) ve Omicron spike (S^{O}) peptid havuzları ile stimülasyon sonrasında, her iki grupta da NAIVE $CD4^+$ T hücrelerinde aktivasyon yanıtında artış saptanmıştır. Aynı bireylerde yapılan karşılaştırmalarda hem S^{WT} hem de S^{O} stimülasyonlarının, negatif kontrol koşullarına göre anlamlı düzeyde aktivasyon yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: Wt(+) ve Wt(−) bireylerde naive $CD4^+$ T hücrelerinde antijen-spesifik aktivasyonun karşılaştırılması

Her bir nokta bir bireyi göstermektedir. Kutu grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Analizler sonucunda, naive $CD4^+$ T hücre alt grubunda SARS-CoV-2 spike antijenlerine yanıt olarak gelişen aktivasyon yanıtlarının varyanta ve enfeksiyon geçmişine göre farklılık gösterdiği görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı

farklar n.s. p>0,05; *p<0,05 **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001 olarak belirtilmiştir (Şekil 4.5).

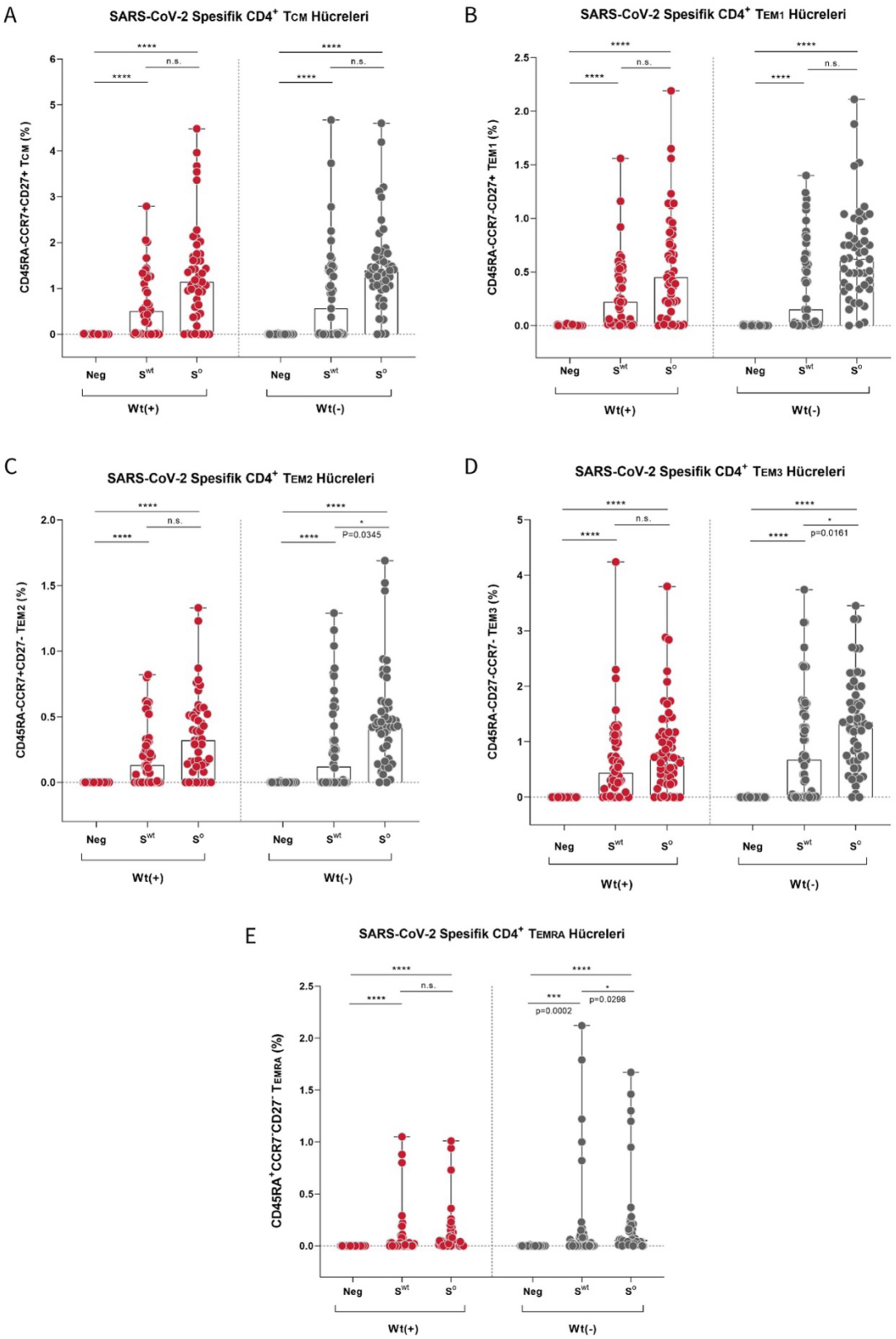
4.3. AKAN HÜCRE ÖLÇER İLE $CD4^+$ T HÜCRELERİNİN BELLEK ALT POPÜLASYONLARININ DAĞILIMI VE GRUP KARŞILAŞTIRMALARI

SARS-CoV-2 spike peptidleri ile *in vitro* stimülasyonun ardından, akan hücre ölçer analizi ile aktive ($CD69^+CD137^+$) $CD4^+$ T hücreleri içerisindeki farklı bellek alt gruplarının frekansları belirlendi ve Wt(+) ile Wt(−) grupları arasında karşılaştırıldı. $CD4^+$ T hücreleri, yüzey belirteçlerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırıldı:

- Merkezi bellek T hücreleri (TCM): $CD45RA^-CCR7^+CD27^+$
- Efektör bellek T hücreleri (TEM1): $CD45RA^-CCR7^-CD27^+$
- Efektör bellek T hücreleri (TEM2): $CD45RA^-CCR7^+CD27^-$
- Efektör bellek T hücreleri (TEM3): $CD45RA^-CCR7^-CD27^-$
- Terminal farklılaşmış efektör bellek $CD4^+$ T hücreleri (TEMRA): $CD45RA^+CD27^-$ $CCR7^-$

Antijen-spesifik $CD4^+$ T hücre aktivasyonunun fonksiyonel hafıza profili hakkında ayrıntılı bilgi sunarak, Wt(+) ve Wt(−) bireylerde farklı bellek T hücresi alt tiplerinin bağışıklık yanıtındaki rolünün değerlendirilmesini sağlamıştır.

Akan hücre ölçer ile (A) TCM: $CD45RA^-CCR7^+CD27^+$, (B) TEM1: $CD45RA^-CCR7^-CD27^+$, (C) TEM2: $CD45RA^-CCR7^+CD27^-$, (D) TEM3: $CD45RA^-CCR7^-CD27^-$ ve (E) TEMRA: ($CD45RA^+CCR7^-CD27^-$) $CD4^+$ T hücre popülasyonları, stimüle edilmemiş kontrol (Neg), SARS-CoV-2 wild-type spike peptid havuzu (S^{WT}) ve Omicron spike peptit havuzu (S^O) ile stimüle edilmiş PKMH'lerde ölçülmüştür (Şekil 4.6). Kutu grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) gruplarının her birinde Friedman testi ile anlamlı fark saptanmış, çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile değerlendirilmiştir. 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). Bu bulgular, hem aşılanmadan önce enfeksiyon geçirmiş (Wt(+)) hem de geçirmemiş (Wt(−)) bireylerde Omicron spike peptitlerinin, bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonlarını etkin şekilde aktive ettiğini göstermektedir.



Şekil 4.6: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında, SARS-CoV-2 spike antijenlerine yanıt olarak aktive olan ($CD69^{+}CD137^{+}$) $CD4^{+}$ T hücreleri içerisindeki bellek alt popülasyonlarının yüzdelik frekansları

$CD4^+$ T hücreleri içerisindeki farklı bellek alt gruplarının farklı stimülasyon durumlarına göre yanıtları Şekil 4.6'da her bir bellek grubu için gösterilmiştir. Her iki grupta da stimülasyona yanıt olarak merkezi ve efektör bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonlarının frekanslarında negatife göre anlamlı düzeyde değişiklikler gözlenmiştir. Dunn'un çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre, Wt(+) bireylerde, hem SARS-CoV-2 wild-type spike (S^{WT}) hem de Omicron spike (S^O) peptid havuzları ile yapılan stimülasyon, stimülasyonsuz negatif kontrole (Neg) kıyasla tüm alt gruplarda anlamlı aktivasyon artışı oluşturmuştur (TCM, TEM1, TEM2, TEM3; tümü için $p<0,0001$). Ancak, SWT ile S^O stimülasyonları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (n.s.) (Şekil 4.6A-D).

Wt(–) bireylerde de benzer şekilde hem S^W hem de S^O stimülasyonları, Neg grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir (tüm alt gruplar için $p<0,0001$). Bununla birlikte bazı alt popülasyonlarda S^O'nun S^{WT}'ye kıyasla daha yüksek bir yanıt indüklediği gözlemlenmiştir. Özellikle TEM2 ($p=0,0345$) ve TEM3 ($p=0,0161$) hücrelerinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.6 C-D).

Wt(+) grubunda, hem S^{WT} hem de S^O peptit havuzları ile yapılan uyarımın, negatif kontrollere (Neg) kıyasla TEMRA frekanslarında anlamlı bir artışı tetiklediği saptanmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4.6E). Bu grupta S^{WT} ve S^O varyantına karşı gelişen TEMRA yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (n.s.).

Wt(–) grubunda da benzer şekilde, her iki varyant uyarımı negatif kontrole göre spesifik TEMRA artışını indüklemiştir (S^{WT} için $p=0.0002$; S^O için $p<0.0001$). Ancak Wt(+) grubunun aksine, Wt(–) kohortunda varyantlara özgü yanıt büyüklükleri karşılaştırıldığında istatistiksel bir farklılık tespit edilmiştir. S^{WT} ve S^O uyarımı sonucu elde edilen TEMRA frekansları arasındaki bu farkın anlamlılık düzeyi $p=0.0298$ olarak belirlenmiştir.

$CD4^+$ T hücreleri içerisindeki farklı bellek alt gruplarının farklı stimülasyon durumlarına göre yanıtlarının kantitatif değerlendirilmesi için, SARS-CoV-2 S^{WT} ve S^O peptit uyarımı sonrası Wt(+) ve Wt(−) gruplarındaki $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı frekanslarının median değerleri Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: SARS-CoV-2 S^{WT} ve S^{O} peptit uyarımı sonrası Wt(+) ve Wt(−) gruplarındaki $CD4^{+}$ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı frekansları

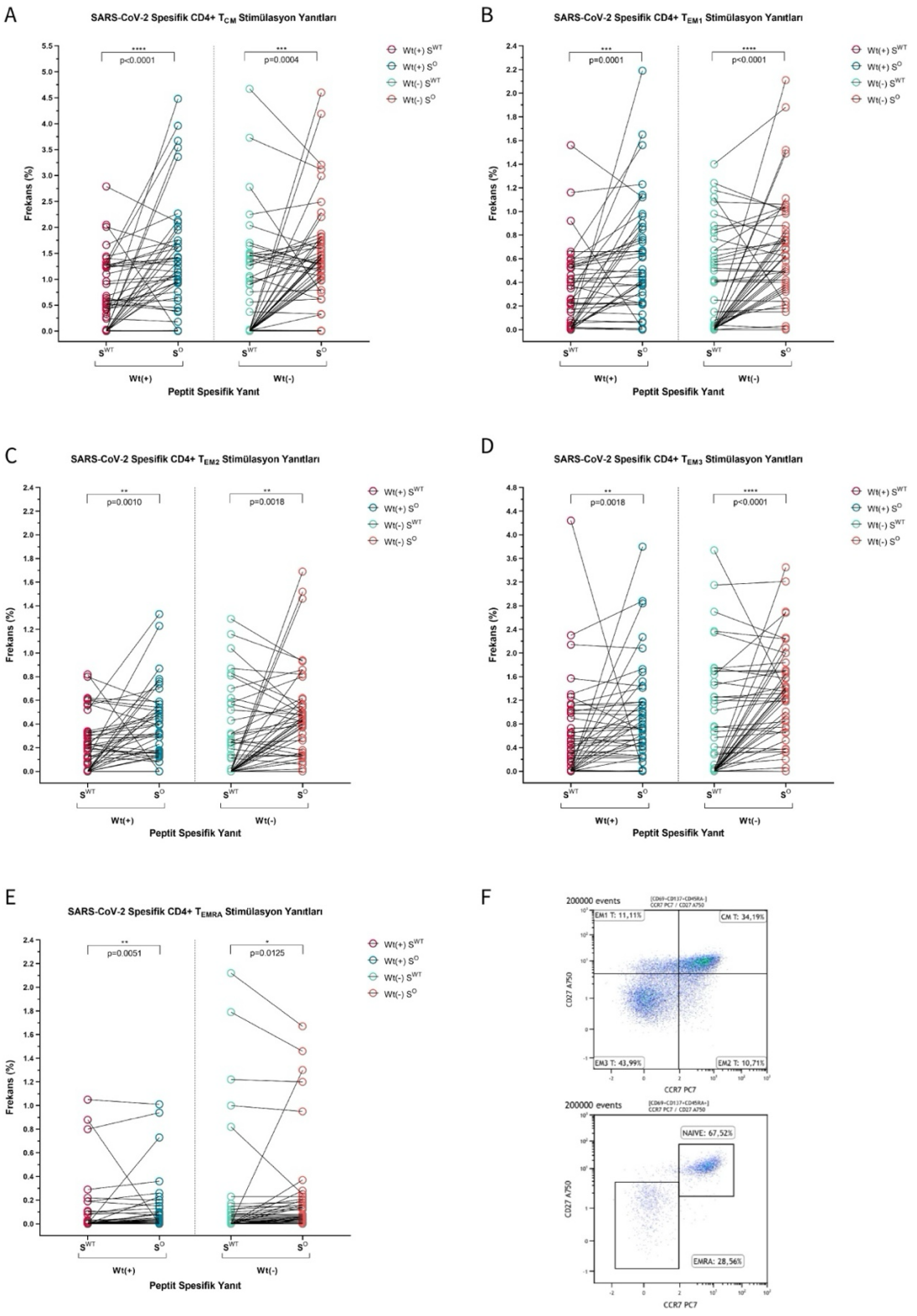
	S^{WT}		p	S^{O}		p
	Median (IQR)			Median (IQR)		
	Wt(+)	Wt(−)		Wt(+)	Wt(−)	
TCM (%)	0,500 (0,010-1,240)	0,560 (0,000-1,450)	0,694	1,140 (0,450-1,750)	1,390 (1,040-1,760)	0,171
TEM1 (%)	0,220 (0,010-0,520)	0,150 (0,010-0,670)	0,968	0,450 (0,210-0,850)	0,620 (0,360-0,880)	0,116
TEM2 (%)	0,130 (0,000-0,310)	0,120 (0,000-0,520)	0,921	0,320 (0,120-0,520)	0,430 (0,180-0,610)	0,078
TEM3 (%)	0,300 (0,010-0,980)	0,280 (0,000-1,460)	0,818	0,710 (0,260-1,170)	1,320 (0,660-1,170)	0,003**
TEMRA (%)	0,010 (0,000-0,030)	0,010 (0,000-0,080)	0,945	0,020 (0,010-0,090)	0,050 (0,010-0,180)	0,067

Two-tailed Mann-Whitney; **p<0,01

Gruplar arası yanıt büyüklüklerini karşılaştırmak amacıyla, S^{WT} ve S^{O} peptit havuzları ile uyarım sonrası aktive olan $CD4^{+}$ T hücre bellek alt tiplerinin (TCM, TEM1, TEM2, TEM3, TEMRA) median (%) frekans değerleri gösterilmiştir. Gruplar arası farklar Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi **p<0,01 olarak belirtilmiştir.

Wuhan (S^{WT}) varyantına karşı oluşan yanıtlar incelendiğinde; TCM, TEM1, TEM2, TEM3 ve TEMRA alt gruplarının hiçbirinde Wt(+) ve Wt(−) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0.05).

S^{O} varyantına karşı verilen yanıtlarda da benzer şekilde TCM, TEM, TEM2 ve TEMRA popülasyonları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, TEM3 ($CD45RA^{-}CCR7^{-}CD27^{-}$) alt grubunun Omicron'a karşı frekansı, Wt(−) grubunda (Median: %1.320) Wt(+) grubuna (Median: %0.710) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.2, p=0.003).



Şekil 4.7: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin varyanta özgü ikili eşleştirilmiş analizi ve alt küme dağılımlarını gösteren temsili akan hücre ölçer kapılama şemaları ile birlikte, Spike spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin ($CD69^+CD137^+$) kanonik bellek farklılaşma profilleri

Wt(+) ve Wt(−) gruplarında SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin varyanta özgü ikili eşleştirilmiş analizi Şekil 4.7'de gösterilmiştir. SARS-CoV-2 S^{WT} ve S^{O} peptit havuzları ile uyarım sonrası Wt(+) (sol paneller) ve Wt(−) (sağ paneller) donörlerden elde edilen (A) TCM, (B) TEM1, (C) TEM2, (D) TEM3 ve (E) TEMRA CD4+ T hücre frekanslarının bireysel düzeydeki karşılaştırmasını ve (F) uyarım sonrası bellek CD4+ T hücre alt tiplerinin temsili akan hücre ölçer analizi göstermektedir. Her bir çizgi, aynı donörün iki farklı varyanta verdiği yanıtı birbirine bağlamaktadır. Gruplar arası farklar Wilcoxon eşleştirilmiş işaretli sıra testi (Wilcoxon matched-pairs signed rank test) ile analiz edilmiştir. P değerleri grafik üzerinde belirtilmiştir (*$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, ****$p<0.0001$).

SARS-CoV-2 spesifik bellek $CD4^+$ T hücrelerinin varyantlara karşı verdiği yanıtın büyüklüğü, bireysel düzeydeki değişimleri ortaya koymak amacıyla S^{WT} ve S^{O} uyarımları arasında eşleştirilmiş (pairwise) olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.7). Genel bir eğilim olarak, incelenen tüm bellek alt gruplarında Omicron varyantına karşı gelişen yanıt frekansının, wild type suşuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu veya varyanta özgü belirgin bir modülasyon gösterdiği saptanmıştır.

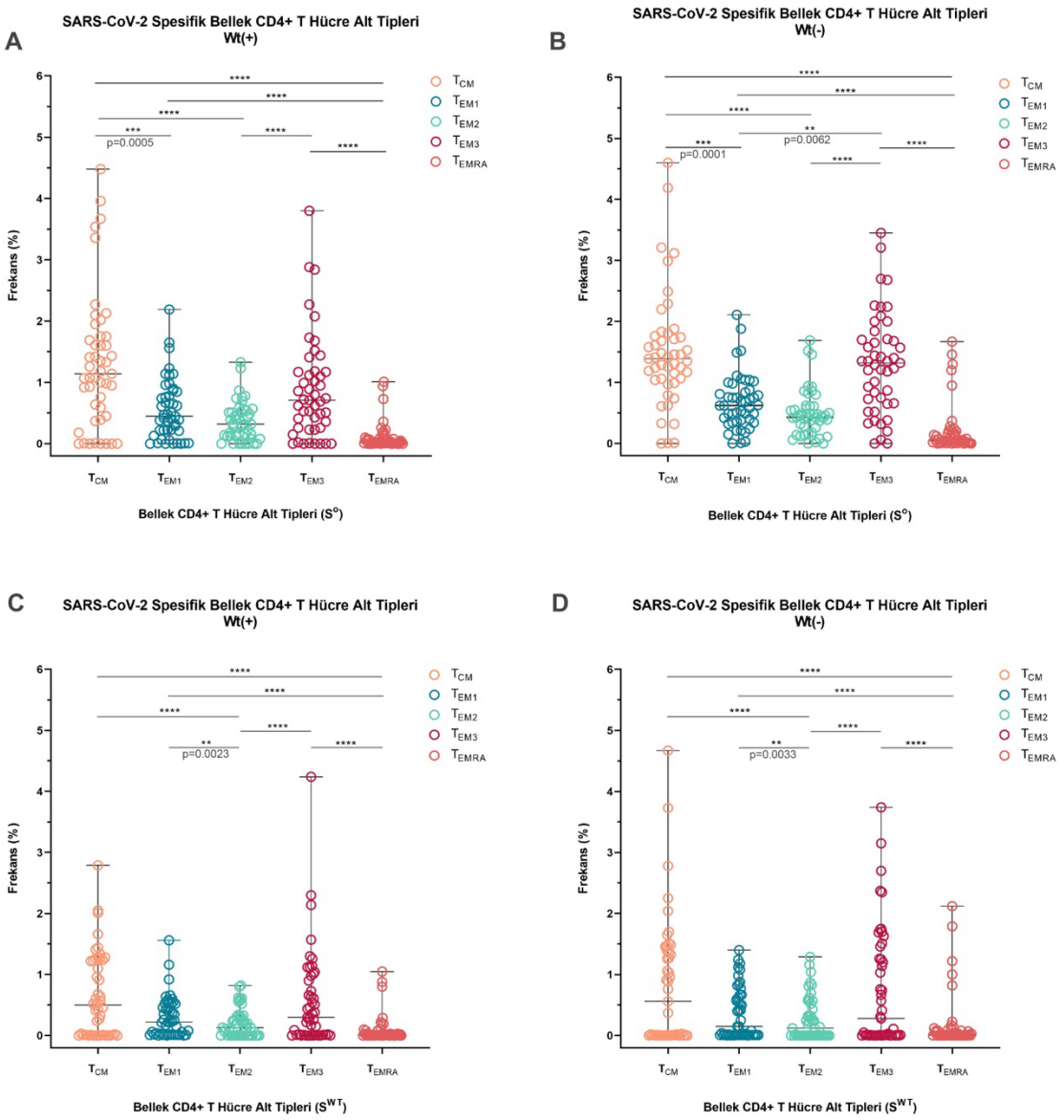
Bellek havuzunun en baskın bileşeni olan TCM yanıtları incelendiğinde (Şekil 4.7A), hem Wt(+) grubunda ($p<0.0001$) hem de Wt(−) grubunda ($p=0.0004$) S^{O} uyarımının, S^{WT}'ye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bir T hücre frekansı indüklediği gözlemlenmiştir.

Benzer şekilde, efektör bellek alt gruplarında da Omicron varyantına yönelik güçlü bir yanıt artışı tespit edilmiştir. TEM1 alt grubunda (Şekil 4.7B), her iki grupta da S^{O} yanıtı S^{WT} yanıtından anlamlı düzeyde yüksektir (Wt(+) için $p=0.0001$; Wt(−) için $p<0.0001$). Geçiş formu olan TEM2 popülasyonunda da (Şekil 4.7C) bu anlamlı fark korunmuştur (sırasıyla $p=0.0010$ ve $p=0.0018$).

Özellikle hızlı efektör fonksiyonlardan sorumlu olan TEM3 alt grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.7D), Wt(−) grubunda Omicron'a karşı verilen yanıtın Wuhan yanıtına göre yüksek düzeyde anlamlı bir artış sergilediği ($p<0.0001$) görülmektedir. Wt(+) grubunda da varyantlar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0018$).

Terminal farklılaşmış TEMRA hücrelerinde (Şekil 4.7E) frekanslar genel olarak düşük seyretse de, varyantlar arası karşılaştırmada istatistiksel anlamlılık her iki grupta da mevcuttur (Wt(+) p=0.0051; Wt(−) p=0.0125).

Bir katılımcının, bellek $CD4^+$ T hücre alt küme dağılımlarını gösteren temsili akan hücre ölçer kapılama şemaları ile birlikte, Spike spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin ($CD69^+CD137^+$) kanonik bellek farklılaşma profilleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 4.7F).



Şekil 4.8: Wt(+) ve Wt(−) gruplarında SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek alt tiplerinin karşılaştırmalı dağılımı

SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre yanıtının kalitesini ve sürdürülebilirliğini belirleyen bellek fenotiplerinin dağılımı, hem S^{WT} hem de S^O varyantına karşı Wt(+) ve Wt(−) gruplarında kapsamlı olarak analiz edilmiştir (Şekil 4.8). Saçılım grafiklerinde medyan ve çeyrekler arası aralık (IQR) gösterilmiştir. Her bir nokta, bireysel bir katılımcıyı temsil etmektedir. Wt(+) (n = 47) ve Wt(−) (n = 47) gruplarının her birinde Friedman testi ile anlamlı fark saptanmış, çoklu karşılaştırmalar Dunn testi ile değerlendirilmiştir. $p<0,05$ düzeyinde anlamlı farklılıklar yıldızlarla gösterilmiştir (n.s. $p>0,05$; *$p<0,05$ **$p<0,01$; ***$p<0,001$; ****$p<0,0001$).

Tüm deney koşullarında (Şekil 4.8A-D panelleri), hücresel yanıtın ağırlıklı olarak TCM ve TEM3 popülasyonları tarafından domine edildiği saptanmıştır. S^O varyantına karşı yanıtlar incelendiğinde, Wt(+) grubunda (Şekil 4.8A), TCM alt grubunun frekansı, TEM1 ($p=0,0005$), TEM2 ($p<0,0001$) ve TEMRA ($p<0,0001$) popülasyonlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Benzer bir şekilde, TEM1 ve TEM3 hücre gruplarının frekansı, TEMRA popülasyonlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$).

Benzer şekilde Wt(−) grubunda da (Şekil 4.8B) TCM ve TEM3 popülasyonları, diğer alt gruplara (TEM1, TEM2, TEMRA) göre baskın bir profil sergilemiştir (sırasıyla $p=0,0001$, $p<0,0001$ ve $p<0,0001$). Bu deney grubunda, TEM3 hücre frekansı, TEM1, ($p=0,0062$), TEM2 ($p<0,0001$) ve TEMRA ($p<0,0001$) hücrelerine kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur.

S^{WT}'e karşı gelişen yanıtta da fenotipik dağılım paterni Omicron peptitlerine karşı oluşturulan yanıt ile örtüşmektedir. Wt(+) grubunda (Şekil 4.8C) TCM frekansı, TEM2 ve TEMRA popülasyonlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). TEM1 ($p=0,0023$) ve TEM3 ($p<0,0001$) hücre frekansları, TEM2'den anlamlı derecede yüksektir. Diğer tüm deney gruplarında olduğu gibi, TEM3 hücre frekansı, TEM2 ve TEMRA hücrelerine göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$).

Wt(−) grubunda da (Şekil 4.8D) TCM ve TEM3 baskınlığı istatistiksel olarak korunmuştur. TCM frekansı, TEM2 ve TEMRA popülasyonlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). TEM1 hücre grubu frekansı TEM2'ye göre yüksektir ($p=0,0033$). TEM3 hücre frekansı, TEM2 ve TEMRA hücrelerine göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). Diğer kohortlarda

benzer şekilde görüldüğü gibi, TEM1 hücre frekansı, TEMRA hücre frekansından anlamlı bir şekilde yüksektir ($p<0,0001$).

SARS-CoV-2 Wild type (S^{WT}) ve Omicron (S^{O}) peptid havuzları ile stimüle edilen PKMH örneklerinde, $CD4^+$ T hücrelerinin TCM ve TEM1, TEM2, TEM3 alt gruplarının aktivasyon frekansları, enfeksiyon geçmişi olan (Wt(+)) ve olmayan (Wt(−)) bireylerde karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir (Tablo 4.3). Analizlerde Friedman testi ve takiben Dunn'un çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

Tablo 4.3: Wt(+) ve Wt(–) bireylerde TCM, TEM1, TEM2 ve TEM3 $CD4^+$ T hücre frekanslarının karşılaştırmalı analizi

Wt(+), TCM	S^{O} **Rank sum 1**	S^{WT} **Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	102,5	55,50	47,00	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	124,0	55,50	68,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	124,0	102,5	21,50	0,0798
Wt(–), TCM				
S^{WT} vs. Neg	102,5	54,00	48,50	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	125,5	54,00	71,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	125,5	102,5	23,00	0,0530
Wt(+), TEM1	S^{O} **Rank sum 1**	S^{WT} **Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	106,0	52,00	54,00	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	124,0	52,00	72,00	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	124,0	106,0	18,00	0,1901
Wt(–), TEM1				
S^{WT} vs. Neg	104,5	50,00	54,50	<0,0001***
S^{O} vs. Neg	127,5	50,00	77,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	127,5	104,5	23,00	0,0530
Wt(+), TEM2	S^{O} **Rank sum 1**	S^{WT} **Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	98,50	63,50	35,00	0,0009**
S^{O} vs. Neg	120,0	63,50	56,50	<0,0001***
S^{O} vs. S^{WT}	120,0	98,50	21,50	0,0798
Wt(–), TEM2				
S^{WT} vs. Neg	96,50	61,00	35,50	0,0008**

Tablo 4.4: (devam)

S^O vs. Neg	124,5	61,00	63,50	<0,0001***
S^O vs. S^{WT}	124,5	96,50	28,00	0,0116*
Wt(+), TEM3	S^O **Rank sum 1**	S^{WT} **Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	103,0	58,50	44,50	<0,0001***
S^O vs. Neg	120,5	58,50	62,00	<0,0001***
S^O vs. S^{WT}	120,5	103,0	17,50	0,2132
Wt(–), TEM3				
S^{WT} vs. Neg	98,00	58,50	39,50	0,0001***
S^O vs. Neg	125,5	58,50	67,00	<0,0001***
S^O vs. S^{WT}	125,5	98,00	27,50	0,0137*
Wt(+), TEMRA	S^O **Rank sum 1**	S^{WT} **Rank sum 2**	**Rank sum diff.**	**p**
S^{WT} vs. Neg	101,00	60,00	41,0	<0,0001***
S^O vs. Neg	121,00	60,00	61,00	<0,0001***
S^O vs. S^{WT}	121,00	101,0	20,00	0,1174
Wt(−), TEMRA				
S^{WT} vs. Neg	98,50	60,00	38,50	0,0002**
S^O vs. Neg	123,5	60,00	63,50	<0,0001***
S^O vs. S^{WT}	123,5	98,50	25,00	0,0298*

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

Wt(+) grubunda, hem S^{WT} hem de S^O stimülasyonları, stimüle edilmemiş negatif kontrole (Neg) kıyasla TCM ($CD45RA^-CCR7^+CD27^+$) hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir aktivasyon artışı sağlamıştır (p<0,0001). İki peptid havuzu (S^{WT} ve S^O) karşılaştırıldığında ise yanıtlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,0798). Benzer şekilde, Wt(−) grubunda da her iki stimülasyon negatif kontrole göre anlamlı artış göstermiş (p<0,0001), varyantlar arası karşılaştırmada ise Omicron yanıtı sayısal olarak daha yüksek görünmekle birlikte istatistiksel anlamlılık sınırında kalmıştır (p=0,0530).

TEM1 ($CD45RA^-CCR7^-CD27^+$) alt popülasyonu incelendiğinde, her iki çalışma grubunda da (Wt(+) ve Wt(−)), negatif kontrole kıyasla hem S^{WT} hem de S^O stimülasyonlarının anlamlı düzeyde yüksek T hücre yanıtı indüklediği görülmüştür

(p<0,0001). Varyantlar arası etkinlik değerlendirildiğinde, ne Wt(+) grubunda (p=0,1901) ne de Wt(−) grubunda (p=0,0530) peptid havuzları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

TEM2 ($CD45RA^{-}CCR7^{+}CD27^{-}$) hücrelerinde grup bazlı farklılaşmalar dikkat çekicidir. Wt(+) S^{WT} (p=0,0009) ve S^{O} (p<0,0001) stimülasyonları negatife göre anlamlı artış sağlarken, iki varyant arasında fark bulunmamıştır (p=0,0798). Ancak Wt(−) grubunda, negatif kontrole göre sağlanan artışın yanı sıra, Omicron (S^{O}) peptid havuzuna verilen yanıtın, Wild-type (S^{WT}) havuzuna verilen yanıttan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0,0116). Bu bulgu, enfeksiyon geçmişi olmayan aşılanmış bireylerde TEM2 yanıtının Omicron varyantına karşı daha güçlü bir yönelim sergilediğini göstermektedir.

TEM3 ($CD45RA^{-}CCR7^{-}CD27^{-}$) alt popülasyonunda da TEM2 'ye benzer bir profil gözlenmiştir. Wt(+) grubunda her iki stimülasyon negatife göre anlamlı artış sağlarken (p<0,0001), varyantlar arası fark anlamsız bulunmuştur (p=0,2132). Buna karşın, Wt(−) grubunda Omicron (S^{O}) spesifik yanıtlar, Wild type (S^{WT}) yanıtlarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p=0,0137).

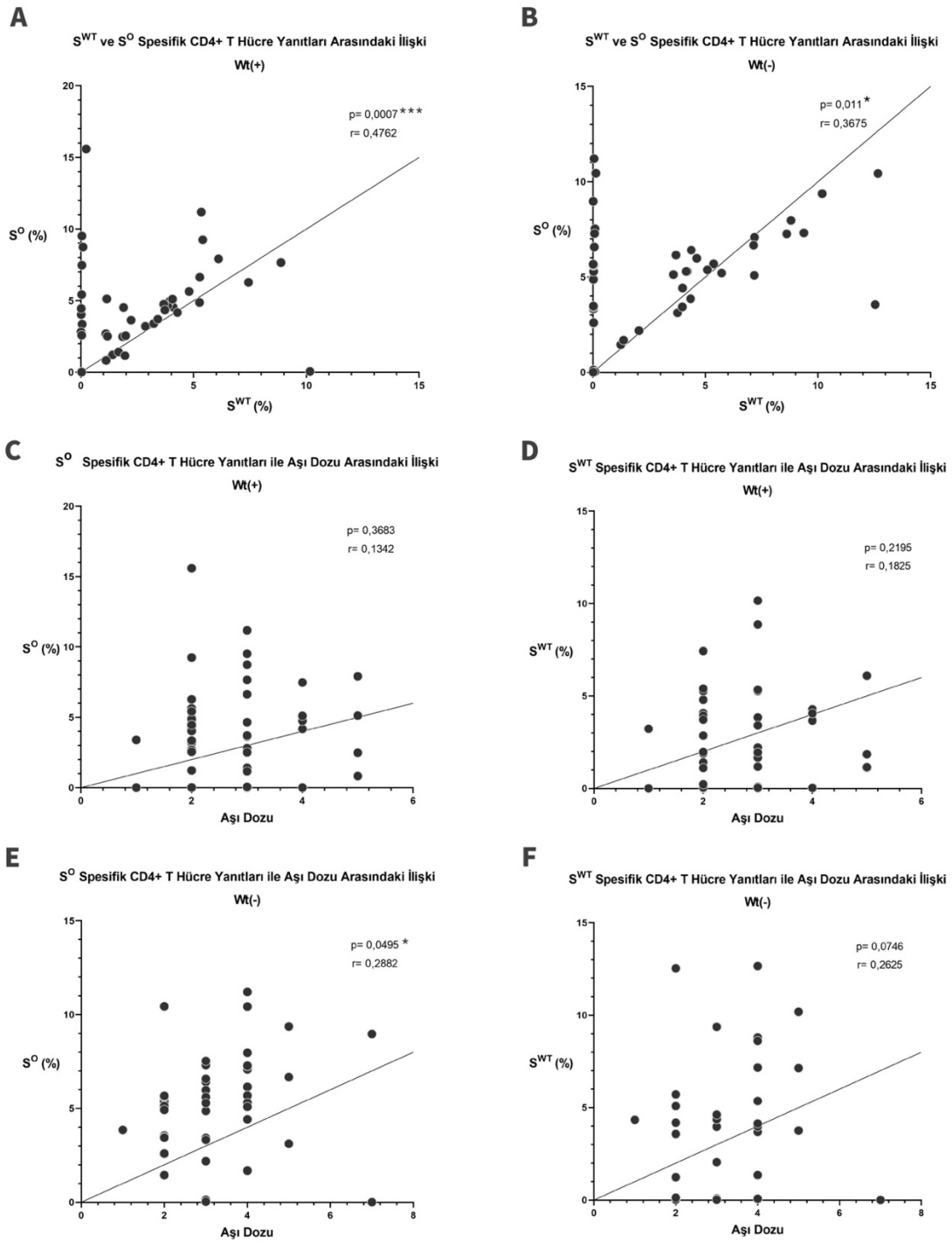
TEMRA ($CD45RA^{+}CCR7^{-}CD27^{-}$) hücre alt gruplarında Wt(+) S^{WT} (p<0,0001) ve S^{O} (p<0,0001) stimülasyonları negatife göre anlamlı artış sağlarken, iki varyant arasında fark bulunmamıştır. Benzer bir şekilde, Wt(−) S^{WT} (p=0,0002) ve S^{O} (p<0,0001) stimülasyonları negatife göre anlamlı artış sağlarken, iki varyant arasında zayıf bir anlamlılık görülmüştür (p=0,0298).

4.4. KORELASYON ANALİZLERİ

WT ve Omicron peptitlerine karşı oluşan T hücresi yanıtları arasındaki ilişki (çapraz reaktivite) korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.9A-B).

Dağılım grafikleri, (A) Wild type enfeksiyon geçmişi olan (Wt(+), n=47) ve (B) Wild type enfeksiyon geçmişi olmayan (Wt(−), n=47) katılımcıların S^{WT} (X ekseni) ve S^{O} (Y ekseni) peptid havuzlarına verdikleri antijen spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtlarının ilişkisini göstermektedir. Her bir nokta, tek bir katılımcının iki farklı stimülasyona verdiği yanıtı temsil etmektedir. Yanıtlar, toplam $CD4^{+}$ T hücre popülasyonunun yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir. İki yanıt arasındaki istatistiksel ilişki, Spearman korelasyon testi ile analiz edilmiştir. Spearman korelasyon katsayısı (r) ve istatistiksel anlamlılık (p)

değerleri grafikte belirtilmiştir. Düz çizgiler, doğrusal regresyon eğrilerini temsil etmektedir ($p<0,05$; $^{**}p<0,001$).



Şekil 4.9: (A) Wt(+) ve (B) Wt(−) gruplarında S^{WT} ve S^{O} spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtları arasındaki korelasyon. (C-F) Wt(+) ve Wt(−) gruplarında aşı dozu ile antijen spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtları arasındaki ilişki

Dağılım grafikleri, (A) Wild type enfeksiyon geçmişi olan (Wt(+), n=47) ve (B) Wild type enfeksiyon geçmişi olmayan (Wt(−), n=47) katılımcıların S^{WT} (X ekseni) ve S^{O} (Y ekseni) peptid havuzlarına verdikleri antijen spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtlarının ilişkisini göstermektedir. Her bir nokta, tek bir katılımcının iki farklı stimülasyona verdiği yanıtı temsil etmektedir. Yanıtlar, toplam $CD4^{+}$ T hücre popülasyonunun yüzdesi (%) olarak ifade edilmiştir. İki yanıt arasındaki istatistiksel ilişki, Spearman korelasyon testi ile analiz edilmiştir. Spearman korelasyon katsayısı (r) ve istatistiksel anlamlılık (p) değerleri grafikte belirtilmiştir. Düz çizgiler, doğrusal regresyon eğrilerini temsil etmektedir ($p<0,05$; $**p<0,001$).

Korelasyon grafiklerinde gösterilen her bir nokta, tek bir katılımcının iki farklı stimülasyona verdiği yanıtı temsil etmektedir. İki yanıt arasındaki ilişkinin gücü ve yönü, non-parametrik Spearman korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Her iki grupta da S^{WT} ve S^{O} yanıtları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve pozitif bir korelasyon saptanmıştır (Wt(+) grubu: $r = 0,4752$, $p = 0,0007$; Wt(−) grubu: $r = 0,3675$, $p = 0,011$). Bu bulguya göre, hibrit (Wt(+)) ve aşı temelli (Wt(−)) bağışıklığa sahip bireylerde, $CD4^{+}$ T hücre belleğinin Omicron varyantına karşı anlamlı düzeyde çapraz reaktivite koruduğunu göstermektedir.

Aşılanmanın T hücresi belleği üzerindeki etkisini daha derinlemesine incelemek amacıyla, katılımcıların aldıkları toplam aşı dozu ile antijene spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtlarının büyüklüğü arasındaki ilişki analiz edilmiştir (Şekil 4.9C-F).

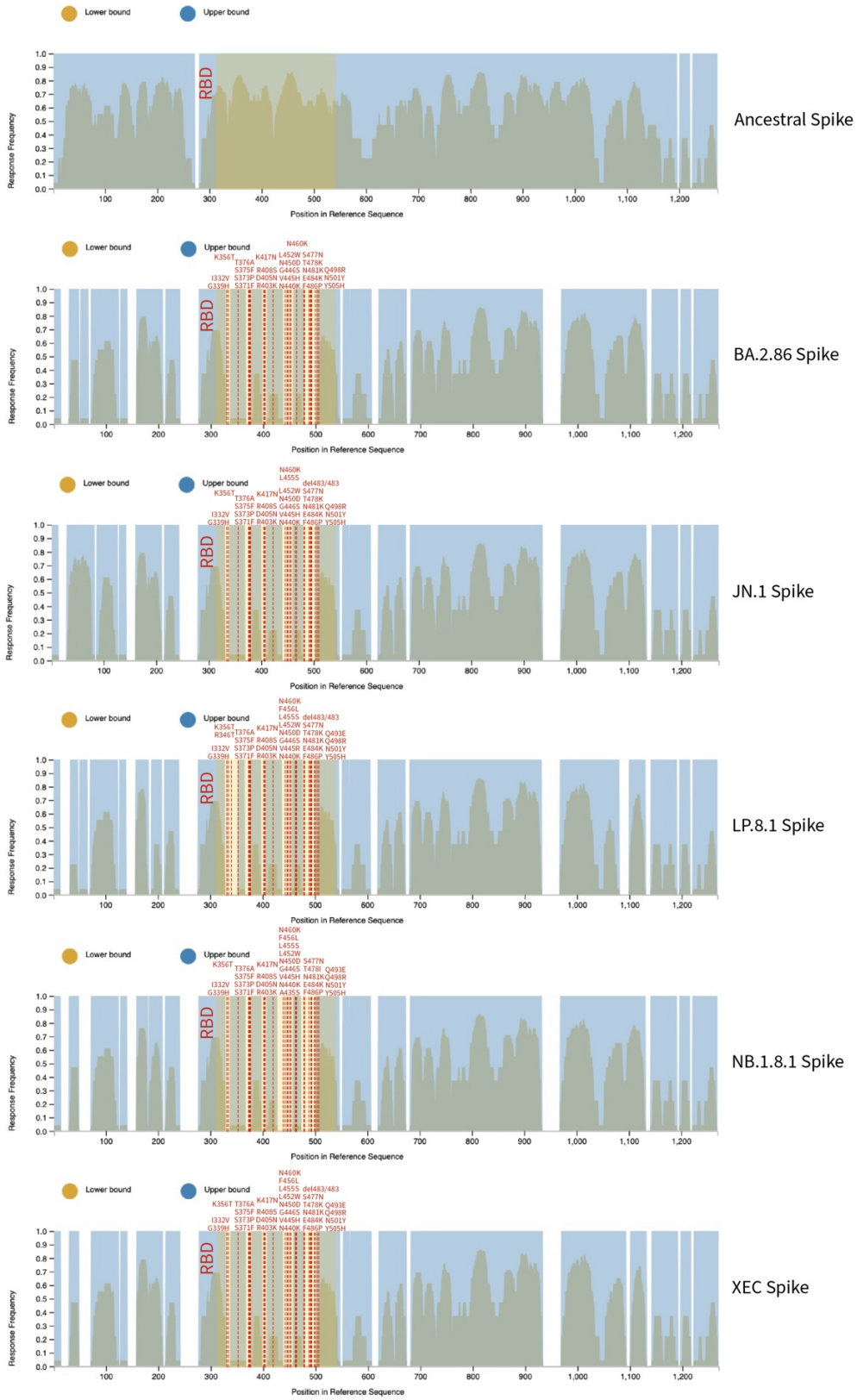
Analiz, Wt(−) grubunda alınan aşı dozu ile S^{O} spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtının büyüklüğü arasında istatistiksel olarak anlamlı, zayıf pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir ($p=0,0495$). Diğer karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır.

Dağılım grafikleri, alınan toplam aşı dozu (X ekseni) ile S^{O} veya S^{WT} spesifik $CD4^{+}$ T hücre yanıtlarının büyüklüğü (Y ekseni, %) arasındaki ilişkiyi göstermektedir (Şekil 4.9). (C) Wt(+) grubunda aşı dozu ile S^{O} yanıtı arasındaki ilişki. (D) Wt(+) grubunda aşı dozu ile S^{WT} yanıtı arasındaki ilişki. (E) Wt(−) grubunda aşı dozu ile S^{O} yanıtı arasındaki ilişki. (F) Wt(−) grubunda aşı dozu ile S^{WT} yanıtı arasındaki ilişki. Her bir nokta tek bir katılımcıyı temsil etmektedir. İstatistiksel analiz, Spearman korelasyon testi kullanılarak yapılmıştır. Spearman korelasyon katsayısı (r) ve istatistiksel anlamlılık (p) değerleri her grafiğin içinde belirtilmiştir.

4.5. VARYANTA ÖZGÜ MUTASYONLARIN DENEYSEL CD4$^+$ T HÜCRE EPİTOPLARI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Spike glikoproteine ait deneysel olarak tanımlanmış 541 adet Sınıf II 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 287, LP.8.1 için 271, XEC için 286, JN.1 için 308 ve BA.2.86 için 294 adet örtüşen (korunmuş) epitop belirlendi.

Wild type ve Omicron varyant alt soylarına (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) ait spike proteini boyunca epitop yanıt frekansı dağılımı ImmunomeBrowser aracıda oluşturulan epitop ve sekans verileriyle oluşturuldu (Şekil 4.10). Her panelde, haritalanan epitopların yanıt frekansı (y-ekseni), spike proteini boyunca amino asit pozisyonuna (x-ekseni, referans sekans) karşılık olarak gösterilmiştir. Mavi ve yeşil gölgeli alanlar sırasıyla %95 güven aralığının üst ve alt sınırlarını temsil ederken, beyaz boşluklar epitop haritalaması yapılmamış veya bağışıklık yanıtı kaydedilmemiş bölgeleri göstermektedir. ACE2'ye bağlanma yeri ve nötralizan antikorların başlıca hedefi olan reseptör bağlama bölgesi (RBD; yaklaşık 319–541. pozisyonlar) sarı ile vurgulanmıştır. RBD üzerindeki noktasal mutasyonlar kırmızı çizigler ile belirtilmiştir. Grafik, wild-type spike proteininin geniş ve sürekli bir epitop kapsama alanına sahip olduğunu göstermektedir. Buna karşın, Omicron alt varyantlarında (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) epitop yanıt frekansı daha düzensiz ve parçalı bir dağılım sergilemekte; sık gözlenen boşluklar, immün kaçış veya epitop kaybı ihtimaline işaret etmektedir.

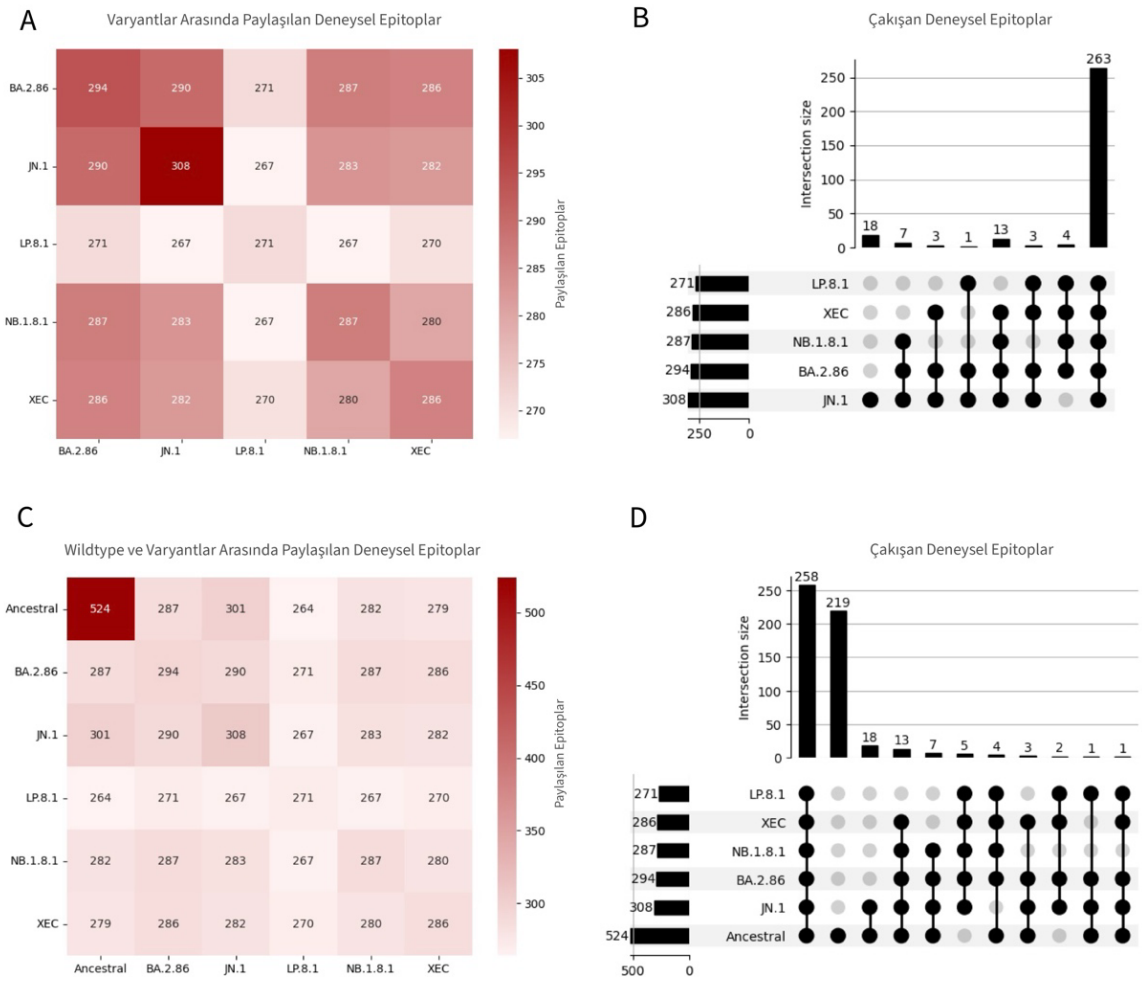


Şekil 4.10: Wild type ve Omicron alt varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) spike proteinleri boyunca $CD4^+$ T hücre epitop yanıt frekansı dağılımları IEDB ImmunomeBrowser aracı kullanılarak görselleştirilmiştir

Wild-type RBD epitopları düzenli olarak yüksek frekansta tanınırken, Omicron RBD'lerinde tanıma azalmış ve süreksiz hale gelmiştir; bu durum immünodominant epitopların kaybına veya zayıflamış bağışıklık tanınmasını göstermektedir. Bununla birlikte, RBD dışındaki bazı bölgeler (örneğin 600–900 ve 1100–1200. amino asitler) varyantlar arasında ölçülebilir bağışıklık yanıtlarını korumakta olup, çapraz reaktif epitopların kalıcılığını göstermektedir. Genel olarak bu dağılımlar, özellikle viral adaptasyon ve bağışıklık kaçışının kilit noktası olan RBD'de, Wild-type Spike proteininin geniş tanıma desenine kıyasla Omicron alt varyantlarında gözlenen daha parçalı bağışıklık tanınmasını ortaya koymaktadır. Wild-type spike proteininde epitop tanınması geniş ve protein boyunca görece süreklilik göstermekte olup, RBD üzerinde güçlü kapsama ile yaygın bağışıklık tanınmasıyla uyumludur. Buna karşılık, Omicron alt varyantları daha parçalı bir yanıt dağılımı sergilemekte, RBD dahil olmak üzere sekans boyunca çok sayıda boşluk göstermekte ve biriken mutasyonlara bağlı bağışıklık kaçışını yansıtmaktadır.

Omicron alt varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasında deneysel olarak tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitoplarının dağılımı karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. İlk aşamada yalnızca varyantlar arası örtüşmeler değerlendirilmiş, ardından Wild type (Ancestral) Spike proteini ile karşılaştırmalar yapılmıştır. Şekilde (Şekil 4.11), beş Omicron varyantı (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) arasında paylaşılan epitop sayılarının gösteren heatmap ile epitope kesimleri ayrıntılı olarak görselleştirildi. Şekil 4.11A'da gösterilen heatmap, beş Omicron varyantı arasında paylaşılan epitop sayılarını ortaya koymaktadır. Varyantlar arasında benzer düzeyde örtüşme gözlenmiş, özellikle JN.1'in 308 epitop ile en yüksek sayıda korunmuş epitopa sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer varyantlarda bu sayı 271 ile 294 arasında değişmiştir. UpSet diyagramı (Şekil 4.11B), varyantların ortak epitop dağılımlarını daha ayrıntılı göstermektedir. Tüm varyantlarda ortak olan 263 epitop bulunmuş, bunun yanı sıra varyantlara özgü küçük sayıda epitop kümeleri de (1–18 arasında değişen) tespit edilmiştir. Ancestral Spike proteini ile varyantlar arasındaki karşılaştırmalar ise Şekil 4.11C ve 4.11D'de gösterilmiştir. Heatmap, ancestral proteinin 524 epitop ile en geniş deneysel epitop setine sahip olduğunu, varyantlarla karşılaştırıldığında ise örtüşen epitop sayılarının 264–301 arasında değiştiğini göstermektedir. UpSet diyagramı (Şekil 4.11D) ancestral proteinden varyantlara aktarılan epitopların büyük ölçüde ortak olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle tüm varyantlarda 258 epitopun korunduğu, ayrıca ancestral ve

varyant gruplarına özgü daha sınırlı sayıda epitopların da bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, SARS-CoV-2 Spike proteini üzerinde tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitoplarının büyük çoğunluğunun Omicron alt varyantlarında korunduğunu, ancak varyantlara özgü kayıpların ve küçük farklılıkların da mevcut olduğunu göstermektedir. Özellikle JN.1, diğer varyantlara kıyasla daha yüksek oranda epitop korunumu sergilediği gösterilmiştir. Heatmap grafiği ile tüm örtüşen epitop sayıları gösterilmiş, Wild-type spike epitoları ile varyantlar arasındaki örtüşmeyen epitoplar ise listelenmiştir (Tablo 4.4).



Şekil 4.11: SARS-CoV-2 Spike proteini üzerinde deneysel olarak tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitoplarının Omicron varyantları arasındaki dağılımı

Tablo 4.5: Omicron alt varyantlarında tanımlanan epitopların Wild-type SARS-CoV-2 epitopları ile örtüşme düzeyi ve varyantlardaki örtüşmeyen epitoplar listesi

Varyant	Toplam Epitop Sayısı	Wiltype ile Ortak Epitop Sayısı	Korunma Oranı (%)	Wild-type Epitoplar İçerisinde Bulunmayan Epitoplar
BA.2.86	294	287	97.62	APGQTGNIADYNYKL; TQLKRALTGIAVEQD; GNIADYNYKLPDDFT; RDISTEIYQAGNKPC; NVFQTRAGCLIGAEY; KQIYKTPPIKYFGGF; PDDFTGCVIAWNSNK
JN.1	308	301	97.73	APGQTGNIADYNYKL; TQLKRALTGIAVEQD; GNIADYNYKLPDDFT; RDISTEIYQAGNKPC; NVFQTRAGCLIGAEY; KQIYKTPPIKYFGGF; PDDFTGCVIAWNSNK
LP.8.1	271	264	97.42	APGQTGNIADYNYKL; TQLKRALTGIAVEQD; GNIADYNYKLPDDFT; RDISTEIYQAGNKPC; NVFQTRAGCLIGAEY; KQIYKTPPIKYFGGF; PDDFTGCVIAWNSNK
NB.1.8.1	287	282	98.26	APGQTGNIADYNYKL; TQLKRALTGIAVEQD; GNIADYNYKLPDDFT; NVFQTRAGCLIGAEY; KQIYKTPPIKYFGGF
XEC	286	279	97.55	APGQTGNIADYNYKL; TQLKRALTGIAVEQD; GNIADYNYKLPDDFT; RDISTEIYQAGNKPC; NVFQTRAGCLIGAEY; KQIYKTPPIKYFGGF; PDDFTGCVIAWNSNK

Tablo 4.6: BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC Omicron alt varyantlarına ait spike varyantlarının her birinde tanımlanan 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

Tablo 4.4: (devam)

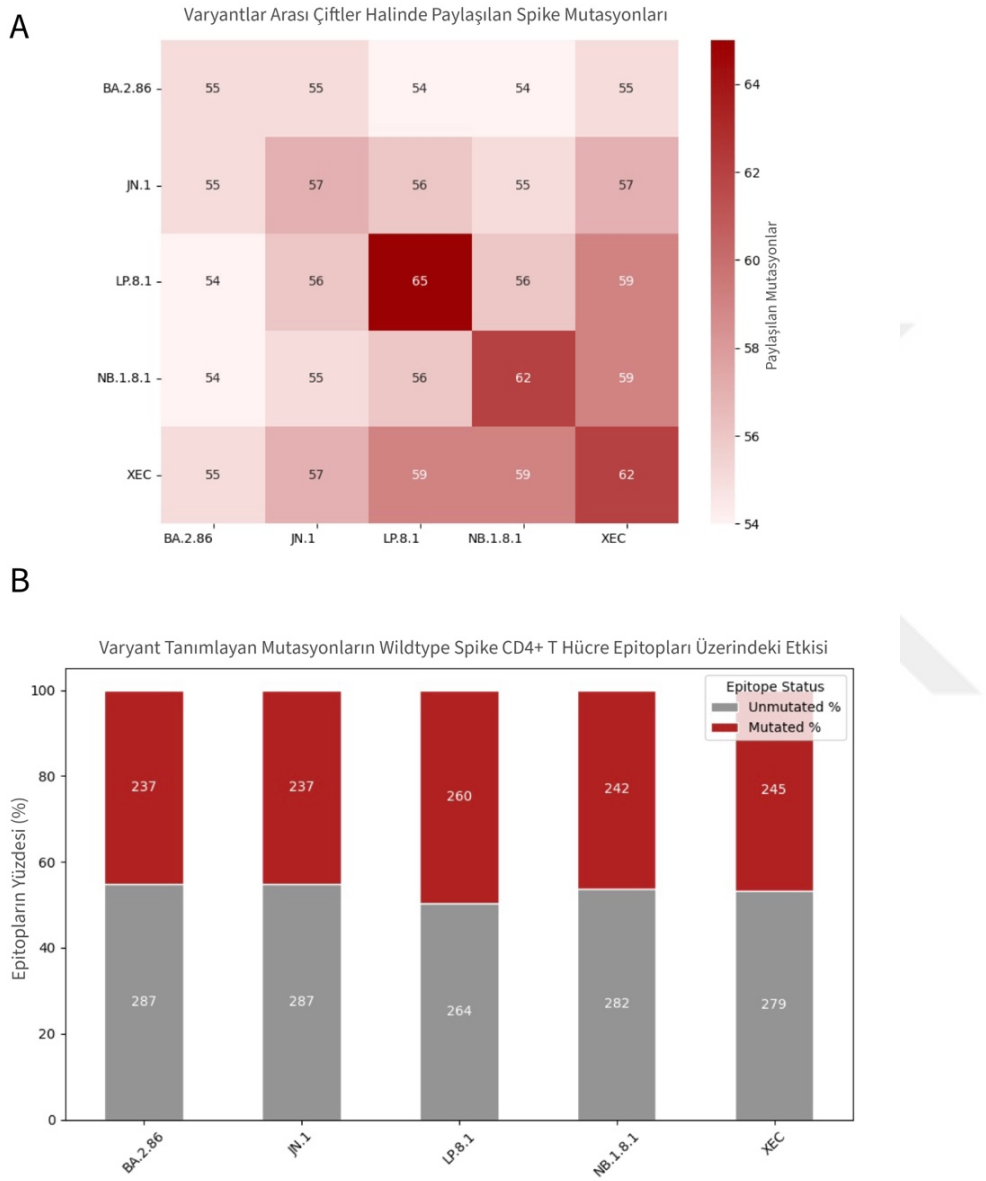
S371F	S371F	I332V	I332V	G339H
S373P	S373P	G339H	G339H	K356T
S375F	S375F	R346T	K356T	S371F
T376A	T376A	K356T	S371F	S373P
R403K	R403K	S371F	S373P	S375F
D405N	D405N	S373P	S375F	T376A
R408S	R408S	S375F	T376A	R403K
K417N	K417N	T376A	R403K	D405N
N440K	N440K	R403K	D405N	R408S
V445H	V445H	D405N	R408S	K417N
G446S	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
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		

Omicron varyantlarının Spike proteinlerindeki tanımlayıcı mutasyonları ve bu mutasyonların $CD4^+$ T hücre epitopları üzerindeki etkileri detaylı biçimde incelendi (Tablo 4.5). İlk olarak, varyantlar arasında paylaşılan Spike mutasyonlarının dağılımı çiftli karşılaştırmalarla değerlendirildi (Şekil 4.12A). Heatmap analizine göre varyant çiftleri arasında paylaşılan mutasyon sayılarının 54 ile 65 arasında değiştiği gözlendi. Özellikle LP.8.1 ve JN.1 varyantları 65 mutasyon ile en yüksek örtüşme oranına sahip olurken, NB.1.8.1 ve XEC de 62 mutasyonluk yüksek bir ortaklığa sahip olduğu tespit edildi. Buna karşılık, BA.2.86 diğer varyantlarla daha düşük düzeyde ortak mutasyon göstermiştir (54–55 arası). Bu bulgu, yakın dönemde ortaya çıkan Omicron alt varyantlarının benzer mutasyon setlerini paylaştığını, ancak BA.2.86'nın diğer varyantlara kıyasla daha farklı bir mutasyon profiline sahip olduğunu göstermektedir.

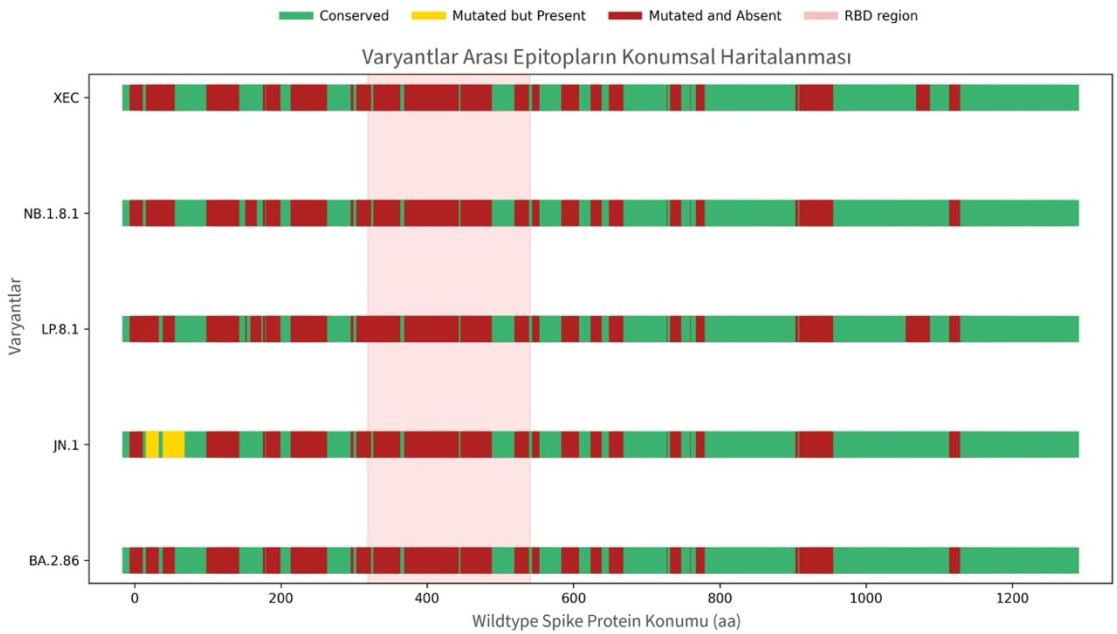
Genomik tarama analizi sonucunda, Spike-spesifik T hücre epitoplarının varyantlara özgü mutasyonlardan etkilendiği görülmüştür (Şekil 4.12B). Her bir varyantın, kendine özgü mutasyonları aracılığıyla, wild-type epitoplarının yaklaşık yarısını etkilediği belirlenmiştir. BA.2.86 ve JN.1 varyantlarında 237 epitop mutasyondan etkilenirken, LP.8.1'de bu sayı 260, NB.1.8.1'de 242 ve XEC'de 245 olarak bulundu. Mutasyona uğramayan korunmuş epitop sayıları ise 264 (LP.8.1) ile 287 (BA.2.86 ve JN.1) arasında değiştiği görüldü. Bu sonuçlar, Omicron varyantlarının mutasyonlarının geniş bir epitop kümesini etkilediğini, ancak aynı zamanda bir o kadar epitop setinin de korunduğunu ortaya koymaktadır.

Epitopların Spike proteini üzerindeki konumsal dağılımı incelenmiştir (Şekil 4.13). Yapılan pozisyonel haritalama analizinde, korunmuş epitoplar yeşil, mutasyona uğramış ancak deneysel olarak hâlâ mevcut olan epitoplar sarı, mutasyona uğrayıp kaybolan epitoplar ise kırmızı ile işaretlenmiştir. Grafikler varyantlar arasında benzer bir dağılım gösterirken, reseptör bağlanma bölgesi (RBD; 319–541 aa) özellikle yüksek oranda mutasyon içeren epitoplara ev sahipliği yapmıştır. Bu bölgede hem korunmuş hem de kaybolmuş epitopların yoğun olduğu görülmektedir. Bu durum, RBD bölgesinde artan mutasyonel değişimlerin epitop bütünlüğünü olumsuz yönde etkilediğini ve immün tanınmadan kaçış olasılığını artırabileceğini gösterir. Özellikle JN.1 varyantında sarı renkle temsil edilen, yani mutasyona uğramış ancak varlığını sürdüren epitopların görülmesi, bağışıklık tanınmasında devam eden potansiyeli işaret etmektedir. Bulgular, Omicron varyantlarının Spike proteini üzerindeki $CD4^+$ T hücre epitoplarının önemli bir

bölümünü mutasyonla değiştirse de tüm varyantlarda korunmuş epitopların da varlığını sürdürdüğünü göstermektedir. Varyantların bağışıklıktan tamamen kaçamadığını, belirli immünodominant epitopların varyantlar arası korunduğu grafikte göstetrilmiştir.

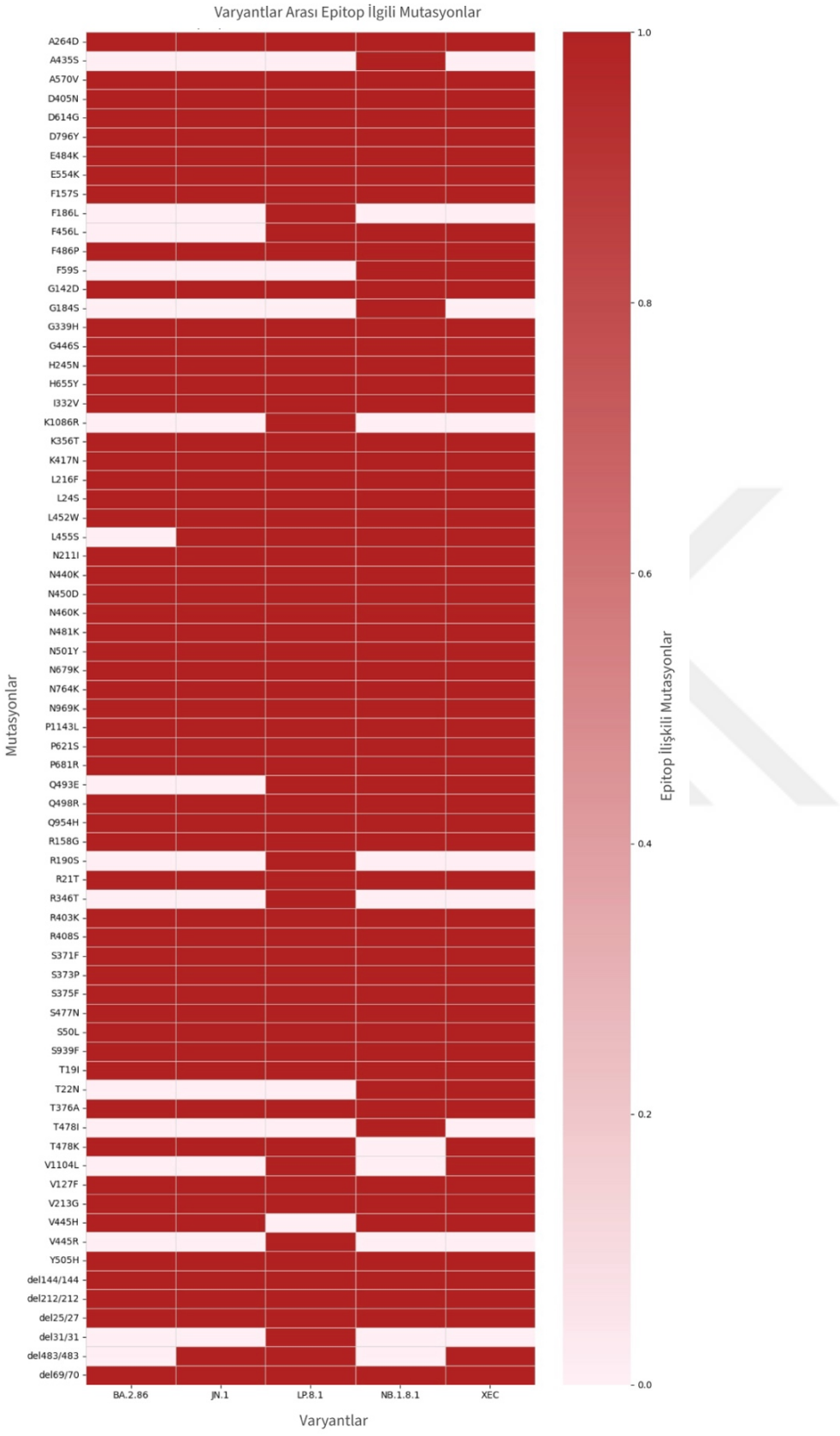


Şekil 4.12: SARS-CoV-2 Omicron varyantlarına özgü mutasyonların Wild-type Spike proteininde tanımlanmış $CD4^+$ T hücre epitopları üzerindeki etkileri



Şekil 4.13: Varyantlar arası epitopların konumsal haritalanması

SARS-CoV-2 Spike proteininde yer alan epitopların farklı Omicron alt varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasında konumsal olarak karşılaştırmalı dağılımını göstermektedir. Grafik yatay eksende Spike proteinin amino asit uzunluğunu (1–1273 aa), dikey eksende ise analiz edilen varyantları göstermektedir. Renk kodlaması, epitopların korunma veya mutasyon durumlarını temsil etmektedir. Yeşil bölgeler korunan epitopları (conserved), sarı bölgeler mutasyona uğramış ancak halen var olan epitopları (mutated but present), kırmızı bölgeler ise mutasyona uğrayarak kaybolan epitopları (mutated and absent) göstermektedir. Ayrıca, Spike proteinin reseptör bağlanma bölgesi (RBD; 319–541 aa aralığı) kırmızı ile vurgulanarak, epitopların bu fonksiyonel bölge içindeki durumları ön plana çıkarılmıştır. Şekilde, tüm varyantlarda Spike proteininin büyük kısmında epitopların korunduğu (yeşil alanlar) görülmektedir. RBD bölgesi boyunca kırmızı ile gösterilen kaybolmuş epitopların yoğunlaştığı görülmektedir.



Şekil 4.14: SARS-CoV-2 varyantları arasında epitop ilişkili Spike mutasyonlarının grafiği

SARS-CoV-2 Spike proteininde yer alan ve $CD4^+$ T hücre epitop bölgeleriyle ilişkili mutasyonların, beş farklı Omicron alt varyantı (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasında karşılaştırmalı olarak dağılımını göstermektedir (Şekil 4.14). Y ekseninde Spike proteininde tanımlanan varyant karakteristik mutasyonlar, X ekseninde ise incelenen varyantlar yer almaktadır. Her hücre, ilgili mutasyonun belirli bir varyantta epitoplarla ilişkili olarak gözlenme oranını temsil etmektedir. Renk skalası beyazdan koyu kırmızıya doğru artan bir yoğunluk göstermekte olup, beyaz renk epitop ilişkisi saptanmamış mutasyonları, koyu kırmızı renk ise yüksek oranda epitoopla ilişkili mutasyonları ifade etmektedir. Bu şekil, varyantlar arası epitop ilişkili mutasyonların kapsamlı bir karşılaştırmasını sunarak, Spike proteininin immün tanınma açısından değişen bölgelerini görsel olarak öne çıkarmaktadır. Böylece, varyantlar arasında epitop düzeyinde bağışıklık kaçışına katkıda bulunabilecek mutasyonların hangi konumlarda yoğunlaştığı sistematik olarak değerlendirilebilmektedir.

Analiz kapsamında, beş farklı Omicron alt varyantı (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasında Spike proteinindeki epitop ilişkili mutasyonların karşılaştırmalı dağılımı değerlendirilmiştir (Şekil 4.14). Elde edilen sonuçlar, varyantlar arasında hem yüksek oranda korunan ortak mutasyonların hem de belirli varyantlara özgü mutasyonel değişimlerin bulunduğunu ortaya koymuştur. Özellikle D614G, N501Y, P681R, T376A, H655Y ve R403K gibi mutasyonların tüm varyantlarda epitop bölgelerinde korunduğu görülmüştür. Buna karşın, Q493E, F456L, L455S, K1086R, T22N ve V1104L gibi mutasyonların yalnızca belirli varyantlarda gözlendiği ve epitop bölgeleriyle sınırlı bir ilişki gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle JN.1 ve türev varyantlarda (örneğin LP.8.1 ve XEC) ortaya çıkan yeni mutasyonların, epitoplarla ilişkili bölgelerde daha yoğun şekilde yer aldığı saptanmıştır. Heatmap grafiğinde gözlenen mutasyonel desenler, epitop bölgelerinin büyük oranda korunduğunu, ancak bazı varyantlara özgü değişikliklerin epitop bütünlüğünü kısmen bozduğunu göstermektedir.

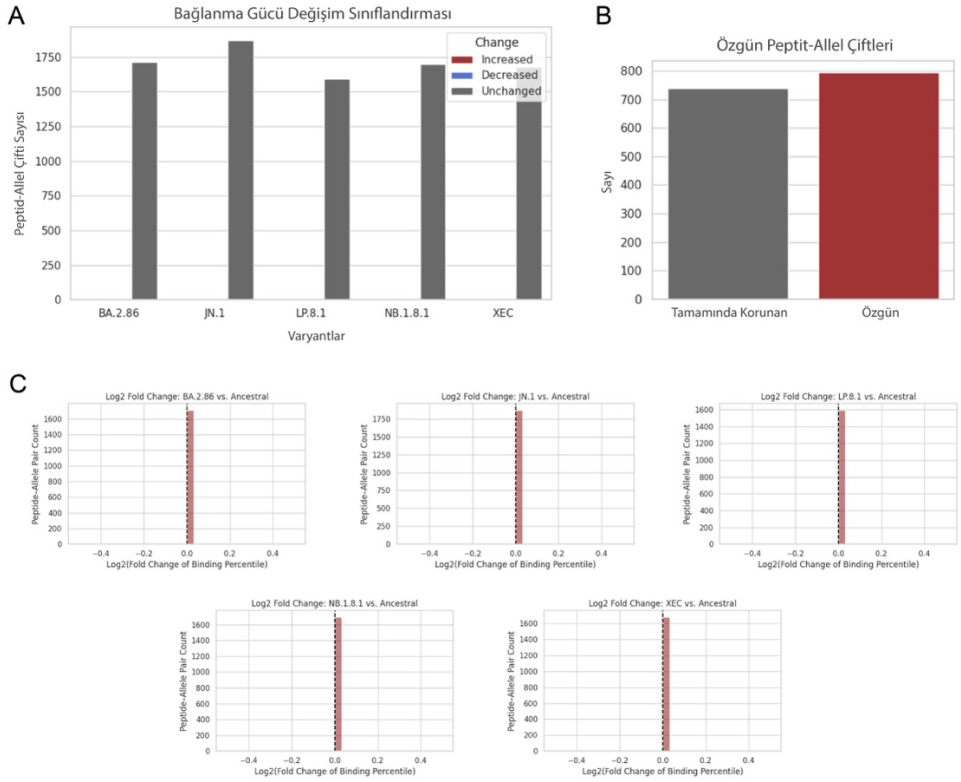
4.6. OMİCRON ALT VARYANTLARINA AİT İMMÜNOJENİK VE İMMÜNODOMİNANT EPİTOPLARIN HLA SINIF II BAĞLANMA ANALİZİ

Wild-type (Ancestral) Spike proteini ile çalışmaya dahil edilen varyantlar (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) arasındaki immünojenik profil farkları, peptit-HLA bağlanma dinamikleri üzerinden detaylıca incelenmiştir (Şekil 4.15). Homolog peptit-HLA allel çiftleri arasındaki bağlanma afinitesi değişimleri NetMHCIIpan EL 4.1

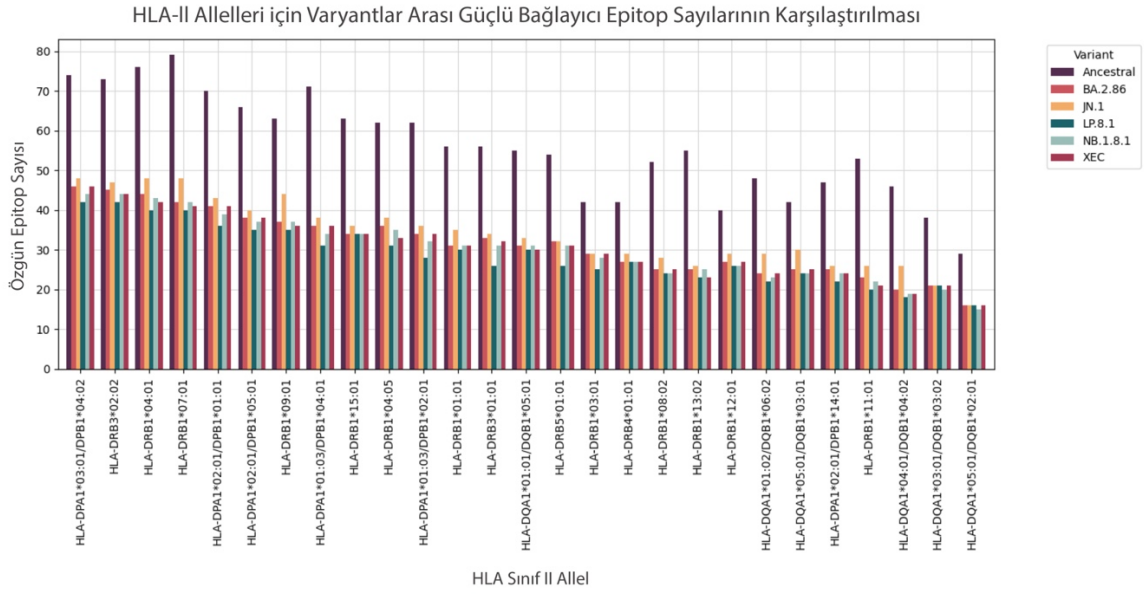
algoritması ile değerlendirildiğinde, güçlü bağlayıcı (strong binder) özelliğine sahip epitopların büyük çoğunluğunun varyant dizilerinde de kararlılığını koruduğu ve bağlanma gücünde anlamlı bir değişim sergilemediği ("unchanged") belirlenmiştir (Şekil 4.15A).

Bu kararlılık, varyant bazlı $\log_2$ kat değişim (fold change) analizleriyle de doğrulanmıştır. Her bir varyant için (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) wild-type spike proteinine kıyasla $\log_2$ kat değişim (fold change) dağılımları gösterilmektedir. Her grafikte x ekseni bağlanma yüzdesindeki $\log_2$ kat değişimini, y ekseni ise ilgili peptit–allel çiftlerinin sayısını ifade etmektedir. Dağılımın merkezde yoğunlaşması (0 noktasında) varyantlardaki epitop–HLA bağlanma gücünün genel olarak korunmuş olduğunu, uç değerlerin azlığı ise bağlanma gücünde önemli farklılıkların sınırlı sayıda çiftle sınırlı kaldığını göstermektedir. Şekil 4.15C'de sunulan dağılım grafiklerinde, verilerin bağlanma farkının bulunmadığını ifade eden "0" noktası çevresinde yoğunlaştığı görülmektedir. Uç değerlerin azlığı, varyantların geçirdiği mutasyonlara rağmen, mevcut T hücresi epitoplarının HLA allellerine bağlanma kapasitesinin genel hatlarıyla korunduğunu göstermektedir.

Bağlanma gücündeki bu korunumun yanı sıra, mutasyonların epitop çeşitliliğine etkisi incelendiğinde (Şekil 4.15B), varyantların dinamik bir epitop repertuvarına sahip olduğu saptanmıştır. Tespit edilen epitop-HLA çiftleri "tamamında korunan" (Wild type ile ortak) ve "özgün" (varyanta spesifik) olarak sınıflandırıldığında; varyantlara özgü yeni epitop çiftlerinin sayısının, korunan çiftlerle niceliksel olarak benzer düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, varyantlarda meydana gelen mutasyonların sadece mevcut epitopları modifiye etmekle kalmayıp, aynı zamanda immün tanımanın gerçekleşebileceği yeni epitop kombinasyonlarının oluşumuna da zemin hazırladığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.15: Wild-type Spike proteini ile varyant Spike proteinleri arasında bağlanma gücü değişimlerinin analizi



Şekil 4.16: Farklı SARS-CoV-2 varyantlarının belirli HLA sınıf II allelleri tarafından sunulan güçlü bağlayıcı epitop sayılarının karşılaştırılması

Grafik (Şekil 4.16), analize dahil edilen her bir HLA Sınıf II alleli (X ekseni) için, Ancestral ve diğer beş varyantın sunduğu özgün güçlü bağlayıcı (≤10 persentil) epitopların sayısını (Y ekseni) karşılaştırmaktadır. Her bir HLA alleli için gösterilen sütun grubu, farklı varyantların o allel üzerindeki epitop sunum kapasitesini doğrudan karşılaştırma imkanı sunmaktadır. Grafikteki alleller, Ancestral suşunda sundukları epitop sayısına göre büyükten küçüğe doğru sıralanmıştır.

SARS-CoV-2'nin evrimsel sürecinin T hücresi bağışıklığı üzerindeki etkilerini aydınlatmak amacıyla, virüsün Ancestral suşu ile beş farklı varyantının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) $CD4^+$ T hücresi epitop profilleri detaylı bir şekilde incelenmiştir (Şekil 4.16). Bu analiz, her bir varyant için NetMHCIIpan algoritmasıyla tahmin edilen ve güçlü bağlayıcı olarak kabul edilen (≤10 yüzdelik skoru) epitop–HLA Sınıf II çifti verileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu bölümündeki temel amaç, varyantların evrimiyle birlikte epitop sunumunda meydana gelen nicel ve nitel değişiklikleri ortaya koymaktır. Bu kapsamda, yeni varyantların Ancestral suşuna kıyasla T hücrelerine daha fazla mı yoksa daha az mı potansiyel hedef (epitop) sunduğu araştırılmıştır. Aynı zamanda, en çok epitop sunarak bağışıklık yanıtında kilit rol oynayan HLA allellerinin hiyerarşisinin (immünodominans) varyantlar arasında değişip değişmediği analiz edilmiştir. Bu doğrultuda, varyantların epitop sunum kapasiteleri ve allel hiyerarşileri hem birbirleriyle hem de başlangıç noktası olan Ancestral suşuyla karşılaştırılmıştır.

SARS-CoV-2 varyantlarının HLA Sınıf II molekülleri tarafından sunulan güçlü bağlayıcı epitop profilleri, Ancestral suşuna kıyasla önemli farklılıklar göstermektedir. Yapılan analizde, incelenen HLA allellerinin büyük çoğunluğunda, Ancestral suşunun sonraki varyantlara göre anlamlı derecede daha fazla sayıda özgün epitop sunduğu görülmüştür (Şekil 4.16). Popülasyonda yaygın olan HLA-DRB3*02:02 ve HLA-DRB1*04:01 gibi alleller için Ancestral suşunda 75'in üzerinde epitop sunulurken, BA.2.86, JN.1 ve diğer varyantlarda bu sayının 40-50 bandına gerilediği gözlemlenmiştir. Bu "epitop kaybı" bulgusu, SARS-CoV-2'nin evrimsel süreçte, konakçının T hücresi bağışıklık yanıtından kaçmaya yönelik bir mekanizma geliştirmiş olabileceğine işaret eder. Varyantlar kendi aralarında değerlendirildiğinde, özellikle BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC'nin sunduğu epitop sayılarının birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. Bu durum, bu varyantların epitop sunum profilleri açısından Ancestral

suşundan ortak bir şekilde farklılaştığını, ancak birbirleriyle benzer bir epitop manzarasına sahip olduklarını düşündürmektedir.

SARS-CoV-2'nin Ancestral, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının her biri için, güçlü bağlayıcı (≤10 persentil) epitopların HLA Sınıf II allelleri arasındaki dağılımı ayrı ayrı incelenmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Her bir panelde, HLA allelleri (X ekseni) o varyant için sundukları özgün epitop sayısına (Y ekseni) göre büyükten küçüğe doğru sıralanmıştır. Bu görselleştirme, her bir varyantın kendi içindeki immünodominans hiyerarşisini ve bu hiyerarşinin varyantlar arasında nasıl değiştiğini ortaya koymaktadır. Bu analiz, varyantların epitop sunum durumlarındaki temel değişiklikleri ortaya koymaktadır. Grafikler, bir önceki analizde (Şekil 4.16) gözlemlenen "epitop kaybı" olgusunu doğrulamaktadır. Ancestral suşunun epitop sunum kapasitesi (Y ekseni ~75'e kadar) ile BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının kapasiteleri (Y ekseni ~45'e kadar) arasında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir (Şekil 4.17). Bu analiz, varyantlar arasında immünodominans hiyerarşisinde, yani en çok epitop sunan allellerin sıralamasında, değişiklikler olduğunu göstermektedir. Ancestral suşunda en baskın allel HLA-DRB1*07:01 iken, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarında HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 alleli en baskın alleldir. İmmünodominans hiyerarşisindeki bu değişim, virüsün evrimsel bir adaptasyonla, popülasyonda yaygın olan ve önceki suşlara karşı etkili olan belirli HLA allellerinin sunduğu hedeflerden kaçınarak bağışıklık baskısından kurtulmaya çalıştığının bir göstergesi olabilir. Ayrıca, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının epitop dağılım profilleri ve allel sıralamaları birbirine büyük ölçüde benzemektedir. Bu durum, bu iki varyantın T hücresi tarafından tanınma mekanizmaları açısından benzer özellikler taşıdığını gösterebilir. Analizin devamında, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının epitop sunum profilleri ayrı ayrı incelenmiştir. Şekil 4.18'de gösterilen sonuçlarda, her üç varyantta da (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) en fazla sayıda güçlü bağlayıcı epitop sunan allellerin başında HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02, HLA-DRB3*02:02 ve HLA-DRB1*04:01 gelmektedir. Bu allel hiyerarşisi, bir önceki analizde incelenen BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının profilleriyle neredeyse tamamen aynıdır. Bu durum, Ancestral suşunda baskın olan HLA-DRB1*07:01 allelinin yerini, sonraki tüm varyantlarda HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 ve diğer birkaç allelin aldığı fikrini güçlendirmektedir. Virüsün evrimiyle birlikte, T hücreleri tarafından tanınma için önemli olan HLA allelleri setinde istikrarlı bir değişiklik meydana gelmiştir. Sonuç olarak, incelenen beş varyantın (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) tamamı, hem toplam epitop sayısında bir azalma

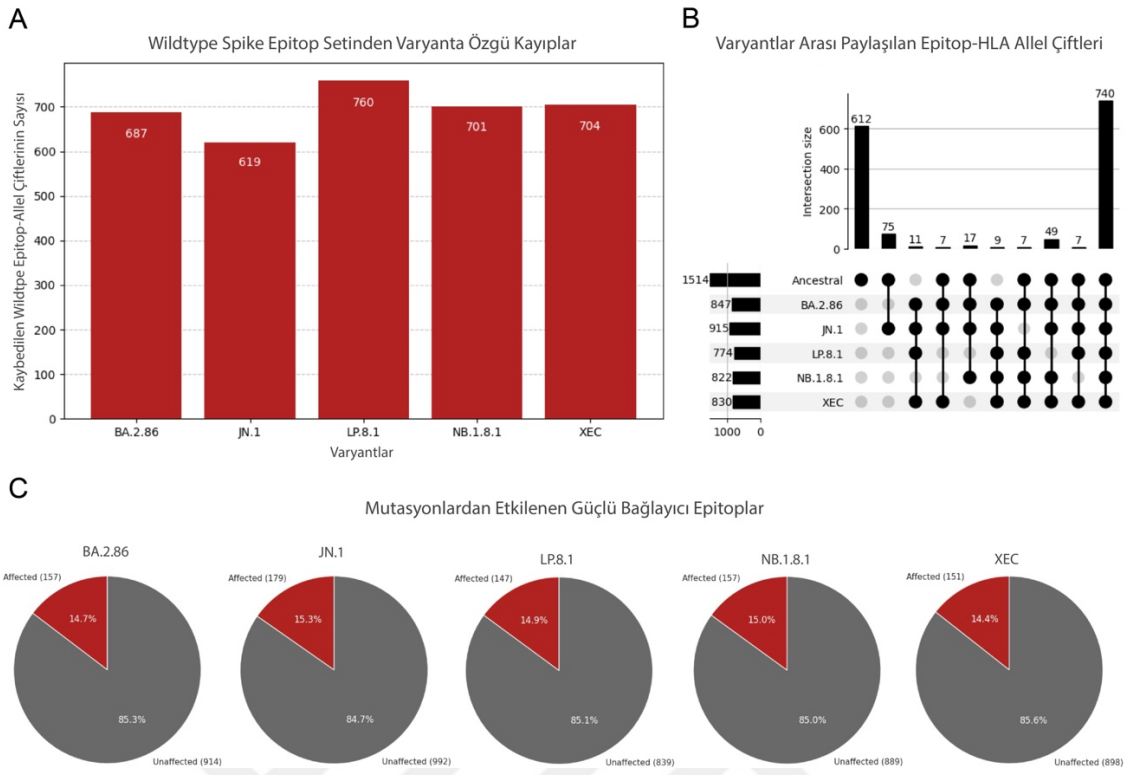
göstermekte hem de Ancestral suşundan farklılaşan, ancak kendi içlerinde oldukça tutarlı olan yeni bir immünodominans hiyerarşisine sahip bulunmaktadır. Bu, varyantların ortak bağışıklıktan kaçış stratejileri geliştirdiğini göstermektedir.



Şekil 4.17: SARS-CoV-2'nin Ancestral, BA.2.86 ve JN.1 varyantları için güçlü bağlayıcı epitopların HLA sınıf II allelleri arasındaki dağılım hiyerarşisi



Şekil 4.18: SARS-CoV-2'nin LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantları için güçlü bağlayıcı epitopların HLA sınıf II allelleri arasındaki dağılım hiyerarşisi



Şekil 4.19: Tanımlanan güçlü bağlayıcı CD4^{+} T hücre epitop-HLA sınıf II çiftlerinin, belirli Omicron varyantlarındaki varlığı ve epitopların varyant belirleyici mutasyonlardan etkilenme durumu

Şekilde, (A) SARS-CoV-2 Omicron varyantlarında ata spike glikoproteinine özgü CD4^{+} T hücre epitop-HLA çifti kayıplarının karşılaştırmalı analizi gerçekleştirilmiştir. Grafikteki her bir sütun, belirtilen Omicron varyantının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) Wild-type referans setinde bulunan ancak ilgili varyantta artık bulunmayan (kaybedilen) epitop-HLA çiftlerinin toplam sayısını göstermektedir. Y ekseni, kaybedilen bu çiftlerin kümülatif sayısını ifade etmektedir. 760 epitop-HLA çifti kaybı ile LP.8.1 varyantı en yüksek kaybı gösterirken, 619 çift kaybı ile JN.1 varyantı bu sette en düşük kaybı sergilemektedir. (B) Wild type ve beş Omicron alt varyant arasındaki güçlü bağlayıcı peptide–HLA çiftlerinin kesişim analizi UpSet grafiği ile gösterilmiştir. Soldaki yatay çubuklar her bir varyantın tespit edilen toplam peptide–HLA çiftlerini göstermektedir; üstteki dikey çubuklar ise matris altında siyah noktalarla belirtilen varyant kombinasyonlarındaki (kesişimdeki) peptide–HLA çiftlerinin sayısını verir. Dolu siyah nokta bir varyantta ilgili peptide–HLA çiftinin mevcut olduğunu, gri nokta ise o varyantta bulunmadığını gösterir. Grafiğe göre Wild-type proteini 1.514 çift epitope

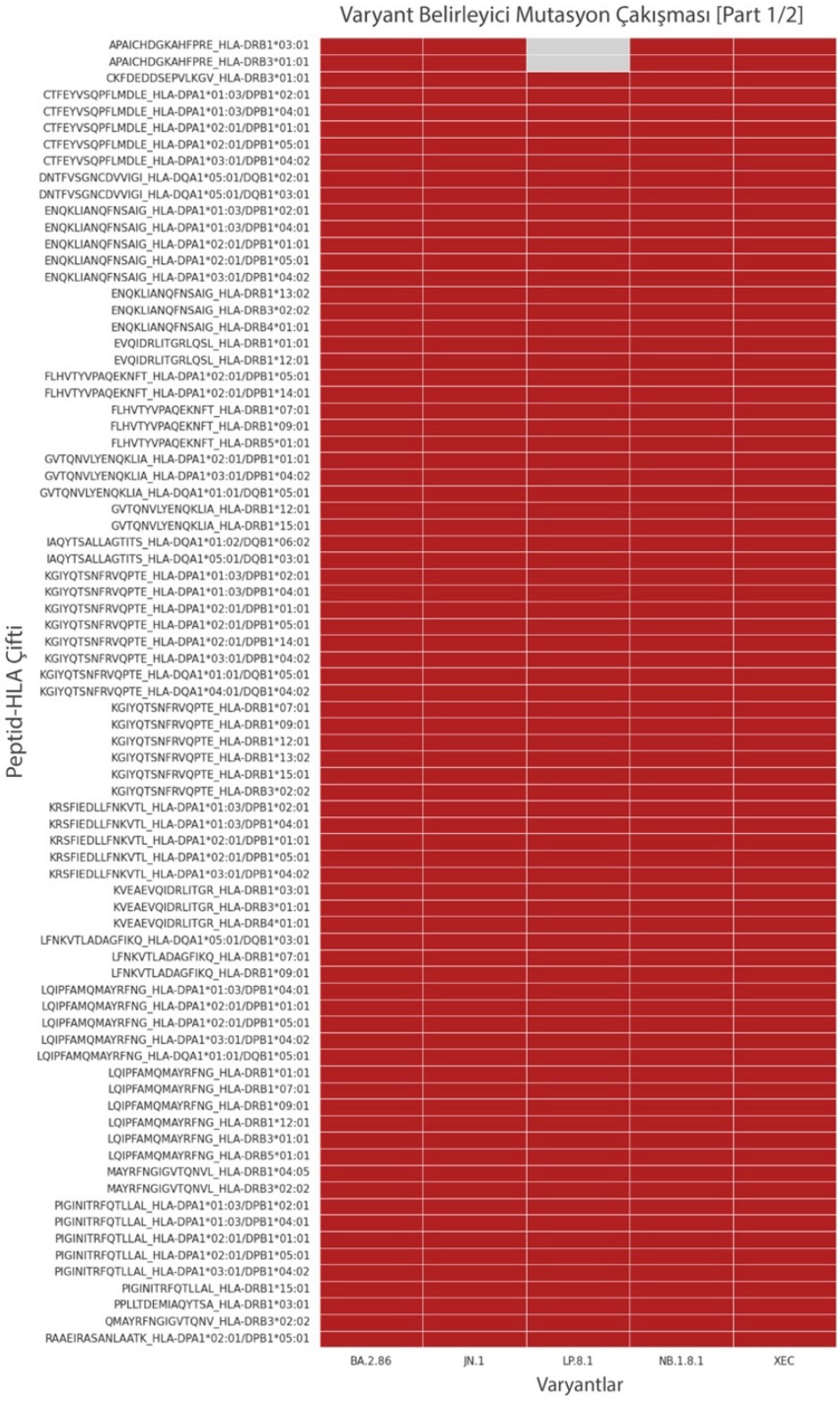
setine sahiptir; Omicron alt varyantları daha az sayıda güçlü bağlayıcı çift göstermektedir (JN.1: 915; BA.2.86: 847; NB.1.8.1: 822; XEC: 830; LP.8.1: 774). Sağdaki en büyük dikey çubuk (n = 740) tüm veri setlerinde korunmuş peptide–HLA çiftlerini, soldaki en büyük dikey çubuk (n = 612) ise yalnızca Wild type'a özgü ve tüm Omicron alt varyantlarında kaybedilmiş peptide–HLA çiftlerini göstermektedir. Aradaki diğer kesişim setleri, varyantların alt grupları arasında paylaşılan kısmi epitop korunmalarını göstermektedir. (C) SARS-CoV-2 Spike proteinine ait güçlü bağlayıcı epitopların varyantlara özgü mutasyonlardan etkilenme oranları pasta grafiği ile görselleştirilmiştir. Her bir pasta grafik, ilgili varyantta (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) tanımlanan güçlü bağlayıcı epitopların mutasyonlarla çakışma durumuna göre dağılımını göstermektedir. "Affected" olarak işaretlenen kırmızı dilimler, varyantın kendine özgü amino asit değişimlerinin epitope dizisi aralığına denk geldiği epitop–HLA allel çiftlerini; "Unaffected" olarak gösterilen gri dilimler ise mutasyondan etkilenmeyen epitopları temsil etmektedir. Analiz sonuçlarına göre, tüm varyantlarda güçlü bağlayıcı epitopların yaklaşık %14–15'inin mutasyonlardan etkilendiği, geri kalan büyük çoğunluğunun (%85 civarı) korunmuş olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, SARS-CoV-2'nin Wild type suşuna kıyasla güncel Omicron varyantlarının (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) Spike glikoproteini üzerindeki potansiyel CD4+ T hücre epitop repertuvarında meydana gelen değişimler incelenmiştir. NetMHCIIpan EL 4.1 ile HLA sınıf II moleküllerine güçlü bağlanma potansiyeli gösteren (yüzdelik bağlanma değeri ≤10) peptid-HLA çiftleri belirlenmiş ve bu çiftlerin varyantlar arasındaki evrimi analiz edilmiştir. Omicron varyantlarının Wild type suşunda bulunan epitop setini ne ölçüde kaybettiği kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan analiz, incelenen tüm Omicron varyantlarının, Wild type suşuna kıyasla $CD4^+$ T hücre epitop-HLA çifti repertuvarında önemli kayıplar sergilediğini ortaya koymuştur (Şekil 4.19A). Bu bağlamda, Wild-type Spike proteininde mevcut olup LP.8.1 varyantında bulunmayan epitop-HLA çifti sayısı 760 olarak tespit edilmiş ve bu değer, incelenen varyantlar arasındaki en yüksek kayıp olarak kaydedilmiştir. Diğer varyantlardaki kayıplar ise BA.2.86 için 687, NB.1.8.1 için 701 ve XEC için 704 olarak hesaplanmıştır. Bu grupta en düşük epitop kaybı ise 619 çift ile JN.1 varyantında gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Omicron soyunun evrimsel süreci boyunca Ata suşuna özgü T hücre hedeflerinin belirgin bir şekilde azaldığını göstermektedir.

Epitop kayıplarının yanı sıra, varyantlar arasındaki korunma ve paylaşım dinamiklerini daha ayrıntılı incelemek amacıyla bir kesişim analizi yapılmıştır (Şekil 4.19B). UpSet grafiği ile görselleştirilen sonuçlar, 1.514 adet güçlü bağlayıcı epitop-HLA çifti içeren Ata suşunun en zengin repertuvara sahip olduğunu göstermektedir. Omicron varyantlarının epitop setleri ise 774 (LP.8.1) ile 915 (JN.1) arasında değişmektedir. 740 adet epitop-HLA çifti hem Ata suşunda hem de incelenen beş Omicron varyantının tamamında korunmuştur. Bu set, virüsün varyantlaşma sürecinden etkilenmeyen çekirdek bir T hücresi epitop havuzunu temsil etmektedir. Diğer yandan, 612 adet epitop-HLA çiftinin yalnızca Ata suşuna özgü olduğu ve incelenen tüm Omicron varyantlarında ortak olarak kaybedildiği saptanmıştır.

Varyantlarda meydana gelen bu değişimlerin, geriye kalan epitopların yapısal bütünlüğünü ne ölçüde etkilediği de ayrıca incelenmiştir. Her bir Omicron varyantında tanımlanan güçlü bağlayıcı epitopların, o varyanta özgü amino asit mutasyonları ile çakışma durumu analiz edilmiştir (Şekil 4.19C). Varyantların her birinde bulunan güçlü bağlayıcı epitopların büyük bir çoğunluğunun (%84,7 ila %85,6) mutasyon bölgelerinden etkilenmediği ("Unaffected") görülmüştür. Varyanta özgü mutasyonların doğrudan epitop dizisi üzerine denk geldiği "Affected" epitop-HLA çiftlerinin oranı ise %14,3 ila %15,3 gibi bir aralıkta kalmıştır. Bu bulgu, Omicron varyantlarının T hücre epitop repertuvarında niceliksel bir azalma yaşansa da, her varyantın kendi içinde barındırdığı epitopların büyük bir kısmının yapısal olarak korunduğunu ve potansiyel immünolojik fonksiyonlarını sürdürebileceğini düşündürmektedir.

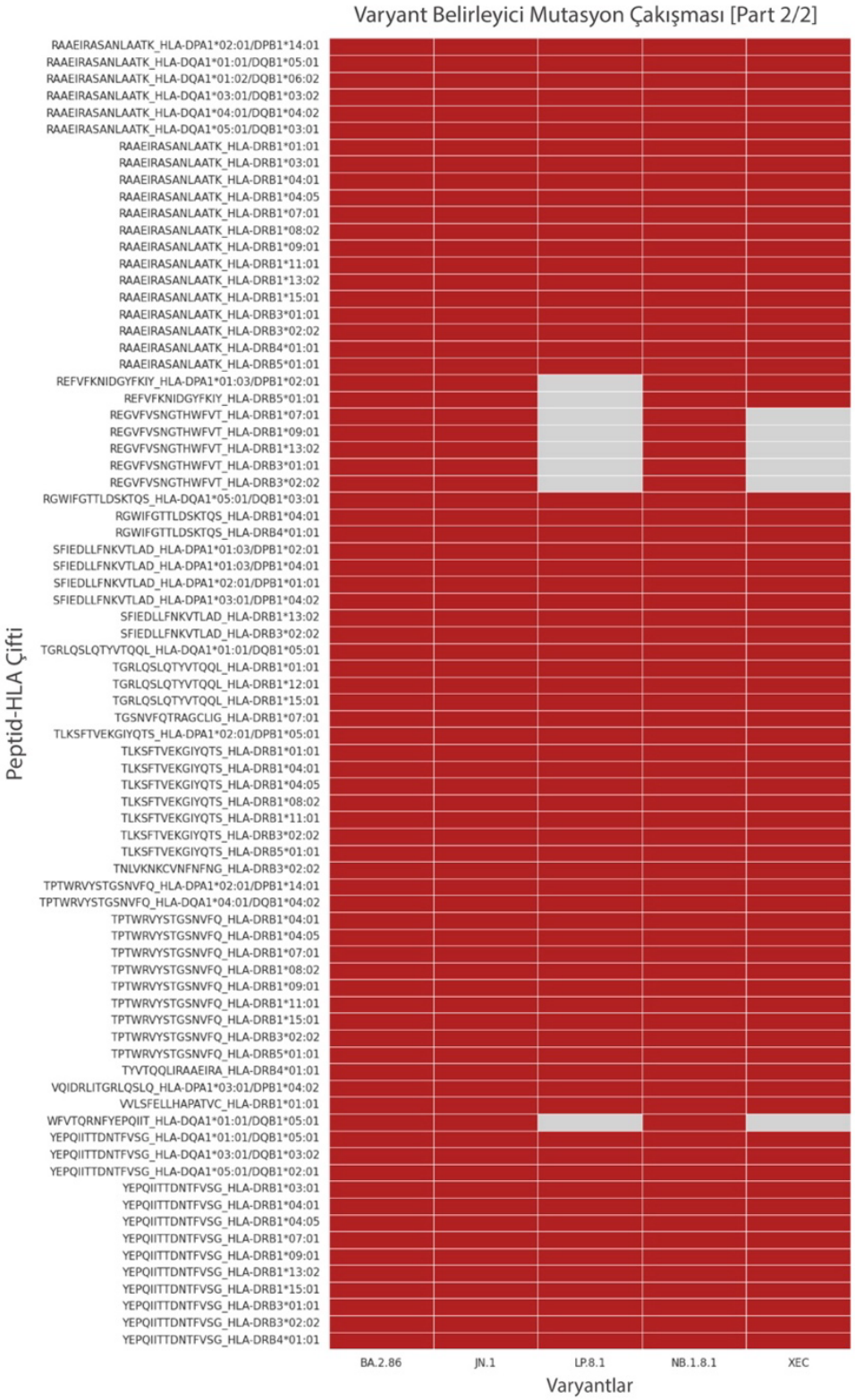
Varyant belirleyici mutasyonların güçlü bağlayıcı epitop–HLA çiftleri ile çakışma durumu, her bir peptit–HLA çiftinin farklı SARS-CoV-2 varyantları (BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) açısından karşılaştırılmasıyla heatmap biçiminde görselleştirilmiştir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Görselleştirme açısından grafiğe, en az bir mutasyondan etkilenen tüm epitope-HLA çiftleri dahil edilmiş, hiç etkilenmeyen çiftler grafiğe dahil edilmemiştir. Her bir satır bir peptit–HLA çiftini, her sütun ise analiz edilen varyantları temsil etmektedir.



Şekil 4.20: Varyant belirleyici mutasyonların güçlü bağlayıcı peptit–HLA çiftleri ile çakışma matrisi (Part 1/2)

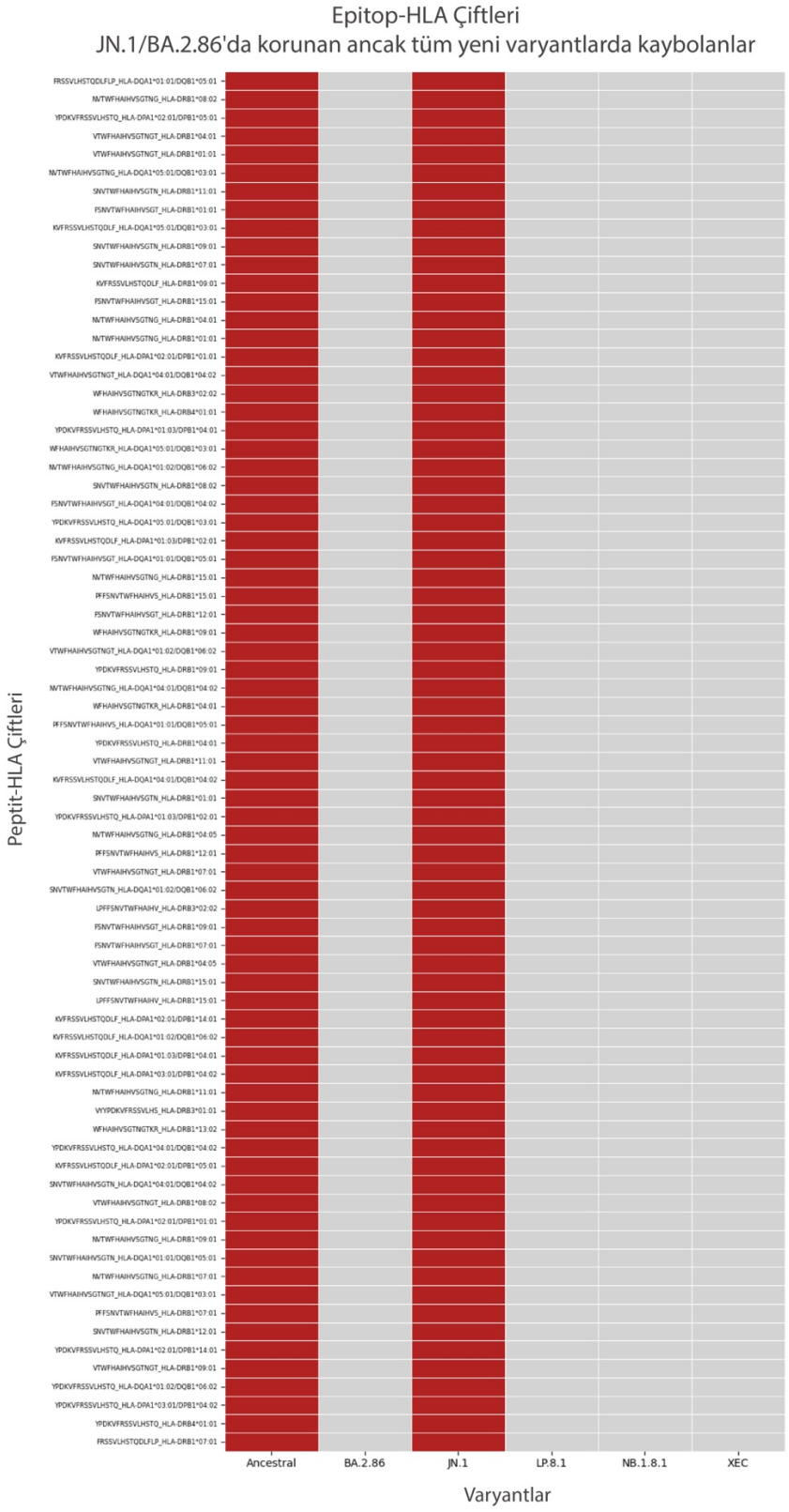
NetMHCIIpan EL 4.1 tahminleri kullanılarak elde edilen ve güçlü bağlayıcı olarak sınıflandırılan (NetMHCIIpan EL yüzde değeri ≤ 10) spike proteini peptit–HLA allel çiftleri için variant belirleyici mutasyonların epitope dizileriyle örtüşme (overlap) durumu analiz edilmiştir. Her bir satır benzersiz bir peptide–HLA çiftini (peptit dizisi + allel) temsil ederken, sütunlar incelenen varyantları (soldan sağa: BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) göstermektedir. Her hücre, ilgili peptit–HLA çiftinin o varyantta en az bir varyant-belirleyici amino asit değişimi ile çakışıp çakışmadığını belirtir; çakışma var ise değer 1 (kırmızı), çakışma yok ise değer 0 (açık gri) olarak gösterilmiştir. Heatmap, her bir peptit–HLA çiftinin farklı varyantlara karşı durumunu tek bir bakışta gösterir: tek bir sütunda kırmızı hücreye sahip satırlar o peptidin yalnızca ilgili varyantta mutasyonla çakıştığını; birden fazla sütunda kırmızı hücreler bulunan satırlar ise aynı peptidin birden fazla varyantta mutasyonlarla örtüştüğünü gösterir. Görselde gözlenen örüntüler, bazı peptit–HLA çiftlerinin bir veya birkaç varyantta tekrarlayan şekilde mutasyonla çakıştığını; buna karşın bazı çiftlerin ise birçok varyantta korunmuş kaldığını göstermektedir.

Kırmızı hücreler, ilgili peptit dizisinin varyant-belirleyici mutasyonlarla çakıştığını; gri hücreler ise mutasyondan etkilenmediğini göstermektedir (Şekil 4.20 ve Şekil 4.21). Elde edilen sonuçlar, güçlü bağlayıcı epitopların büyük çoğunluğunun mutasyonlardan etkilenmeden korunduğunu, buna karşın belirli peptit–HLA çiftlerinin birden fazla varyantta tekrar eden biçimde mutasyon bölgeleriyle çakıştığını göstermektedir. Bu sonuçlar, varyantlar arasında güçlü bağlayıcı epitopların yaklaşık %85'inin mutasyonlardan etkilenmeden kaldığını (Şekil 4.19C), mutasyon çakışmalarının ise belirli epitope kümelerinde yoğunlaştığını göstermektedir. Bu sonuç, yeni varyantların oluşumu sırasında T hücre epitoplarının büyük bir kısmının korunduğunu, ancak bazı kritik bölgelerde yinelenen mutasyon örüntülerinin T hücre tanınmasını azaltma potansiyeline sahip olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.21: Varyant belirleyici mutasyonların güçlü bağlayıcı peptit–HLA çiftleri ile çakışma matrisi (Part 2/2)

Araştırma kapsamında, SARS-CoV-2'nin evrimsel sürecinde CD4+ T hücresi tanınırlığından kaçış dinamiklerini anlamak ve CD4+ T-hücresi bağışıklığından kaçışta meydana gelen kritik değişimleri saptamak amacıyla, BA.2.86 ve JN.1 gibi erken dönem Omicron varyantlarında korunan epitopların durumu incelenmiştir. Bu amaçla yapılan analiz, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının Spike epitop-HLA çiftlerini bir kümede toplayıp oluşturulan bir havuz ile diğer varyantlardaki çiftlerle bir karşılaştırma gerçekleştirmiştir. Yazılan Pyton kodu, her bir varyant için kaybedilen çiftleri sayarak ve erken varyantlarda (JN.1, BA.2.86) korunmuş olan ancak daha yeni varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) kaybolan epitopları tanımlayarak, SARS-CoV-2 Spike proteininin farklı varyantları arasında $CD4^+$ T hücresi hedefleri olarak öngörülen epitop-HLA çiftlerinin nasıl değiştiğini analiz eder ve görselleştirir. Bu analizin sonuçları, Şekil 4.22'de sunulan heatmap ile detaylandırılmıştır. Analiz, Ata suşundan itibaren BA.2.86 ve JN.1'e kadar varlığını sürdüren önemli sayıda epitop-HLA çiftinin, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının tümünde senkronize bir şekilde ortadan kalktığını ortaya koymuştur. Bu kapsamda, Wild type ve JN.1 varyantında korunan 75 epitop-HLA çifti tespit edilmiş ve heatmap ile görselleştirilmiştir.



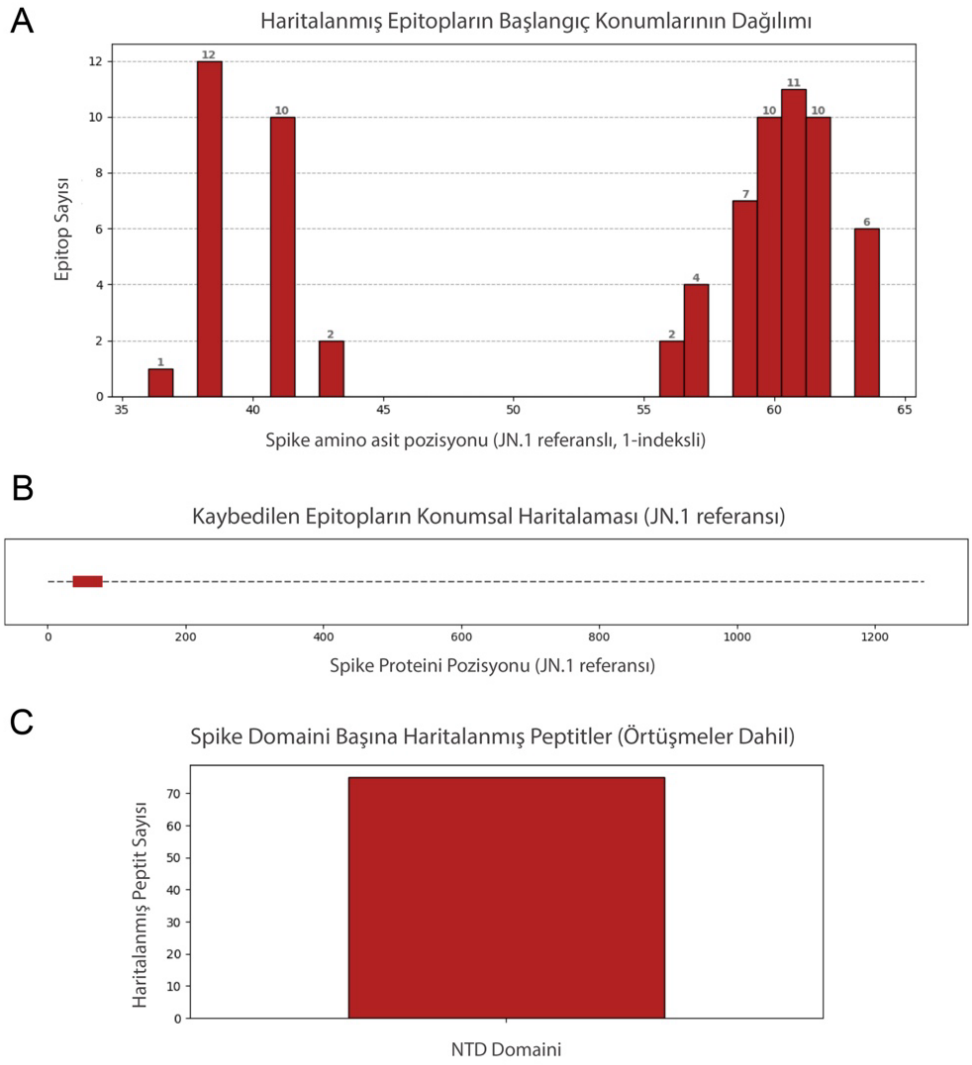
Şekil 4.22: JN.1 ve BA.2.86 varyantlarında korunan ancak daha yeni Omicron varyantlarında ortak olarak kaybedilen $CD4^+$ T hücre epitop-HLA çiftlerinin varlık-yokluk profili

Heatmap, Wild type (Ancestral), BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının Spike proteinlerinde ortak olarak bulunan, ancak LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının tümünde eş zamanlı olarak kaybedilen spesifik $CD4^+$ T hücre epitop-HLA sınıf II çiftlerinin analizini göstermektedir. Analiz, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının Spike epitop-HLA çiftlerini bir kümede toplayıp oluşturulan bir havuz ile karşılaştırma gerçekleştirmiştir. Haritanın her bir satırı, benzersiz bir peptit-HLA çiftini temsil ederken, sütunlar ilgili SARS-CoV-2 varyantlarını belirtmektedir. Hücre renkleri, ilgili varyantta epitop-HLA çiftinin varlığını (kırmızı) veya yokluğunu/kaybını (açık gri) göstermektedir. Bu çiftler, NetMHCIIpan 4.1 kullanılarak tahmin edilen ve bağlanma yüzdelik değeri ≤10 olan güçlü bağlayıcılardır.

İlk aşamada, BA.2.86 veya JN.1 varyantlarından en az birinde bulunan (iki varyantın epitop setlerinin birleşimi alınarak) ancak LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC gibi daha yeni varyantların tümünde kaybolan epitop-HLA çiftlerini belirlemeye yönelik bir analiz gerçekleştirilmiştir. Ancak, bu analizin sonucunda elde edilen ve bulgular bölümünde sunulan heatmap (Şekil 4.22), tanımlanan epitopların tamamının JN.1'de korunurken, BA.2.86 varyantında zaten mevcut olmadığını göstermiştir. Bu gözlem, BA.2.86 ve JN.1 arasında T hücresi epitop repertuvarı açısından önemli farklılıklar olduğuna işaret etmiştir. Bu nedenle, her iki varyantta da ortak olarak korunarak T hücresi tanınırlığı için stabil hedefler oluşturan, ancak virüsün daha sonraki evriminde kaybolan daha çekirdek bir epitop setini tanımlamak amacıyla ek ve daha sıkı bir analiz metodolojisi geliştirme ihtiyacı doğmuştur. Bu doğrultuda, analiz hattına alternatif kontrol olarak BA.2.86/JN.1'de korunan ancak daha yeni varyantlarda kaybolan epitoplar için yeni bir alternatif bir kontrol kodu eklenmiştir. Bu yöntemde, bir önceki analizin aksine, BA.2.86 ve JN.1 varyantlarının her ikisinde de ortak olarak bulunan epitop-HLA çiftleri (iki setin kesişimi alınarak) belirlenmiştir. Ardından, bu ortak 'çekirdek' set içerisinden, daha yeni olan LP.8.1, NB.1.8.1 veya XEC varyantlarından herhangi birinde varlığını sürdüren çiftler çıkarılmıştır. Bu rafine edilmiş yaklaşım, yalnızca tek bir erken varyantta değil, her ikisinde de stabil bir şekilde varlığını sürdürmüş, ancak virüsün daha sonraki evrimsel adımlarında ortaklaşa kaybedilmiş olan epitopları kesin olarak izole etmeyi amaçlamıştır. Bu metodoloji bölümünde gerekçesi açıklanan ve daha sıkı kriterlere dayanan alternatif kontrol analizi, BA.2.86 ve JN.1varyantlarının her ikisinde de ortak olarak korunan ve daha sonraki varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) kaybolan hiçbir epitop-HLA çifti olmadığını ortaya koymuştur. Bu bulgu, BA.2.86 ve JN.1 varyantları arasında, daha

sonraki nesillerde ortaklaşa kaybedilecek kadar stabil ve korunmuş bir 'çekirdek' CD4+ T hücre epitop repertuvarının bulunmadığını göstermektedir. Bu sonuç, bir önceki analizde (Bkz. Şekil 4.22) gözlemlenen bulguyu güçlendirmektedir: yani, daha yeni varyantlarda kaybedilen epitopların büyük ölçüde JN.1'e özgü olduğunu ve BA.2.86 ile JN.1 arasında epitop profilleri açısından önemli bir farklılaşma olduğunu teyit etmektedir. Dolayısıyla, virüsün T hücresi bağışıklığından kaçışının, BA.2.86 ve JN.1 soylarının ayrışmasından sonra, özellikle JN.1 hattı üzerinden devam eden farklı ve dinamik bir süreç olduğu anlaşılmaktadır. Bu bulgudan hareketle, analizin bir sonraki aşamasında, bu epitop kayıplarının Spike proteini üzerindeki yapısal konumlarını ve potansiyel fonksiyonel etkilerini aydınlatmak hedeflenmiştir. Bu amaçla, öncelikle Ancestral ve JN.1 varyantlarında korunmuş ancak daha yeni olan tüm varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) kaybedilmiş olan epitop-HLA çiftleri belirlenmiştir. Ardından, bu kayıp epitopların her birinin JN.1 Spike proteini referans dizisi üzerindeki başlangıç ve bitiş koordinatları saptanmıştır. Bu konumlandırma analizi, kayıpların proteinin lineer dizisi boyunca nerelerde yoğunlaştığını görselleştiren bir pozisyonel harita oluşturulmasını sağlamıştır.

Kaybolan epitopların yalnızca lineer konumlarını belirlemenin ötesinde, bu kayıpların virüsün fonksiyonelliği üzerindeki etkisini anlamak için bu konumların bilinen protein alanlarıyla (domain) ilişkilendirilmesi kritik öneme sahiptir. Bu doğrultuda, konumları belirlenen her bir kayıp peptit, Spike proteininin N-terminal alanı (NTD), reseptör bağlanma alanı (RBD), reseptör bağlanma motifi (RBM) ve S2 alt birimi gibi fonksiyonel domainleri ile haritalanmıştır (Şekil 4.23) Bu haritalama, kayıpların hangi domainlerde kümelendiğini özetleyen bir sütun grafiği ve protein dizisi boyunca dağılımını gösteren bir histogram oluşturmak için kullanılmıştır. Bu analiz, özellikle hücreye girişte kritik rol oynayan RBD gibi alanlardaki epitop kayıplarının yoğunluğunu ölçerek, T-hücresi bağışıklığından kaçışın moleküler temellerini daha detaylı bir şekilde ortaya koymayı amaçlamaktadır.

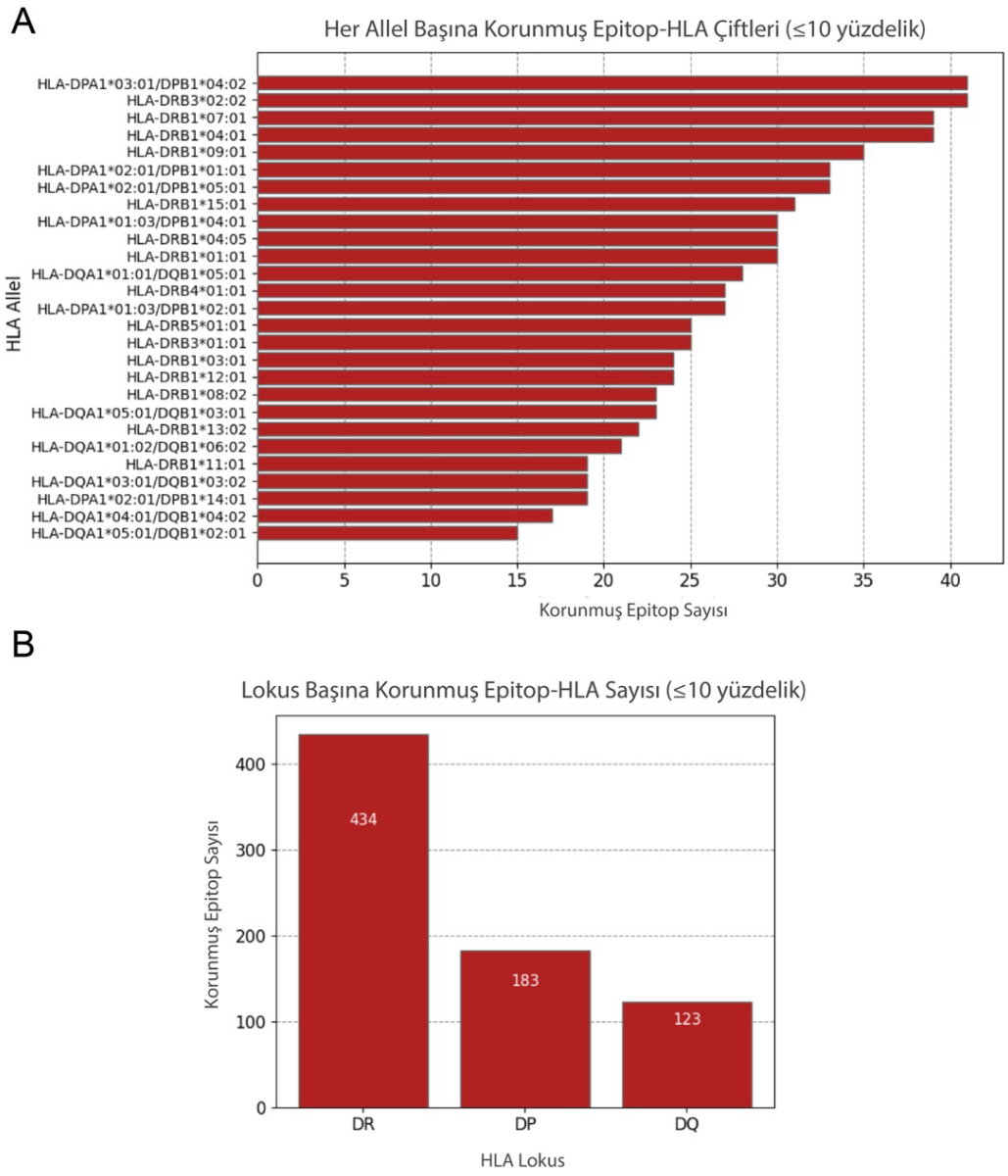


Şekil 4.23: JN.1 sonrası varyantlarda gözlemlenen $CD4^+$ T hücre epitop kayıplarının spike proteini üzerindeki konumsal dağılımı ve domain analizi

Yapılan konum analizi T hücresi bağışıklığından kaçışın moleküler temellerini daha detaylı bir şekilde ortaya koymayı amaçlamaktadır. Bu analizler neticesinde elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'te gösterilmiştir. Şekil, Ata ve JN.1 varyantlarında korunmuş ancak daha yeni Omicron varyantlarında (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) kaybedilmiş olan $CD4^+$ T hücre epitoplarının JN.1 Spike proteini referans dizisi üzerindeki analizini göstermektedir. Kaybedilen epitopların başlangıç pozisyonlarının JN.1 referans dizisi üzerindeki dağılımı incelendiğinde, kayıpların Spike proteini boyunca rastgele dağılmadığı, aksine belirli bölgelerde yoğunlaştığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.23A). Kayıp epitopların başlangıç amino asit pozisyonlarının dağılımını gösteren histogram ile,

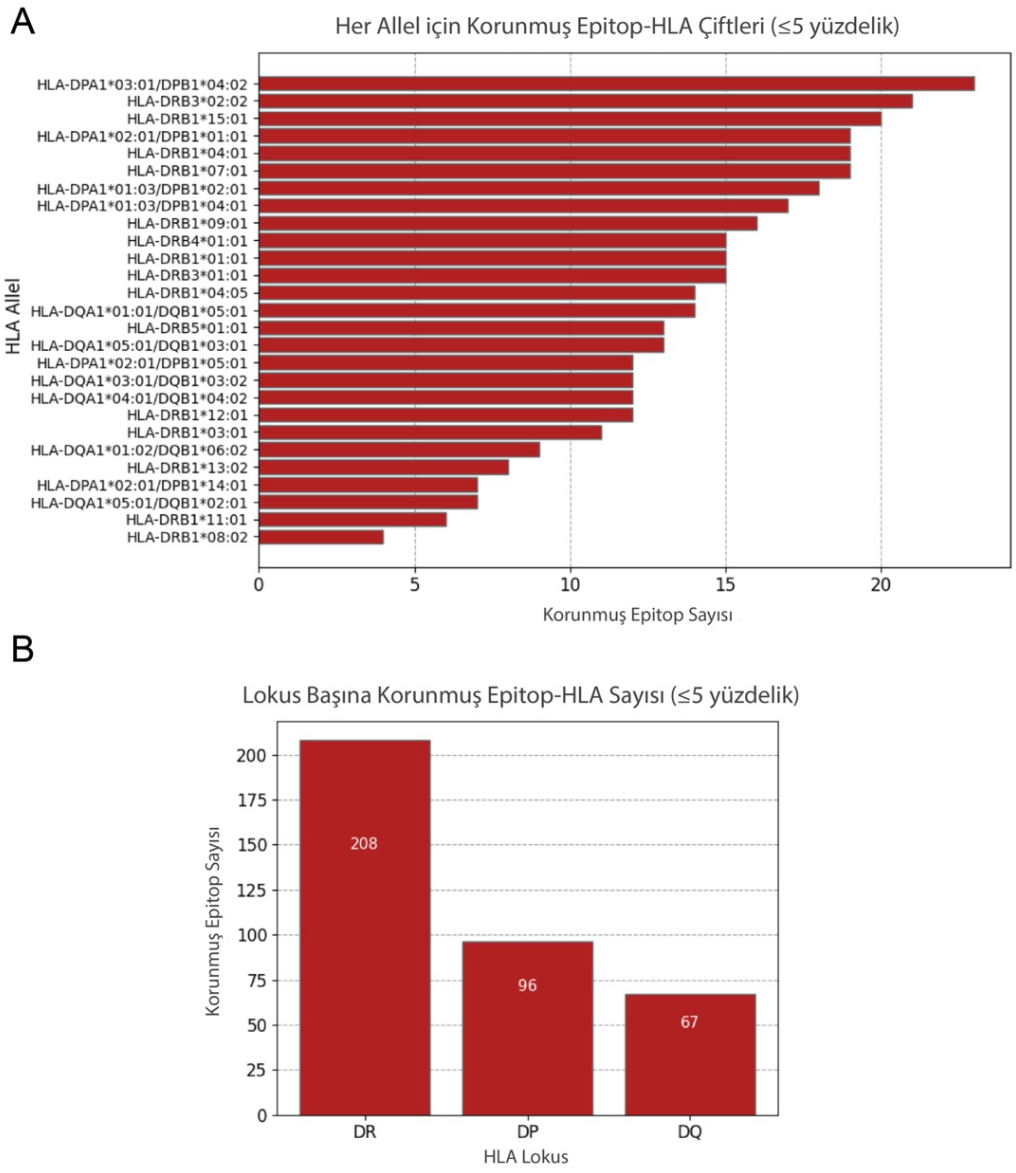
X ekseni, Spike proteininin amino asit pozisyonunu (1-indeksli), Y ekseni ise o pozisyonda başlayan epitop sayısını belirtmektedir. Grafik, kayıpların belirli 'sıcak noktalarda' (hotspot) kümelendiğini göstermektedir. Histogram, özellikle amino asit 39 ve 42 pozisyonları civarında ve daha belirgin olarak amino asit 59-62 aralığında olmak üzere, birden fazla epitopun başlangıç noktasını içeren sıcak noktaların (hotspot) varlığını ortaya koymaktadır. Bu yoğunlaşma, kayıp epitopların konumsal haritasında da teyit edilmektedir (Şekil 4.23B). Kayıp epitopların Spike proteini (yaklaşık 1273 amino asit) üzerindeki genel konumunu gösteren lineer harita ile kırmızı çubuk, tüm kayıpların proteinin N-terminal ucunda dar bir bölgede yoğunlaştığını görsel olarak doğrulamaktadır. Lineer harita, tanımlanan tüm epitop kayıplarının, Spike proteininin başlangıcındaki çok dar bir bölge ile sınırlı olduğunu net bir şekilde görselleştirmektedir. Bu konumsal kümelenmenin fonksiyonel anlamını aydınlatmak amacıyla kayıp epitopların haritalandığı Spike proteini domainlerini özetleyen sütun grafiği haritalama analizi, bu bulguyu daha da netleştirmiştir. (Şekil 4.23C). Analiz, haritalanan tüm kayıp epitop-HLA çiftlerinin istisnasız olarak Spike proteininin NTD içerisinde yer aldığını göstermiştir. Özellikle, virüsün konak hücre reseptörü ACE2'ye bağlandığı ve immünolojik olarak baskın olduğu bilinen RBD veya S2 alt birimi gibi diğer kritik domainlerde herhangi bir epitop kaybı tespit edilmemiştir.

Bir sonraki analizde, SARS-CoV-2'nin farklı varyantları arasında değişime uğramayan (korunan) ve geniş popülasyonlarda bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyeli taşıyan $CD4^+$ T hücresi epitoplarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, NetMHCIIpan algoritması ile tahmin edilen epitop–HLA bağlanma verileri kullanılmıştır. Analizin ilk aşaması olarak, güçlü bağlayıcı kabul edilen (≤10 yüzdelik skoru) ve incelenen tüm varyantlarda ortak olan epitop–HLA çiftleri saptanmıştır (Şekil 4.24). Yapılan analizler sonucunda, ≤10 yüzdelik eşiği altında toplam 740 adet korunmuş epitop–HLA çifti tanımlanmıştır. Bu çiftlerin HLA lokuslarına göre dağılımı incelendiğinde, DR lokusunun 434 çift ile en zengin lokus olduğu, bunu sırasıyla DP (183 çift) ve DQ (123 çift) lokuslarının izlediği görülmüştür (Şekil 4.24B). Bu sonuç, korunan epitopların yarıdan fazlasının (%59) DR molekülleri tarafından sunulduğunu göstermektedir. Allel özelindeki incelemede ise, HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 (n=41), HLA-DRB3*02:02 (n=40) ve HLA-DRB1*07:01 (n=38) allellerinin en fazla sayıda korunmuş epitop sunduğu belirlenmiştir (Şekil 4.24A). Bu bulgular, korunan epitopların sunumunda belirli DR ve DP allellerinin öne çıktığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.24: SARS-CoV-2 varyantları arasında korunan $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤10 yüzdelik eşiği)

Korunmuş epitop–HLA çiftlerinin allel bazında dağılımı gösterilmiştir (A). Y ekseni HLA allellerini, X ekseni ise her bir allel tarafından sunulan korunmuş epitopların sayısını göstermektedir. (B) Korunmuş epitop–HLA çiftlerinin lokus bazında (DR, DP, DQ) dağılımı. Her sütunun üzerindeki sayı, ilgili lokusa ait toplam çift sayısını ifade etmektedir. Analiz, NetMHCIIpan tahminlerine göre güçlü bağlayıcı kabul edilen (≤10 persentil) ve çalışılan tüm varyantlarda ortak olan epitopları içermektedir.

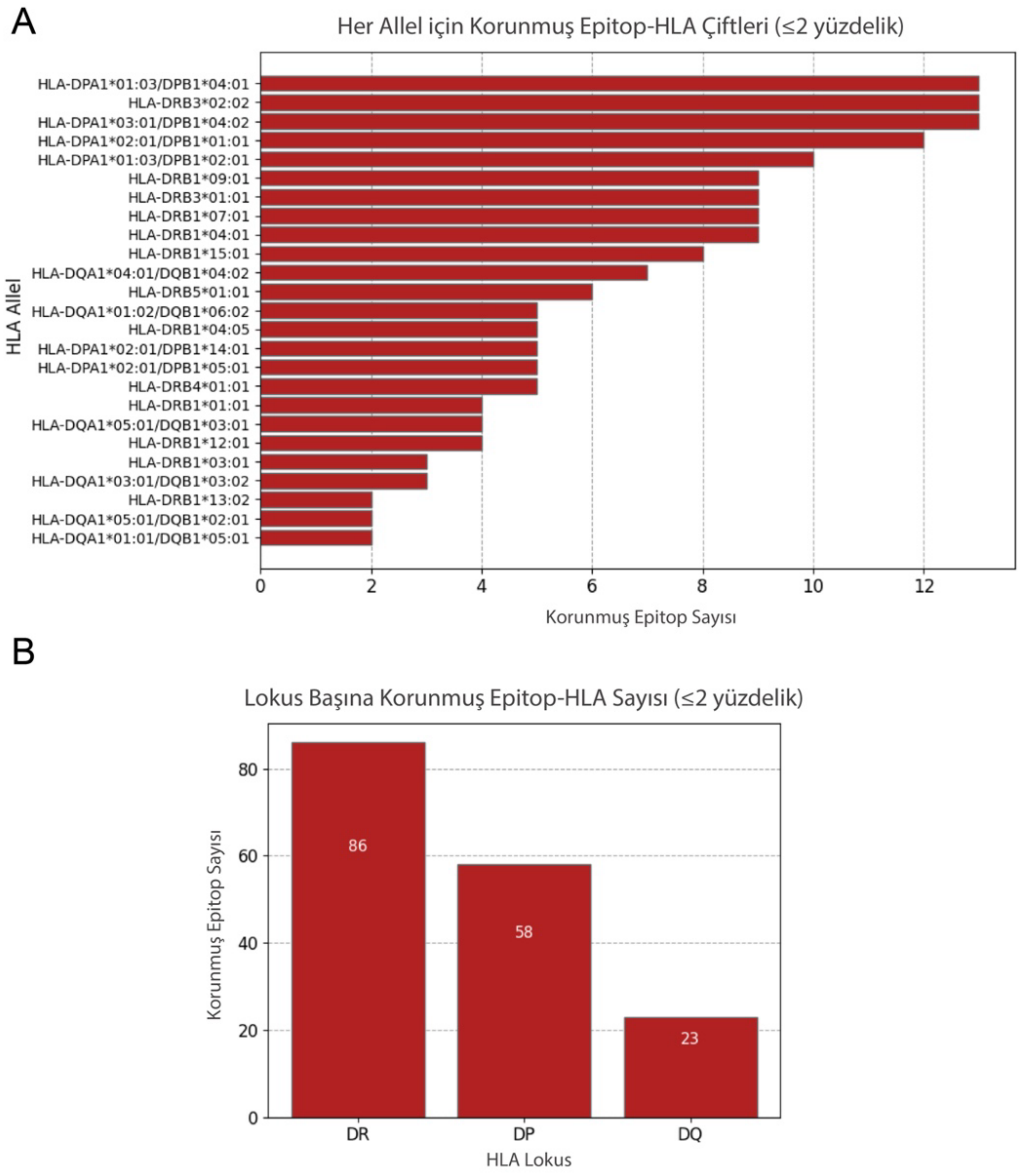


Şekil 4.25: SARS-CoV-2 varyantları arasında korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤5 yüzdelik eşiği)

NetMHCIIpan ≤5 yüzdelik bağlanma gücü eşiği kullanılarak yapılan analizde, incelenen tüm SARS-CoV-2 varyantları arasında toplam 371 adet korunmuş CD4+ T hücresi epitop–HLA çifti tespit edilmiştir (Şekil 4.25). Bu korunmuş çiftlerin HLA lokuslarına göre dağılımı incelendiğinde, DR lokusunun 208 çift ile en baskın lokus olduğu gözlenmiştir. DR lokusunu sırasıyla 96 çift ile DP ve 67 çift ile DQ lokusları takip etmiştir (Şekil 4.25B). Bulgular, DR lokusunun tek başına, tespit edilen tüm korunmuş epitopların yarısından fazlasını (%56) sunduğunu göstermektedir. Allel düzeyindeki analizler, belirli HLA allellerinin korunmuş epitopları sunmadaki rolünü ortaya

koymuştur. En fazla korunmuş epitop sunan allellerin başında HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 (n=24), HLA-DRB3*02:02 (n=21) ve HLA-DRB1*15:01 (n=20) geldiği saptanmıştır (Şekil 4.25A). Listede özellikle DR ve DP lokuslarına ait allellerin yoğunlukta olması dikkat çekmektedir.

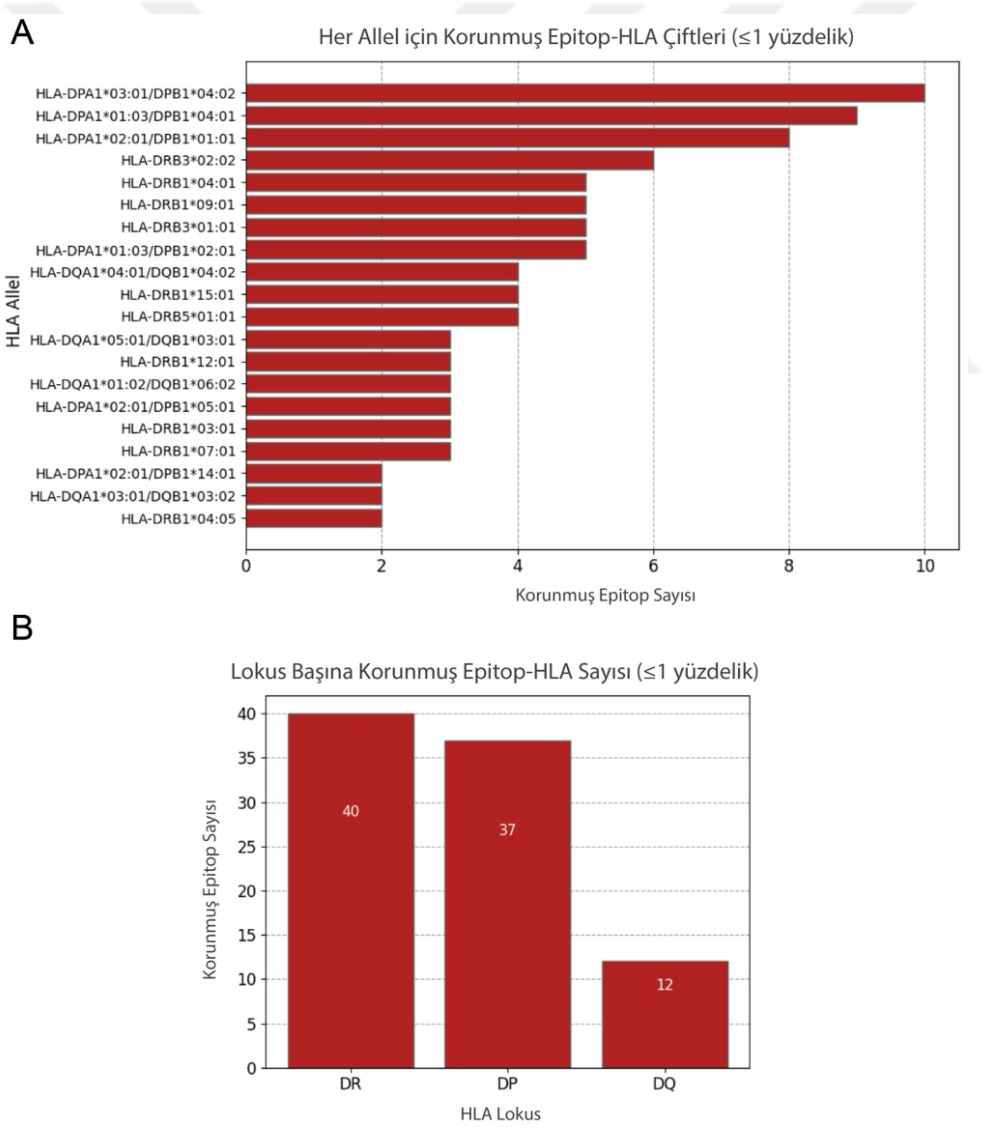
Analizin devamında, epitop–HLA bağlanma afinitesi için daha dar bir filtreleme uygulanarak en güçlü bağlayıcı adayların belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, NetMHCIIpan persentil skoru ≤2 olan epitop–HLA çiftleri incelenmiştir (Şekil 4.26). Bu dar eşik değeri uygulandığında, tüm varyantlar arasında korunan çiftlerin sayısı belirgin şekilde azalarak toplam 167'ye düşmüştür. Lokus bazında yapılan değerlendirmede, DR lokusunun 86 çift olduğu, bunu DP (58 çift) ve DQ (23 çift) lokuslarının izlediği görülmüştür (Şekil 4.26B). DR lokusu, bu en güçlü bağlayıcılar setinin de yarısından fazlasını (%51.5) oluşturmaktadır. Allel düzeyinde, en güçlü bağlayıcı ve korunmuş epitopları sunan allellerin başında HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01 (n=13) ve HLA-DRB3*02:02 (n=13) geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.26A). Bu sonuçlar, daha sıkı bağlanma eşiğinin, en çok epitop sunan allel sıralamasında değişikliklere yol açabildiğini ve en istikrarlı, güçlü bağlayıcı çiftlerin saptanmasında önemli bir adım olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.26: Yüksek afiniteli korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤2 yüzdelik eşiği)

Analizin son aşamasında, en yüksek bağlanma afinitesine sahip epitop adaylarını saptamak amacıyla NetMHCIIpan ≤1 persentil eşiği kullanılmıştır. Bu filtreleme, yalnızca en güçlü ve istikrarlı epitop–HLA çiftlerini ortaya çıkarmayı hedeflemiştir. Bu en dar kriter uygulandığında, tüm varyantlar arasında korunan çiftlerin sayısı 89 olarak belirlenmiştir. Bu set, aşı geliştirme çalışmaları için en öncelikli adayları temsil etmektedir. Lokus düzeyindeki dağılım, önceki analizlere göre önemli bir farklılık göstermiştir. DR lokusu 40 çift ile liderliğini korurken, DP lokusunun 37 çift ile neredeyse

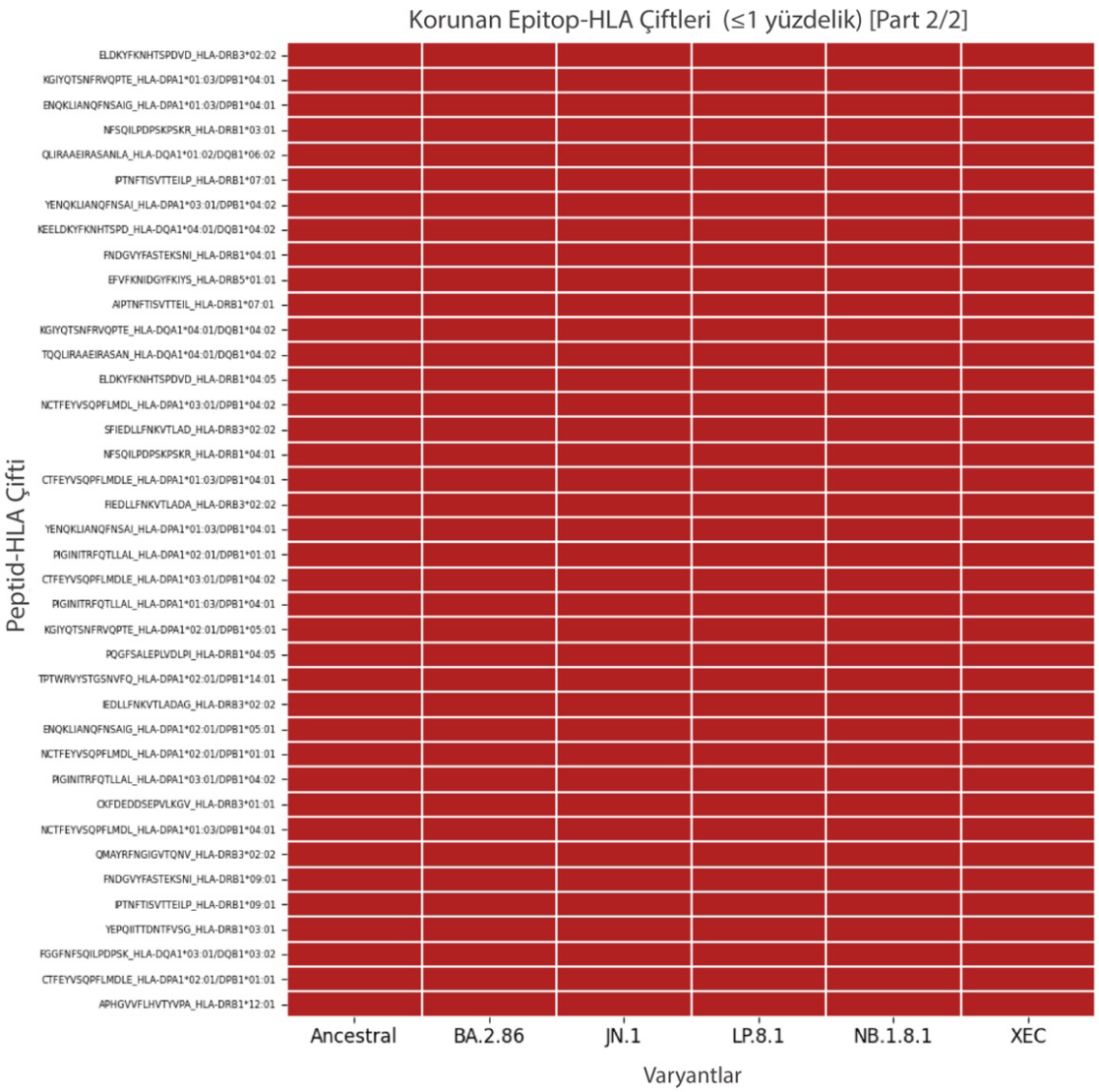
eşit sayıda epitop sunduğu gözlenmiştir. DQ lokusunun katkısı ise 12 çifte düşmüştür (Şekil 4.27B). Bu bulgu, en yüksek afiniteli korunmuş epitopların sunumunda DP lokusunun, DR lokusu kadar kritik bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, allel bazındaki sonuçlara da yansımıştır. En fazla sayıda yüksek afiniteli korunmuş epitop sunan ilk üç allelin tamamının DP heterodimerleri olduğu saptanmıştır: HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 (n=10), HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01 (n=9) ve HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01 (n=8) (Şekil 4.27A). Bu sonuç, en güçlü T-hücresi yanıtlarını tetikleme potansiyeli en yüksek olan korunmuş epitopların özellikle belirli DP allelleri tarafından sunulduğuna işaret etmektedir.



Şekil 4.27: En yüksek afiniteli korunmuş $CD4^+$ T hücresi epitoplarının dağılımı (≤1 yüzdelik eşiği)



Şekil 4.28: En yüksek afiniteli (≤1 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arasındaki varlığının doğrulanması (Part 1/2)



Şekil 4.29: En yüksek afiniteli (≤1 yüzdelik) korunmuş epitop–HLA çiftlerinin varyantlar arasındaki varlığının doğrulanması (Part 2/2)

Heatmap, ≤1 persentil eşiği ile saptanan 89 adet korunmuş epitop–HLA çiftinin varlığını görselleştirmektedir. Y ekseni her bir özgün peptid–HLA çiftini, X ekseni ise analize dahil edilen altı farklı SARS-CoV-2 varyantını göstermektedir. Her bir hücrenin dolu olması (kırmızı renk), ilgili epitop–HLA çiftinin o varyantta bulunduğunu teyit etmektedir. Haritanın bütününde boşluk olmaması, bu 89 çiftin tamamının %100 oranında korunduğunu göstermektedir.

Analizlerde en yüksek bağlanma afinitesine (≤1 persentil) sahip olduğu belirlenen 89 adet korunmuş epitop–HLA çiftinin, incelenen tüm SARS-CoV-2 varyantlarındaki varlığı bir heatmap ile görsel olarak teyit edilmiştir. Şekil 4.29'da görüldüğü üzere, bu 89 çiftin her biri, analize dahil edilen Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının tamamında bulunmaktadır. Heatmap kesintisiz ve tek tip görünüm, bu epitopların viral evrim sürecinde mutasyona uğramadan korunduğunu güçlü bir şekilde doğrulamaktadır. Bu durum, en güçlü bağlanma afinitesine sahip olan bu epitop–HLA çiftlerinin, gelecekte ortaya çıkabilecek yeni varyantlara karşı da etkili olabilecek evrensel aşı tasarımları için ne kadar değerli adaylar olduğunu göstermiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, COVID-19 geçirmiş bireylerde Omicron varyantına özgü bellek $CD4^+$ T hücre yanıtlarını ve önceki SARS-CoV-2 maruziyetinin bu yanıtlar üzerindeki etkisini Orijinal Antijenik Sin kavramı çerçevesinde incelemektedir. $CD4^+$ T hücrelerinin varlığı ile önceki enfeksiyonlara bağlı olarak gelişen bağışıklık yanıtları akan hücre ölçer yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmada, Türk popülasyonundan toplanan kan örnekleri üzerinde akan hücre ölçer kullanarak SARS-CoV-2'nin Omicron varyantına ve wild type virüse özgü $CD4^+$ T hücre aktivasyonu ve bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonları analiz edilmiştir. Ayrıca, hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle SARS-CoV-2 Spike protein varyantlarındaki $CD4^+$ T hücre epitoplarını karşılaştırarak SARS-CoV-2 varyantları arasındaki epitop düzeyinde çapraz reaktiviteyi, korunmuşluk durumunu ve immünodominant bölgeleri belirleyerek Orijinal Antijenik Sin kavramının etkisi araştırılmıştır.

Bu çalışma kapsamında, COVID-19 geçirmiş bireylerde Omicron varyantına özgü bellek $CD4^+$ T hücre yanıtları incelenmiştir. Virüsle yeniden karşılaşıldığında hızlı bir immün yanıt oluşturduğu bilinen bu hücrelerin, B hücreleri ve $CD8^+$ T hücrelerinin aktivasyonunu destekleyerek uzun süreli koruma sağladığı belirtilmiştir (58). Hem wild type hem de mutasyon taşıyan (Omicron varyantı) peptid havuzlarıyla yapılan stimülasyon sonrasında, bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonlarında farklı yanıt profilleri gözlemlenmiştir. Aktivasyon belirteçleri CD69 ve CD137'nin ekspresyonu, antijen-spesifik $CD4^+$ T hücre yanıtlarının tespit edilmesi için kullanılmıştır.

Hücresel bağışıklık hafızası, SARS-CoV-2 gibi viral enfeksiyonlara karşı uzun süreli koruma sağlanmasında kritik bir rol oynamaktadır (102,103,107). Enfeksiyonun ardından aktive olan naif $CD4^+$ T hücreleri, antijenik uyaranın niteliğine ve sitokin ortamına bağlı olarak fonksiyonel açıdan farklı özelliklere sahip bellek alt gruplarına farklılaşabilir. Literatürde genel kabul gören lineer farklılaşma modeline göre, naif hücreler önce merkezi bellek (TCM) hücrelerine, ardından efektör bellek (TEM) ve terminal farklılaşmış efektör bellek (TEMRA) hücrelerine dönüşmektedir. Bu süreçte hücreler, lenfoid organlara geri dönme yeteneklerini kademeli olarak kaybederken,

periferik dokulara göç etme ve sitolitik fonksiyon sergileme kapasitelerini artırmaktadır (69,70,74,75,88).

Çalışmamızda tanımlanan TCM hücreleri, yüksek proliferatif kapasiteleri ve IL-2 üretim yetenekleriyle immünolojik hafızanın devamlılığını sağlayan ana depo olarak değerlendirilmektedir. Bu hücreler, antijenle tekrar karşılaşıldığında hızla çoğalarak efektör hücre havuzunu yenileme potansiyeline sahiptir. Öte yandan, TEM alt gruplarının (TEM1, TEM2 ve TEM3), inflamasyon bölgelerine hızlı göç yetenekleri ve anlık efektör fonksiyonlarıyla virüsün eliminasyonunda öncül rol oynadığı düşünülmektedir. Özellikle TEM3 popülasyonunun artışı, antijene maruziyetin devam ettiği veya güçlü bir ikincil yanıtın oluştuğu durumlarda gözlenen ileri düzey bir diferansiyasyonu yansıtmaktadır (74,75).

Bulgularımızda dikkat çeken TEMRA hücreleri ise, $CD4^+$ T hücre hattında nadir gözlenmesine rağmen, kronik antijenik stimülasyon veya yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir. Bu hücrelerin yüksek sitotoksik molekül (Granzyme B ve Perforin) ekspresyonu, $CD4^+$ T hücrelerinin sadece yardımcı hücreler olmadığını, aynı zamanda doğrudan antiviral sitotoksik aktivite sergileyebileceğini de desteklemektedir. Sonuç olarak, Omicron varyantına karşı gelişen bellek yanıtının bu alt popülasyonlar arasındaki dağılımı, bireylerin uzun süreli bağışıklık kapasitesini ve varyantlara karşı çapraz koruma potansiyelini belirleyen temel unsurlardan biri olarak öne çıkmaktadır (88).

Bu çalışmada, bellek alt popülasyonlarının dağılımı incelendiğinde (TCM, TEM1, TEM2, TEM3), her iki grupta da (Wt(+) ve Wt(−)) stimülasyona yanıt olarak merkezi ve efektör bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonlarının frekanslarında negatife göre anlamlı düzeyde değişiklikler gözlenmiştir (tüm alt gruplar için $p<0,001$). Wt(+) bireylerde, hem S^{WT} hem de S^{O} peptid havuzları ile yapılan stimülasyon, stimülasyonsuz negatif kontrole (Neg) kıyasla tüm alt gruplarda anlamlı aktivasyon artışı oluşturmuştur. Ancak, $S^{W}T$ ile S^{O} stimülasyonları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Wt(–) bireylerde de benzer şekilde hem S^{WT} hem de S^{O} stimülasyonları, Neg grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış göstermiştir. Ancak, bazı alt popülasyonlarda S^{O}'nun S^{WT}'ye kıyasla daha yüksek bir yanıt indüklediği gözlemlenmiştir. Özellikle TEM2 ($p=0,0345$) ve TEM3 ($p=0,0161$) hücrelerinde bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bu bulgular, hem enfeksiyon geçirmiş (Wt(+)) hem de geçirmemiş (Wt(−)) bireylerde Omicron spike peptitlerinin, bellek $CD4^+$ T hücre alt popülasyonlarını (özellikle TEM2 ve TEM3) etkin şekilde aktive ettiğini göstermektedir. Çalışma sonuçları, $CD4^+$ T hücrelerinin varyant spike proteinlerine karşı geniş çapraz reaktivite potansiyeline sahip olduğunu ve bu hücre alt popülasyonlarının varyantlara karşı bağışıklık yanıtında önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca, hafıza $CD4^+$ T hücrelerinin varyantlara yanıtının, enfeksiyon öyküsünden yalnızca sınırlı şekilde etkilendiği görülmektedir. Bu durum, aşıların veya doğal enfeksiyonun oluşturduğu $CD4^+$ T hücre hafızasının yeni varyantlara karşı esnek bir yanıt kapasitesine sahip olabileceğine işaret etmektedir.

Çalışma grubuna dahil edilen Wild type (Wt(−)) grubu, enfeksiyon geçmişi olmadığı halde bu gruptaki bireylerde bellek $CD4^+$ T hücre alt gruplarında aktivasyon görülmüştür Wt(−) grubu, 2021 yılından önce COVID-19 enfeksiyonu geçirmemiş olsa da, en az 2 veya 3 doz aşı olmuş bireylerdir ve aşılanmanın ardından 2022-2023 yılları arasında Omicron varyantı ile enfeksiyon geçirmişlerdir. SARS-CoV-2 aşıları genellikle orijinal (wild type) Spike proteinine karşı bağışıklık yanıtı oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Bu nedenle, aşılanma yoluyla bu bireylerde wild-type Spike proteinine özgü bellek $CD4^+$ T hücreleri oluşmuş olması beklenebilir. Bu bellek hücreleri, virüsle yeniden karşılaşıldığında (*in vitro* stimülasyon veya doğal enfeksiyon yoluyla) hızlı bir immün yanıt oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu nedenle, bu grupta $CD4^+$ T hücre aktivasyonu görülmüş olabilir. Ayrıca, $CD4^+$ T hücrelerinin çapraz reaktivite potansiyeli yüksek olarak bildirilmiştir. Çalışmanın bulguları, $CD4^+$ T hücrelerinin varyant Spike proteinlerine karşı geniş çapraz reaktivite potansiyeline sahip olduğunu belirtmektedir. Bu, önceki bir varyantla (aşılanma yoluyla oluşan wild type tabanlı immünite gibi) veya Omicron varyantının kendisiyle enfeksiyon sonrasında oluşan bellek T hücrelerinin, farklı varyantlara ait peptitleri de tanıyabileceği anlamına gelir. Dolayısıyla, Wt(−) grubundaki bireylerin aşılanma geçmişi ve sonrasındaki Omicron enfeksiyonları, bu hücrelerin hem wild type hem de Omicron peptit havuzlarına yanıt vermesini sağlamış olabilir. Bu durum, sadece aşılanmış ancak daha önce Wild type virüsle enfekte olmamış bireylerin (Wt(−)), bağışıklık sistemlerinin yeni varyanta (Omicron) adapte olma konusunda daha esnek olduğunu gösterir. Önceki enfeksiyonun yarattığı güçlü immün imprinting bu grupta doğal enfeksiyonla oluşmadığı için, aşı temelli bellek, Omicron enfeksiyonu ile

karşılaştığında varyanta özgü yeni yanıtları daha rahat genişletebilmiş olabilir. Wt(−) grubunda Omicron'a özgü yanıtların (özellikle TEM2 ve TEM3 alt gruplarında) wild type'a kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, aşı kaynaklı belleğin varlığına rağmen, doğal wild type enfeksiyonu geçirmemiş olmanın, bağışıklık sistemine yeni varyanta (Omicron) karşı daha güçlü ve özelleşmiş bir yanıt oluşturma esnekliği tanıdığını düşündürmektedir. Bu bulgu, Orijinal Antijenik Sin etkisinin, doğal enfeksiyon geçmişi olmayan aşılanmış bireylerde daha az kısıtlayıcı olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, Wt(−) grubunda alınan aşı dozu ile Omicron spesifik T hücre yanıtı arasında saptanan pozitif korelasyon, wild type tabanlı aşıların oluşturduğu temel belleğin, Omicron enfeksiyonu sırasında 'hibrit bağışıklık' mekanizmasıyla varyanta özgü yanıtı güçlendirdiğini doğrulamaktadır.

İlk antijenle karşılaşma, bağışıklık sisteminin SARS-CoV-2'ye karşı geliştirdiği T hücresi yanıtlarını önemli ölçüde şekillendirir. Bu durum, Orijinal Antijenik Sin veya immün imprinting olarak bilinen bir olguya karşılık gelir ve bağışıklık sisteminin daha önce karşılaştığı benzer bir antijene karşı geliştirilmiş bellek yanıtını, yeni bir antijene karşı tamamen yeni bir yanıt oluşturmak yerine tercihli olarak aktive etmesi eğilimidir (118). Bağışıklık sistemi, aynı veya benzer bir antijenle tekrar karşılaştığında, yeni T hücrelerini tanıyıp aktive etmek yerine, tercihen başlangıçta aktif olan T hücrelerini yeniden aktive eder. Bu durum, bağışıklık tepkisinin, virüsün mevcut varyantı yerine ilk karşılaşılan antijene doğru yönelmesine neden olabilir (118). Bu çalışmada Wt(+) grubunda (ilk karşılaşması Wild type olan), Wild type ve Omicron varyantlarına verilen yanıtlar arasında anlamlı bir fark bulunmaması, önceki enfeksiyonun oluşturduğu bu 'imprinting' etkisinin, yeni varyanta özgü yanıtın baskınlaşmasını dengelediğini düşündürmektedir. Buna karşın, ilk virüs karşılaşması Omicron varyantı ile olan Wt(−) grubunda, Omicron'a özgü yanıtların (özellikle TEM2 ve TEM3 alt gruplarında) Wild type'a kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunması dikkat çekicidir. Bu bulgu, literatürde belirtilen OAS etkisinin, enfeksiyon geçmişi olmayan ve sadece aşılanmış bireylerde daha esnek olabileceğini; bu bireylerin yeni bir varyantla (Omicron) enfekte olduklarında, ilk antijene (aşıya) saplanıp kalmak yerine varyanta özgü yeni ve güçlü bir bellek oluşturma kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir.

T hücresi tepkisi, SARS-CoV-2 enfeksiyonundan sonra uzun süreler boyunca korunabilmektedir. Kaynaklar, enfeksiyonun T hücresi bağışıklığı üzerinde kalıcı bir etki bıraktığını ve bu yanıtların zamanla nasıl sürdüğünü detaylandırmaktadır (95,96). İyileşen hastalarda SARS-CoV-2'ye özgü T hücrelerinin, enfeksiyon sonrası 240 güne kadar (yaklaşık 8 ay) polifonksiyonel (CD107a+, IFN-γ+, IL-2+, TNF+ gibi çeşitli fonksiyonel özellikler sergileyen) kaldığı gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin ayrıca sürdürülebilir polifonksiyonellik ve proliferasyon kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir, bu da etkili bellek geri çağırma yanıtlarını düşündürmektedir (157). Bu tez çalışmasından elde edilen veriler, bu literatür bilgisiyle paralellik göstererek, son enfeksiyonun üzerinden 9 aydan daha uzun süre geçen katılımcılarda dahi peptit stimülasyonuna yanıt olarak güçlü bir $CD4^+$ T hücresi aktivasyonunun ($CD69^+CD137^+$) devam ettiğini ortaya koymuştur. Bu durum, viral varyantlara rağmen SARS-CoV-2'ye karşı oluşturulan uzun süreli $CD4^+$ T hücre belleğinin korunduğunu, yani oluşan hücresel bağışıklığın uzun vadeli kalıcılığını koruduğunu doğrulamaktadır.

Ayrıca, wild-type Spike proteinine karşı $CD4^+$ T hücre yanıtlarının da tespit edilebilir seviyede devam ettiği gözlemlenmiştir. Özellikle Wt(–) olarak sınıflandırılan, yani daha önce wild type SARS-CoV-2 ile enfekte olmamış bireylerde dahi güçlü bir WT-Spike yanıtının varlığı, Omicron enfeksiyonunun çapraz reaktif $CD4^+$ T hücre yanıtlarını uyarabildiğine işaret etmektedir. İlginç bir şekilde, Wt(+) (hibrit bağışıklık) ve Wt(–) grupları karşılaştırıldığında, enfeksiyon geçmişine sahip Wt(+) grubunun yanıtlarının Wt(−) grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmaması, Omicron enfeksiyonunun baskın bir immünolojik şekillendirici olduğunu ve önceki enfeksiyonun sağladığı ek katkının zamanla dengelendiğini veya doygunluğa ulaştığını düşündürmektedir.

Pandeminin başlangıcından 3,5 yıl sonra bile hibrit bağışıklığı olan katılımcıların çoğunda (%94,9), son bilinen SARS-CoV-2 enfeksiyonundan bir buçuk yıl sonra bile güçlü wild type'a ait spike-spesifik $CD4^+$ T hücresi yanıtları sergilendiği rapor edilmiştir (158). SARS-CoV-2-spesifik T hücrelerinin, geçiş bellek (transitional memory), TEM, TEMRA (CD45RA re-ekspresyonlu efektör bellek), TCM ve TSCM gibi çeşitli fenotipler sergilediği ve bunların SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve aşılamadan sonra güçlü T hücresi belleği oluşturduğu belirtilmiştir. Tekrarlanan maruziyetlerin T

hücresi bellek fenotiplerini TEMRA'ya doğru kaydırdığı gözlemlenmiştir (159). Bu bulgular, ilk antijen karşılaşmasının, SARS-CoV-2'ye karşı oluşan T hücresi bağışıklığının kalitesini, süresini ve varyantlara karşı çapraz koruma kapasitesini belirlemede kritik bir rol oynadığını göstermektedir. Çalışmamızda 9 aydan uzun süre geçmesine rağmen tespit ettiğimiz güçlü bellek yanıtları ve özellikle efektör bellek alt gruplarındaki aktivasyon, literatürdeki bu uzun süreli koruma ve fenotipik dağılım verileriyle örtüşmektedir.

Bir çalışmada, SARS-CoV-2'ye karşı aşılanmış veya enfeksiyon geçirmiş bireylerde, Spike proteinine özgü $CD4^+$ T hücrelerinin Omicron varyantlarına karşı çapraz tanıma yeteneği büyük ölçüde korunduğu gösterilmiştir (158). Ancestral Wuhan suşu, BA.1, XBB.1 ve hipermutasyonlu BA.2.86 Spike proteinleri arasında Spike'a özgü $CD4^+$ T hücrelerinin sıklığında önemli bir fark gözlenmemiştir. Genel olarak, Spike'a özgü $CD4^+$ T hücre yanıtı, test edilen tüm Omicron varyantlarına (hipermutasyonlu BA.2.86 dahil) karşı %90'ın üzerinde korunmuştur (158). Bu durumun çapraz reaktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. Bu çalışmada ise, spike-spesifik bellek $CD4^+$ T hücrelerinin Wt(–) grubunda tespit edilen frekansa çapraz reaktivite durumunun katkı sağladığı düşünülmektedir. Yapılan başka bir çalışmada, bellek $CD4^+$ T hücrelerinin Omicron varyantlarını tanıma kabiliyeti, AIM (aktivasyon indüklü belirteç) analizi ile %84, ICS (intraselüler sitokin boyama) ile %93 oranında korunduğu belirtilmiştir. AIM tarafından Omicron için önemli bir azalma gözlemlenirken, Alpha veya Beta varyantlarına benzer büyüklükte bir azalma olmuştur. ICS ile Omicron'a karşı $CD4^+$ T hücre yanıtında önemli bir azalma gözlenmemiştir (160). Çalışmamızda ise, $CD69^+CD137^+$ (AIM) kullanılmasına rağmen Wt(–) grubunda Omicron'a karşı bir azalma değil, aksine güçlü bir yanıt gözlenmesi, aşı kaynaklı belleğin varyantlara adaptasyon yeteneğinin, literatürdeki bazı AIM verilerine kıyasla daha yüksek olabileceğini düşündürmektedir.

Gruplar arası daha detaylı değerlendirme yapılması amacıyla, enfeksiyon geçmişine göre peptit stimülasyonlarına karşı gelişen yanıtların karşılaştırılmalı frekansları incelenmiştir. Varyantlara özgü $CD4^+$ T hücre bellek profilleri çalışma grupları arasında kıyaslandığında, S^{WT}'ye karşı gelişen yanıtta Wt(+) ve Wt(–) grupları arasında istatistiksel bir farkın bulunmaması (Tablo 4.2), mevcut bağışıklık

geçmişinden (enfeksiyon veya aşı) bağımsız olarak, atasal virüse karşı standart ve korunmuş bir bellek havuzunun tesis edildiğini göstermektedir.

Ancak, S^{O} varyantına karşı verilen yanıtlarda durum farklılaşmaktadır. Çalışmamızın en dikkat çekici bulgularından biri, Wt(−) grubunun Omicron'a karşı, Wt(+) grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bir TEM3 yanıtı ($p=0.003$) oluşturmasıdır. TEM3 hücreleri, hızlı sitokin üretimi ve dokuya göç kapasitesi ile karakterize edilen, antiviral savunmanın "sıcak" fazında kritik rol oynayan hücrelerdir. Wt(−) grubunda bu popülasyonun daha baskın olması, bu bireylerin Omicron varyantı ile karşılaştıklarında (veya varyant peptitleri ile uyarıldıklarında), efektör fonksiyonlara odaklanan daha dinamik bir hücresel mobilizasyon gerçekleştirdiğine işaret etmektedir. Wt(+) bireylerin bağışıklık sistemi, geçirdikleri ilk enfeksiyon sırasında Wuhan suşunun epitoplarına karşı güçlü bir şekilde “imprinted” olabilir. Literatürde "Original Antigenic Sin" (OAS) olarak tartışılan bu fenomen gereği, Wt(+) grubu Omicron varyantını gördüğünde, sistem de novo (yeni) ve varyanta tam spesifik bir efektör yanıt (TEM3) oluşturmak yerine, var olan çapraz reaktif ancak daha az özelleşmiş bellek hücrelerini kullanmaya eğilim gösterebilir. Buna karşın, immünolojik geçmişi sadece aşılamaya dayalı olan Wt(−) grubu, doğal enfeksiyonun yarattığı bu güçlü bias (yanlılık) etkisinden muaf olduğu için, varyant spike proteinine karşı efektör faza (TEM3) geçişi daha esnek ve güçlü bir şekilde yönetiyor olabilir. Omicron gibi yüksek mutasyonlu varyantlara karşı sadece "hibrit bağışıklığın" değil, aynı zamanda Wt(−) (aşılı) bireylerdeki bağışıklığın da −özellikle efektör kapasite anlamında− oldukça yetkin olduğunu ve hatta belirli parametrelerde daha avantajlı olabileceğini ortaya koymaktadır.

Literatürde yapılan bazı çalışmalarda, önceki varyantlarla (Wild type veya Delta) enfekte olan bireylerin, yalnızca Omicron ile karşılaşanlara kıyasla varyantlara karşı daha yüksek T hücresi yanıtları geliştirdiği ve sadece Omicron enfeksiyonunun hücresel bağışıklığı indüklemede daha zayıf kaldığı bildirilmiştir (161). Bizim çalışmamızda ise, ilk enfeksiyonu geçiren kohortun Omicron peptitlerine verdikleri yanıt, ilk enfeksiyonu geçirmeyenlerden daha düşük olsa da TEM3 hücre grubu dışındakilerde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Wild type enfeksiyon geçmişi olmayan (Wt(−)) aşılanmış grupta Omicron varyantına özgü yanıtlar korunmuş, hatta TEM3 gibi belirli bellek alt popülasyonlarında bu yanıtların Wild type'a kıyasla daha

baskın ve güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, Wild type enfeksiyonu geçirmemiş bireylerde bağışıklık sisteminin yeni varyanta (Omicron) adaptasyon yeteneğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Terminal efektör belleğe (TEMRA) farklılaşma, genellikle kronik antijenik uyarım veya tekrarlayan güçlü viral maruziyetlerle ilişkilendirilen, sitotoksik potansiyeli yüksek bir hücresel yanıtın göstergesidir. Çalışmamızda, SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin terminal farklılaşma dinamikleri incelendiğinde, Wt(+) ve Wt(−) grupları arasında varyantlara özgü yanıt paternleri açısından çarpıcı bir ayrışma gözlemlenmiştir. Wt(+) grubunda, S^{WT} ve S^{O} varyantına karşı gelişen TEMRA yanıtları arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır. Bu durum, Wt(+) bireylerde yerleşik bellek havuzunun, varyantlar arasındaki mutasyonel farkları "göz ardı ederek" korunmuş epitoplar üzerinden yüksek bir çapraz reaktivite (cross-reactivity) sergilediğine işaret edebilir. Bu bulgu, 'Original Antigenic Sin' (OAS) veya immün imprinting hipotezi ile uyumlu olarak; bağışıklık sisteminin varyantla karşılaştığında, yanıtı de novo epitoplar yerine, birincil maruziyetten (Wuhan suşu) tanıdığı ortak epitoplar üzerinden domine etmesi ve hücreleri hızla terminal efektör faza sürüklemesi şeklinde yorumlanabilir. Buna karşın Wt(−) grubunda, S^{WT} ve S^{O}'ya verilen TEMRA yanıtları arasında anlamlı bir farklılık ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu grupta, Wt(+) grubundaki gibi güçlü bir 'baskılayıcı bellek izi' (memory trace) bulunmadığından, T hücre reseptör (TCR) repertuvarının spike proteinindeki yapısal değişikliklere ve peptit/MHC kompleksindeki afinite farklarına karşı daha hassas bir ayrım (discrimination) yapabildiği düşünülmektedir. Sonuç olarak, Wt(+) bireylerde varyanttan bağımsız olarak TEMRA yanıtının varlığı, viral klirenste kritik rol oynayan sitotoksik T hücre fonksiyonlarının Omicron varyantına karşı da korunduğunu göstermesi açısından umut vericidir; ancak bu yanıtın 'donmuş' bir profil sergilemesi, gelecekteki varyantlara adaptasyon kapasitesi açısından yakından izlenmelidir.

Varyantlara özgü T hücre yanıtlarının değerlendirilmesinde grup ortalamaları genel bir eğilim sunsa da bireysel yanıt dinamiklerinin eşleştirilmiş (pairwise) analizlerle incelenmesi, immünolojik belleğin esnekliğini (plasticity) ve varyantlara adaptasyon kapasitesini anlamak adına daha hassas bir veri sağlar. Çalışmamızda, S^{WT} ve S^{O} varyantlarına karşı gelişen $CD4^+$ T hücre yanıtları bireysel düzeyde

karşılaştırıldığında, beklenenin aksine, Omicron varyantına verilen yanıtların frekans bazında azalmadığı, bunun aksine birçok donörde S^{WT}'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle bellek havuzunun sürdürülebilirliğinden sorumlu TCM ve hızlı efektör fonksiyonlardan sorumlu TEM3 alt gruplarında görülen bu artış eğilimi, SARS-CoV-2 Spike proteinindeki çoklu mutasyonların, $CD4^+$ T hücre tanımasını olumsuz etkilemediğini, hatta mevcut TCR (T hücre reseptörü) repertuvarının varyant epitoplarına karşı yüksek afiniteli bir çapraz reaktivite (robust cross-reactivity) sergilediğini göstermektedir.

Literatürde, nötralizan antikorların Omicron varyantına karşı etkinliğinin belirgin şekilde düştüğü sıklıkla rapor edilmiştir. Bizim bulgularımız, T hücre yanıtının antikor yanıtından farklı olarak mutasyonlara karşı daha dirençli olduğunu savunan görüşü desteklemektedir (146,166). T hücre epitoplarının Spike proteini boyunca lineer ve geniş bir alana yayılması, varyantlardaki nokta mutasyonların ("escape" mutasyonları) toplam T hücre tanımasını bozmasını engellemektedir.

Çalışmamızda S^O uyarımı sonrası frekansların S^{WT}'ye göre daha yüksek saptanması ise iki mekanizma ile açıklanabilir: Birincisi, bellek T hücrelerinin, varyanttaki mutasyonlu bölgelerden ziyade, virüsün evrimsel süreçte değiştiremediği "korunmuş epitop bölgelerine" (conserved regions) odaklanması ve bu bölgelere karşı çok güçlü bir klonal ekspansiyon göstermesidir. İkincisi ise, kullanılan Omicron peptit havuzunun, bellek havuzundaki belirli klonları (özellikle TEM3 fenotipindeki) *in vitro* ortamda daha etkin bir şekilde uyarabilme potansiyelidir. Sonuç olarak, Wt(+) veya Wt(−) durumundan bağımsız olarak, bireylerin $CD4^+$ T hücre hafızası Omicron varyantını "yabancı" veya "tanınmaz" olarak algılamamaktadır. Aksine, sistemin bu yeni varyanta karşı hem TCM üzerinden uzun vadeli belleği koruyarak hem de TEM3 üzerinden güçlü bir efektör yanıt vererek tam donanımlı bir savunma mekanizması geliştirdiği anlaşılmaktadır.

Çalışmamızda SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre bellek havuzunun fenotipik dağılımı incelendiğinde, yanıtın terminal farklılaşmış hücrelerden (TEMRA) ziyade, proliferatif kapasitesi yüksek merkezi bellek (TCM) ve güçlü efektör fonksiyonlara sahip efektör bellek 3 (TEM3) popülasyonlarında kümelendiği görülmektedir.

Analizlerimiz, $CD4^+$ bellek havuzunun en baskın bileşeni olan TCM popülasyonunun yüksek frekansını, viral immünitenin uzun vadeli sürdürülebilirliği açısından stratejik bir kazanım olarak işaret etmektedir. TCM hücreleri, lenfoid organlara (homing) yerleşme yetenekleri ve antijenle tekrar karşılaşıldığında hızla çoğalarak (self-renewal) büyük bir efektör hücre ordusu oluşturma kapasiteleriyle bilinirler (72,73). $CD4^+$ havuzunda bu kök hücre benzeri (stem-like) özelliklere sahip grubun korunmuş olması; bağışıklık sisteminin sadece mevcut tehdide yanıt vermekle kalmayıp, olası bir re-enfeksiyon durumunda B hücrelerine yardım (B-cell help) sinyallerini ve $CD8^+$ T hücreleri için gerekli sitokin desteğini (IL-2) sağlayacak "immünolojik rezervi" canlı tuttuğunu göstermektedir.

Bununla birlikte, çalışmamızda TCM ile birlikte TEM3 popülasyonunun da belirgin bir dominans sergilemesi, $CD4^+$ yanıtının sadece bir "bekleme" (resting) halinde olmadığını, aynı zamanda periferik dokulara göç etmeye ve hızlı sitokin yanıtı (IFN-γ, TNF-α) oluşturmaya hazır bir "müdahale gücüne" de sahip olduğunu ortaya koymaktadır. TEM3 hücrelerinin yüksek varlığı, sistemin antijeni gördüğü anda lenfoid organlardaki proliferasyonu beklemeden, enfeksiyon bölgesinde anlık antiviral koruma sağlama potansiyelini yansıtmaktadır. Ara basamak fenotipleri olarak değerlendirilebilecek TEM1 ve özellikle en düşük frekansa sahip TEM2 gruplarının azlığı ise, bellek farklılaşmasının bu geçiş formlarında duraksamadan, fonksiyonel olarak daha yetkin olan TCM (yedek güç) veya TEM3 (aktif güç) uçlarına doğru kanalize olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda $CD4^+$ T hücreleri için saptanan TCM baskın profilinin aksine; aynı kohort üzerinde gerçekleştirilen tamamlayıcı bir analizde, SARS-CoV-2 spesifik $CD8^+$ T hücre bellek havuzunun belirgin şekilde farklı bir farklılaşma rotası izlediği gözlemlenmiştir (162). Bu analizler, $CD8^+$ T hücrelerinin çoğunlukla 'dinlenme' (resting) halindeki TCM fenotipinden ziyade; hızlı antiviral sitotoksisite potansiyeline sahip geç efektör bellek (TEM3) ve terminal efektör (TEMRA) aşamalarında kümelendiğini ortaya koymaktadır. Aynı donör grubunda T hücresi alt tipleri ($CD4^+$ vs. $CD8^+$) arasında saptanan bu fenotipik ayrışma (diverjans), literatürdeki kapsamlı SARS-CoV-2 immünolojik hafıza çalışmalarıyla birebir örtüşmektedir (50,157,163-166). Bu durum, organizmanın viral tehdide karşı $CD4^+$ hücreleriyle 'uzun vadeli

rezerv', $CD8^+$ hücreleriyle ise 'hızlı müdahale gücü' oluşturarak fonksiyonel bir iş bölümüne gittiğini doğrulamaktadır.

Dikkat çekici bir diğer bulgu ise, $CD8^+$ T hücrelerinde sıklıkla rastlanan terminal farklılaşmış TEMRA ($CD45RA^+CCR7^-CD27^-$) fenotipinin, $CD4^+$ bellek havuzunda en düşük frekansa sahip grup olmasıdır (50,162,163,165). $CD4^+$ T hücrelerinde TEMRA birikimi, genellikle kronik viral enfeksiyonlar (örn. CMV) veya immün yaşlanma ile ilişkilendirilen, proliferatif kapasitenin yitirildiği ve hücresel yaşlanmanın (senescence) başladığı bir durumu işaret eder. Dolayısıyla, SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ havuzunda TEMRA oranının minimal düzeyde kalması; bellek hücrelerinin tükenmişlik (exhaustion) profiline girmediğini ve yüksek plastisiteye sahip "sağlıklı" bir hafıza yapısının korunduğunu düşündürebilir. Ayrıca, CD4+ T hücrelerin

Özetle, $CD8^+$ T hücrelerinin aksine $CD4^+$ T hücrelerinde gözlemlediğimiz bu TCM/TEM3 baskınlığı, konağın bağışıklık sisteminde mükemmel bir "fonksiyonel iş bölümü" kurgulandığını göstermektedir. $CD8^+$ hücreleri "vurucu güç" olarak terminal efektör faza (TEMRA) ilerlerken; $CD4^+$ T hücreleri, immün yanıtı yönetmek, antikor üretimini desteklemek ve hafıza havuzunu yenilemek adına "kök hücre benzeri" özelliklerini (TCM) ve "hızlı sitokin potansiyelini" (TEM3) muhafaza eden bir denge noktasında konumlanmıştır. Bu bulgular, SARS-CoV-2'ye karşı gelişen $CD4^+$ T hücre hafızasının, varyantlardan bağımsız olarak hem hızlı reaksiyon hem de uzun ömürlü koruma sağlama kapasitesine sahip, yüksek kalitede bir yapı sergilediğini ortaya koymaktadır.

$CD4^+$ efektör bellek havuzunun TEM1, TEM2 ve TEM3 alt gruplarına ayrılması, sadece fenotipik bir sınıflandırma değil, aynı zamanda hücrelerin fonksiyonel kapasitelerindeki kademeli değişimi (progressive differentiation) yansıtan dinamik bir süreçtir. Literatürde kabul gören lineer farklılaşma modeline göre; antijenik uyarım sonrası bellek hücreleri TCM → TEM1 → TEM2 → TEM3 → TEMRA rotasını izleyerek olgunlaşır (69,70). Bu spektrumun başındaki TEM1 popülasyonu (genellikle $CD27^+$), fonksiyonel olarak merkezi bellek (TCM) hücrelerine en yakın gruptur; yüksek IL-2 üretim kapasitesine ve proliferatif potansiyele sahiptirler, ancak sitotoksik özellikleri sınırlıdır. Farklılaşma ilerledikçe, hücreler geçiş formu olan TEM2 üzerinden, kostimülatör reseptörlerini (CD27

ve/veya CD28) kaybederek TEM3 evresine ulaşır (74,75). Bulgularımızda baskın olan TEM3 fenotipi, bu sürecin "ileri efektör" aşamasını temsil eder. TEM1'in aksine, TEM3 hücreleri proliferasyon yeteneklerini kısmen feda ederek, yüksek miktarda IFN-γ, TNF-α ve sitotoksik granüller (perforin/granzim) üretme yeteneği kazanmış savaşa hazır hücrelerdir. Çalışmamızda TEM2 ara formunun en düşük frekansta, TEM3'ün ise yüksek frekansta saptanması; SARS-CoV-2 spesifik CD4+ T hücrelerinin orta evrelerde (intermediate stage) duraksamadan, hızlı bir şekilde yüksek antiviral kapasiteye sahip ileri efektör faza (TEM3) geçiş yaptığını düşündürmektedir. Bu durum, organizmanın re-enfeksiyon anında dokularda güçlü bir Th1 tipi yanıt oluşturmak üzere bellek havuzunu fonksiyonel olarak optimize ettiğini düşündürebilir.

Çalışmamızda SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin terminal farklılaşmadan (TEMRA) ziyade, proliferatif kapasitesi yüksek merkezi bellek ve efektör bellek fenotiplerinde kümelendiğine dair elde ettiğimiz bulgular, güncel literatür verileriyle güçlü bir paralellik göstermektedir. Nitekim, SARS-CoV-2 spesifik T hücrelerinin farklılaşma dinamiklerini boylamsal olarak inceleyen yakın tarihli bir çalışmada, $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre havuzlarının fenotipik kaderleri arasındaki keskin ayrım net bir şekilde ortaya konulmuştur (157,163-166). Araştırmacılar, enfeksiyon sonrası iyileşme döneminde $CD4^+$ T hücrelerinin yaklaşık %50 oranında TCM fenotipini koruduğunu, TEM oranının %35 seviyelerinde stabilize olduğunu, buna karşın TEMRA popülasyonunun %5'in altında kalan minör bir grup olarak devam ettiğini rapor etmişlerdir (50,157,163-166).

Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, varyant grubundan bağımsız olarak $CD4^+$ TCM ve TEM3 (geç efektör) alt gruplarının baskınlığı saptanırken, terminal efektör TEMRA hücrelerinin frekansının oldukça düşük düzeyde kaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, çalışmasında vurgulanan; $CD4^+$ T hücrelerinin "kök hücre benzeri" (stem-like) özelliklerini ve lenfoid organlara yerleşme kapasitelerini koruma eğiliminde olduğu, buna karşın $CD8^+$ T hücrelerinin (ilgili çalışmada TEM oranının %50'ye, TEMRA oranının %25'e ulaştığı bildirilmiştir) daha agresif bir efektör farklılaşma izlediği yönündeki "fonksiyonel iş bölümü" hipotezini doğrulamaktadır (157).

Sonuç olarak, her iki çalışmanın verileri bir arada değerlendirildiğinde; SARS-CoV-2'ye karşı gelişen $CD4^+$ T hücre hafızasının, hücresel yaşlanmaya (senescence) dirençli ve uzun vadeli immüniteyi destekleyecek stabil bir fenotipik hiyerarşi içinde muhafaza edildiği söylenebilir.

Çalışmamızın klinik bölümünde gözlemlediğimiz hücresel yanıtların moleküler temellerini aydınlatmak ve bağışıklık yanıtlarının yeni varyantlara karşı nasıl etkilendiğini anlamak amacıyla gerçekleştirilen $CD4^+$ T Hücre epitop analizi için kapsamlı hesaplamalı biyoloji yöntemleri kullanılmıştır. Bu analizlerde temel amaç; Omicron varyantları arasında Spike proteini kaynaklı $CD4^+$ T hücre tanıma süreçlerini araştırmak, immünodominant epitopları belirlemek ve varyantlar arası çapraz reaktiviteyi tanımlamaktır. Analizlerde, küresel popülasyonun %99'undan fazlasını temsil eden 27 HLA Sınıf II allelinden oluşan bir referans seti kullanılmış ve NetMHCIIpan EL 4.1 algoritması ile bağlanma kapasiteleri tahmin edilmiştir. Bu kapsamda, yüzde (percentile) skoru ≤ 10 olan epitoplar 'güçlü bağlayıcılar' olarak kabul edilerek, varyantların epitop repertuvarındaki değişimler ve HLA kısıtlamaları detaylandırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada, Omicron BA.1'deki mutasyonlar, aşılanmış ve iyileşmiş bireylerde Spike proteinine karşı $CD4^+$ T hücre yanıtında belirgin bir azalmaya yol açabildiği gösterilmiştir. Aşılı bireylerde, Omicron BA.1 varyantına karşı T hücre yanıtları, wild type suşuna kıyasla daha belirgin bir şekilde azalmıştır. İyileşmiş bireylerde ise Omicron BA.1'e karşı T hücre yanıtı daha iyi korunmuştur. WT Spike'ın 20 immünodominant CD4+ T hücresi epitopundan 15'ine karşı yanıtın kısmi veya tamamen kaybı gözlemlenmiştir (167). Literatürde bildirilen bu epitop kayıpları, çalışmamızın *in silico* bölümünde, özellikle Spike proteininde yoğunlaştığını saptadığımız epitop kayıpları ile paralellik göstermektedir (Şekil 4.23). Ancak çalışmamız, bu bölgesel kayıplara rağmen, RBD ve S2 bölgelerindeki korunan epitopların (Şekil 4.28-4.29) hücresel yanıtı sürdürmede yeterli olabileceğini ortaya koymaktadır.

Çalışmanın hesaplamalı immünoinformatik analizlerinde, güçlü bağlayıcı epitopların %85'inin mutasyonlardan etkilenmediği ve varyantlar arası 740 adet epitop-HLA çiftinin tüm varyantlarda ve wild-type spike'ta korunduğu gösterilmiştir. Gözlemlenen bu yüksek çapraz reaktivite, çalışmanın *in silico* bölümünde elde edilen

bulgularla da moleküler düzeyde desteklenmektedir. Bu durum, Wt(−) grubundaki bireylerin aşı kaynaklı bellek hücrelerinin, Omicron varyantındaki korunmuş epitopları tanıyarak neden güçlü bir aktivasyon sergilediğinin mekanistik açıklaması olarak değerlendirilebilir.

BA.2.86'daki mutasyonlara rağmen, Spike'a özgü $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin dayanıklı immün tanıma gösterdiği bildirilmiştir (168,169). Fonksiyonel analizler, BA.2.86 mutasyonlu Spike epitoplarına karşı sitokin ifadesi ve proliferatif kapasitenin benzer şekilde sürdürüldüğünü doğrulamıştır. *In silico* analizler, wild type aşılama veya enfeksiyonla indüklenen $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin çoğunun BA.2.86 dizilerini çapraz tanıyabileceğini öngörmektedir (146). BA.2.86'daki bazı lokasyona özgü mutasyonların bazı immünodominant $CD4^+$ T hücresi epitoplarının tanınmasını etkileyebileceği de belirtilmiştir (161). Nitekim çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz kapsamlı epitop haritalaması, BA.2.86 dahil tüm varyantlarda ortak olan 89 adet yüksek afiniteli epitop-HLA çiftinin varlığını göstererek (Şekil 4.28-4.29), bu çapraz tanıma potansiyelinin moleküler temelini doğrulamaktadır.

Bir çalışmada, bu varyantlardaki Spike mutasyonlarının, yakın zamanda aşılanmış bireylerde $CD4^+$ T hücre yanıtında önemli bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (167). Özellikle, 15 evrensel T yardımcı hücre epitopunu içeren havuzlarla yapılan stimülasyonda, BA.4/BA.5 varyantlarına karşı yanıt, IFN-γ, TNF-α ve IL-2 gibi sitokin üretiminde ve CD154 aktivasyon belirteci ekspresyonunda önemli düşüşler göstermiştir. Bazı epitoplar (örn. S60–74, S363–377, S399–413, S431–445, S445–459, S469–483, S484–498) önemli azalma gösterirken, diğerleri (örn. S141–155, S337–351) korunmuş yanıtlar sergilemiştir. HLA bağlayıcılığının korunmasının T hücresi tanınmasının sürdürüldüğü anlamına gelmediği, çünkü T hücre reseptörü tanınmasının da önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (167). Bu nedenle, *in silico* analizlerimizde HLA bağlayıcılığı korunan epitopların (özellikle 'unaffected' grubundakilerin), *in vitro* deneylerimizde gözlemlediğimiz güçlü T hücre aktivasyonunun potansiyel hedefleri olduğu, ancak mutasyona uğrayıp bağlayıcılığını koruyan (mutated but present) epitopların TCR tanıması açısından deneysel olarak ayrıca doğrulanması gerektiği unutulmamalıdır.

ImmunomeBrowser aracı ile oluşturulan grafikler, wild-type Spike proteininin geniş ve sürekli bir epitop kapsama alanına sahip olduğunu göstermektedir. Buna

karşın, Omicron alt varyantlarında (NB.1.8.1, LP.8.1, XEC, JN.1 ve BA.2.86) epitop yanıt frekansı daha düzensiz ve parçalı bir dağılım sergilemektedir. Sık gözlenen boşluklar, immün kaçış veya epitop kaybı ihtimaline işaret etmektedir. Bu durum, varyantlardaki immünodominant bölgelerin evrimsel olarak değişebileceğini gösterir. Bunun yanında, bağlanma afinitesindeki değişimlerin (Fold-Change) incelendiği analiz sonucunda, varyant ve wild-type Spike proteinleri arasında eşleşen tüm peptit–allel çiftlerinde FC değerlerine göre bağlanma afinitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu, değerlendirilen varyantlardaki peptit-allel çiftlerinin wild-type Spike ile eşleşen tüm çiftlerinde skor oranlarında bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

Wild-type Spike ve diğer varyantların epitop-HLA allel bağlanma analizine göre spike proteininin en yüksek sayıda güçlü bağlayıcı peptit–HLA allel çiftine sahip olduğunu doğrulamıştır (1514 çift). Bu beklenen bir durumdur, çünkü Omicron varyantları bu epitopları bozabilecek mutasyonlar biriktirmiştir. 740 peptit–HLA allel çifti, tüm varyantlar ve wild-type Spike proteininde korunmuş bulunmuştur. Bu durum, mutasyonlara rağmen çok sayıda peptit–HLA çiftinin korunduğunu ve T hücre hedeflerinin büyük ölçüde korunduğunu düşündürmektedir. Bu bölgeler, varyantlar arası aşı tasarımı veya geniş kapsamlı bağışıklık izleme için ideal hedefler olabilir. Ancak, 612 peptit–HLA allel çifti yalnızca wild-type Spike'ta bulunurken, bu epitoplar muhtemelen Omicron varyantlarında kaybolmuş veya mutasyona uğramıştır. Bu durum, Omicron varyantlarında belirgin bir bağışıklıktan kaçış potansiyeline işaret etmektedir. Bu da tekrar enfeksiyonları veya aşı sonrası karşılaşmalarda T hücresi hafızasının daha zayıf hatırlanmasını veya bağışıklık yanıtının modülasyonunu açıklayabilir. Varyantlar arası örtüşmelerin olması, epitop profillerinin giderek farklılaştığını göstermektedir. Bazı peptit–HLA çiftlerinin yalnızca bazı yeni varyantlar arasında paylaşılıyor olması, bu varyantların yakın bir ortak ataya sahip olabileceğini veya benzer evrimsel baskılar altında benzer değişimler geçirdiğini (yakınsak evrim) düşündürebilir. Omicron alt varyantlarının wild-type Spike proteininden türetilen epitopları ne ölçüde kaybettiği değerlendirildiğinde, LP.8.1 varyantı en fazla sayıda epitop–allel çiftini kaybeden varyant olarak öne çıkmıştır (wild-type referansına kıyasla 429 çift), onu NB.1.8.1 (389 çift) ve XEC (382 çift) takip etmektedir. Bu grafik, alt varyantlar arasında değişen düzeylerde bağışıklıktan kaçış potansiyelini gösterir. Bunun yanında, toplamda, JN.1'da bulunan ancak LP.8.1,

NB.1.8.1 ve XEC'nin tamamında kaybedilmiş olan 75 peptit–allel çifti belirlenmiştir. Bu kayıplar, mevcut varyantların önceden oluşmuş T hücresi bağışıklığından kaçış potansiyelini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda, Wild type suşundan itibaren erken dönem Omicron varyantlarında (BA.2.86 ve JN.1) korunan ancak daha yeni varyantlarda (LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC) kaybedilen epitopların analizi, viral evrimin dinamikleri hakkında çarpıcı sonuçlar ortaya koymuştur. Analizlerde, Wild type ve JN.1 varyantında ortak olarak bulunan 75 adet epitop-HLA çiftinin, BA.2.86 varyantında mevcut olmadığı; buna karşılık hem JN.1 hem de BA.2.86'da ortak olarak bulunup daha sonraki varyantlarda kaybedilen hiçbir epitopun olmadığı belirlenmiştir. Bu durum iki önemli immünolojik çıkarıma işaret edebilir. Erken ayrışma ve soy farklılaşması bunlardan biridir. JN.1 ve BA.2.86 varyantları, filogenetik olarak ilişkili olsalar da CD4+ T hücresi epitop repertuvarı açısından belirgin bir farklılaşma sergilemektedir. JN.1'in, Ata suşuna ait bu 75 epitopu korumuş olması, ancak BA.2.86'nın bu epitopları daha erken bir evrede kaybetmiş olması, bu iki varyantın T hücresi baskısından kaçışta farklı mutasyonel patikaları izlediğini göstermektedir. Bir diğer çıkarım ise JN.1 soyunda devam eden toplu bir epitop kaybı olgusudur. LP.8.1, NB.1.8.1 ve XEC varyantlarının, JN.1'de halen var olan bu 75 epitopu topluca kaybetmesi, bu yeni varyantların JN.1 soyu üzerinden evrimleşirken, Ata suşundan kalan son immünolojik "izleri" de silmeye yönelik aktif bir seçilim baskısı altında olduklarını düşündürmektedir. Bu kayıpların özellikle Spike proteininin N-terminal bölgesinde (NTD) yoğunlaşması, virüsün bu bölgedeki mutasyonlarla T hücresi tanınırlığını kademeli olarak azalttığını ve immün kaçışın statik değil, varyant soyuna özgü dinamik bir süreç olarak işlediğini doğrulamaktadır.

$CD4^+$ T hücre epitop analizleri, SARS-CoV-2'nin evrimi ile birlikte antijenik değişimlerin T hücre yanıtları üzerindeki etkisini detaylı bir şekilde ortaya koymuştur. Bulgular, virüsün farklı varyantları arasında hem korunmuş (çapraz reaktif) epitopların varlığını hem de varyanta özgü epitop kayıplarını göstermektedir. Özellikle, bazı yeni Omicron alt varyantlarının (LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) daha önceki Omicron varyantlarında (JN.1, BA.2.86) bulunan epitopları kaybetmesi, Original Antigenic Sin kavramının COVID-19 bağlamındaki önemini vurgulamaktadır. OAS, daha önceki bir enfeksiyon veya aşılamadan kaynaklanan bağışıklık yanıtının, yeni

bir varyanta karşı verilen yanıtı etkilemesi durumunu ifade eder. Bu kayıplar, bağışıklık sisteminin OAS etkisiyle baskın olarak önceki hafıza yanıtına odaklanması durumunda, virüsün bu hafıza hedeflerini (epitopları) elimine etmiş olması nedeniyle, koruyucu etkinliğin azalabileceğine işaret etmektedir.

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 varyantlarına karşı geniş spektrumlu koruma sağlayabilecek T hücresi hedeflerini belirlemek amacıyla, epitopların HLA sınıf II moleküllerine bağlanma afiniteleri kademeli eşik değerleri (≤%10, ≤%5, ≤%2 ve ≤%1) üzerinden analiz edilmiştir. Analizlerde, geniş bir bağlanma spektrumunu temsil eden ≤%10 yüzdelik eşiğinde, incelenen tüm varyantlarda (Ancestral, BA.2.86, JN.1, LP.8.1, NB.1.8.1, XEC) ortak olan 740 adet epitop-HLA çiftinin korunduğu saptanmıştır. Bu geniş havuzun varlığı, Spike proteinindeki yoğun mutasyon birikimine rağmen, hücresel bağışıklık için gerekli hedeflerin önemli bir kısmının varyantlar arasında yapısal olarak muhafaza edildiğini doğrulamaktadır.

Ancak, aşı adaylarının belirlenmesinde kritik olan 'bağlanma gücü' kriteri sıkılaştırıldığında, HLA lokuslarının epitop sunumundaki rollerinde çarpıcı bir değişim gözlemlenmiştir. Genel havuzda (≤%10 ve ≤%5) HLA-DR lokusu, sunulan epitopların yarısından fazlasını (%56-59) oluşturarak baskın bir profil çizerken; en yüksek afiniteli (≤%1) 'süper bağlayıcı' epitoplar incelendiğinde HLA-DP lokusunun öneminin belirgin şekilde arttığı tespit edilmiştir. En dar filtrelemede (n=89 çift), DP lokusunun sunduğu epitop sayısının (n=37), DR lokusu (n=40) ile neredeyse eşitlendiği görülmüştür. Hatta, en yüksek afiniteli korunmuş epitopları sunan ilk üç allelin tamamının HLA-DP heterodimerleri olması (HLA-DPA1*03:01/DPB1*04:02 vb.), SARS-CoV-2'ye karşı güçlü ve varyanttan bağımsız T hücresi yanıtlarının tetiklenmesinde DP allellerinin, en az DR allelleri kadar kritik bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada tanımlanan bu 89 adet yüksek afiniteli ve %100 korunmuş epitop-HLA çifti, viral evrimden etkilenmeyen 'çekirdek' bağışıklık bölgelerini temsil etmektedir. Bu bulgular, gelecekteki evrensel (pan-sarbecovirus) aşı tasarımlarında sadece HLA-DR odaklı yaklaşımların ötesine geçilerek, HLA-DP kısıtlamalı epitopların da formülasyonlara dahil edilmesinin, aşının indükleyeceği hücresel yanıtın kalitesini ve kalıcılığını artırabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışma, mevcut bağışıklığın (hem doğal enfeksiyon hem de aşılanma ile kazanılan) yeni varyantlara karşı esnek bir T hücresi yanıt kapasitesine sahip olduğunu, aynı zamanda virüsün bir bağışıklık kaçış stratejisi izlediğini ortaya koymaktadır. Bu tür kapsamlı epitop analizleri, aşı ve tedavi yaklaşımlarının iyileştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Çalışmamız, sadece varyantlara özgü kaçışları belgelemekle kalmamış, aynı zamanda tüm varyantlarda yapısal olarak korunan 89 adet yüksek afiniteli epitop-HLA çiftini tanımlayarak, gelecekteki evrensel (pan-sarbecovirus) aşı tasarımları için somut ve stratejik hedefler sunmuştur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Enfeksiyon geçmişinin varyanta özgü bağışıklık yanıtını şekillendirdiği saptanmıştır. Doğal enfeksiyon geçmişi olmayan (Wt(−)) grubun, Omicron varyantına karşı efektör bellek (TEM3) yanıtını hibrit bağışıklık grubuna (Wt(+)) kıyasla anlamlı düzeyde yüksek oluşturması, daha önce baskılanmamış (naif) bir immün sistemin yeni varyantlara karşı adaptasyon yeteneğinin ve esnekliğinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

SARS-CoV-2 spesifik $CD4^+$ T hücre belleğinin enfeksiyondan 9 ay sonra dahi korunduğu; hücrelerin terminal farklılaşmaya (TEMRA) gitmek yerine, uzun vadeli rezervi sağlayan merkezi bellek (TCM) ve dokuya hızlı müdahale potansiyeli taşıyan efektör bellek (TEM3) fenotiplerinde yoğunlaştığı belirlenmiştir.

Omicron varyantlarındaki yoğun mutasyonlara rağmen, hücresel bağışıklığın hedefi olan epitopların %85 oranında korunduğu hesaplamalı yöntemlerle kanıtlanmıştır. Özellikle HLA-DR ve HLA-DP allelleri tarafından sunulan ve varyantlar arası çapraz reaktiviteyi sağlayan 89 adet yüksek afiniteli epitop çiftinin varlığı, T hücresi yanıtının viral kaçışa karşı daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmada yüksek sayıda katılımcının dâhil edilmesi, elde edilen bu bulguların güvenilirliğini ve genellenebilirliğini artırmaktadır. Ancak $CD4^+$ T hücre yanıtlarının dinamik doğası göz önüne alındığında, bağışıklık yanıtlarının uzun vadeli seyrini daha iyi anlayabilmek adına ileriye dönük uzun süreli kohort çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle, antijen spesifik $CD4^+$ T hücrelerinin yalnızca frekanslarının değil, aynı zamanda fonksiyonel kapasitelerinin de değerlendirilmesi, SARS-CoV-2'ye karşı hücresel bağışıklığın kalitesini daha doğru biçimde ortaya koyacaktır.

Bu çalışma, SARS-CoV-2 Omicron varyantına karşı gelişen uzun süreli bellek T hücresi yanıtlarını ayrıntılı bir şekilde ortaya koymuş olsa da bulguların yorumlanmasında dikkate alınması gereken bazı kısıtlılıklar mevcuttur. Çalışmanın temel odağı hücresel bağışıklık üzerine yoğunlaşmış, ancak katılımcıların nötralizan antikor (nAb) ve SARS-CoV-2 spesifik bellek B hücresi yanıtları eş zamanlı olarak değerlendirilmemiştir. Nötralizan antikorlar o anki serolojik korumayı yansıtırken, bellek B hücrelerinin analizi, immün sistemin virüsle tekrar karşılaştığında hızlı ve

güçlü antikor üretme kapasitesini (anamnestik yanıt) ortaya koyması açısından kritik bir veri sağlayacaktı. Bu hücrelerin deney düzeneğine dahil edilmesi, saptadığımız yardımcı T hücre (Th) desteğinin humoral hafızanın sürdürülmesi üzerindeki etkisini somutlaştırmamıza ve edinsel bağışıklığın iki ana kolu arasındaki korelasyonu bütüncül bir şekilde analiz etmemize olanak tanıyabilirdi. Bu eksiklik, Omicron varyantına karşı gelişen hibrit bağışıklık profilinin humoral ayağının tam olarak karakterize edilmesini sınırlamıştır.

Buna ek olarak, analizlerde virüsün S proteini hedef alınmış; N, M veya E gibi diğer yapısal proteinlere karşı gelişen T hücresi yanıtları değerlendirilmemiştir. Ayrıca, örnekleme süreci pandeminin ileri evrelerinde gerçekleştiği için, virüsle hiç temas etmemiş "naif" sağlıklı bireylerden oluşan bir kontrol grubunun oluşturulması mümkün olmamıştır. Veri toplama stratejisi açısından, analizlerin tek bir zaman kesitinde (cross-sectional) gerçekleştirilmiş olması, bağışıklık hafızasının boylamsal (longitudinal) olarak izlenmesine olanak vermemiştir. Son olarak, G*Power analiziyle hedeflenen 102 katılımcı sayısına operasyonel zorluklar nedeniyle ulaşılamamış olsa da, 94 katılımcı ile gerçekleştirilen post-hoc güç analizleri, mevcut sayının istatistiksel güvenilirlik için yeterli eşiği karşıladığını göstermektedir.

Gelecek çalışmalarda, CD69 ve CD137 ile gerçekleştirilen aktivasyon temelli (AIM) analizlerin ötesine geçilerek, T hücrelerinin efektör fonksiyonlarını karakterize etmek amacıyla hücre içi sitokin boyama (ICS ile IL-2, IFN-γ) ve sitotoksik potansiyeli gösteren (Granzyme B, Perforin) analizler eklenmelidir. Bu yaklaşımlar, polifonksiyonel özellik gösteren virüs-spesifik bellek $CD4^+$ T hücrelerinin tanımlanmasına imkân tanıyacaktır.

Çalışmamızda kullanılan hesaplamalı biyoloji yöntemleriyle tespit edilen ve tüm varyantlarda korunduğu gösterilen 89 adet yüksek afiniteli epitop-HLA çifti, gelecekte deneysel validasyonla desteklenmelidir. Bu validasyon sürecinde, öncelikle bireylerin HLA sınıf II genotiplerinin yüksek çözünürlüklü HLA profilleme yöntemleriyle belirlenmesi ve genetik yatkınlıkların netleştirilmesi gerekmektedir. Ardından, *in silico* olarak öngörülen bu epitopların antijen spesifik T hücreleri tarafından fiziksel olarak tanındığının, MHC sınıf II tetramer teknolojisi kullanılarak *ex vivo* düzeyde ve yüksek hassasiyetle doğrulanması kritik önem taşımaktadır. Özellikle bulgularımızda öne çıkan HLA-DP allelleri tarafından sunulan epitopların

immünojenisitesinin bu ileri moleküler tekniklerle araştırılması, aşı tasarımlarında göz ardı edilen potansiyel hedefleri ortaya çıkarabilir.

Bu doğrultuda yapılacak ileri çalışmalar, mutasyonların yoğunlaştığı Spike üzerindeki çeşitli bölgeler yerine, çalışmamızda kararlı olduğu saptanan bölgeleri hedefleyen evrensel aşı stratejilerine zemin hazırlayacaktır. Bu bilgiler, Türk popülasyonuna özgü HLA dağılımı ile uyumlu, bölgesel ve etnik temelli aşı dizaynına da bilimsel katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

1. Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., Sharma, A., Kumar, A., & Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 10(4), 821.
2. Piacentini, S., Riccio, A., Santopolo, S., Pauciullo, S., La Frazia, S., Rossi, A., Rossignol, J. F., & Santoro, M. G. (2023). The FDA-approved drug nitazoxanide is a potent inhibitor of human seasonal coronaviruses acting at postentry level: effect on the viral spike glycoprotein. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1206951.
3. Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, 5(4), 536–544.
4. Lee, G., Budhathoki, S., Lee, G. Y., Oh, K. J., Ham, Y. K., Kim, Y. J., Lim, Y. R., Hoang, P. T., Lee, Y., Lim, S. W., Kim, J. M., Cho, S., Kim, T. H., Song, J. W., Lee, S., & Kim, W. K. (2021). Broad-spectrum antiviral activity of 3D8, a nucleic acid-hydrolyzing single-chain variable fragment (scfv), targeting SARS-CoV-2 and multiple coronaviruses *in vitro*. *Viruses*, 13(4), 650.
5. Sriwilaijaroen, N., & Suzuki, Y. (2020). Host receptors of influenza viruses and coronaviruses-molecular mechanisms of recognition. *Vaccines,* 8(4), 587.
6. Low, Z., Yip, A., Sharma, A., & Lal, S. (2021). Sars coronavirus outbreaks past and present—a comparative analysis of SARS-CoV-2 and its predecessors. *Virus Genes*, 57(4), 307-317.
7. Zhang, Y., Zhang, X., Zheng, H., & Liu, L. (2022). Subgenomic RNAs and their encoded proteins contribute to the rapid duplication of SARS-CoV-2 and COVID-19 progression. *Biomolecules*, 12(11), 1680.
8. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., & Pöhlmann, S. (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular Cell*, 78(4), 779–784.e5.
9. Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J., & Glaunsinger, B. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910-12934.
10. Shah, A., Rashid, F., Aziz, A., Jan, A., & Suleman, M. (2020). Genetic characterization of structural and open reading fram-8 proteins of SARS-CoV-2 isolates from different countries. *Gene Reports*, 21, 100886.
11. Yao, H., Song, Y., Chen, Y., Wu, N., Xu, J., Sun, C., Zhang, J., Weng, T., Zhang, Z., Wu, Z., Cheng, L., Shi, D., Lu, X., Lei, J., Crispin, M., Shi, Y., Li, L., & Li, S. (2020). Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. *Cell*, 183(3), 730–738.e13.
12. Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6.
13. Kim, D., Lee, J., Yang, J., Kim, J., Kim, V., & Chang, H. (2020). The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 181(4), 914-921.e10.
14. Hardenbrook, N. J., & Zhang, P. (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology*, 52, 123–134.
15. Low, Z. Y., Zabidi, N. Z., Yip, A. J. W., Puniyamurti, A., Chow, V. T. K., & Lal, S. K. (2022). SARS-CoV-2 Non-structural proteins and their roles in host ımmune evasion. *Viruses,* 14(9), 1991.
16. Ji, D., Juhas, M., Tsang, C. M., Kwok, C. K., Li, Y., & Zhang, Y. (2021). Discovery of G-quadruplex-forming sequences in SARS-CoV-2. *Briefings in Bioinformatics*, 22(2), 1150–1160.
17. Lavigne, M., Helynck, O., Rigolet, P., Boudria-Souilah, R., Nowakowski, M., Baron, B., Brülé, S., Hoos, S., Raynal, B., Guittat, L., Beauvineau, C., Petres, S., Granzhan, A., Guillon, J., Pratviel, G., Teulade-Fichou, M. P., England, P., Mergny, J. L., & Munier-Lehmann, H. (2021). SARS-CoV-2 Nsp3 unique domain SUD interacts with guanine quadruplexes and G4-ligands inhibit this interaction. *Nucleic Acids Research*, 49(13), 7695–7712.
18. Carabelli, A. M., Peacock, T. P., Thorne, L. G., Harvey, W. T., Hughes, J., COVID-19 Genomics UK Consortium, Peacock, S. J., Barclay, W. S., de Silva, T. I., Towers, G. J., & Robertson, D. L. (2023). SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews. Microbiology*, 21(3), 162–177.

19. Cai, Y., Zhang, J., Xiao, T., Peng, H., Sterling, S. M., Walsh, R. M., Jr, Rawson, S., Rits-Volloch, S., & Chen, B. (2020). Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6511), 1586–1592.
20. Almehdi, A. M., Khoder, G., Alchakee, A. S., Alsayyid, A. T., Sarg, N. H., & Soliman, S. S. M. (2021). SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection*, 49(5), 855–876.
21. Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., & Chen, B. (2021). Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Current Opinion in Virology*, 50, 173–182.
22. Muralidar, S., Gopal, G., & Visaga Ambi, S. (2021). Targeting the viral-entry facilitators of SARS-CoV-2 as a therapeutic strategy in COVID-19. *Journal of Medical Virology*, 93(9), 5260–5276.
23. Flores-Vega, V. R., Monroy-Molina, J. V., Jiménez-Hernández, L. E., Torres, A. G., Santos-Preciado, J. I., & Rosales-Reyes, R. (2022). SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants. *Viruses*, 14(4), 653.
24. Hill, V., Du Plessis, L., Peacock, T. P., Aggarwal, D., Colquhoun, R., Carabelli, A. M., Ellaby, N., Gallagher, E., Groves, N., Jackson, B., McCrone, J. T., O'Toole, Á., Price, A., Sanderson, T., Scher, E., Southgate, J., Volz, E., Barclay, W. S., Barrett, J. C., Chand, M., … Rambaut, A. (2022). The origins and molecular evolution of SARS-CoV-2 lineage B.1.1.7 in the UK. *Virus Evolution*, 8(2), veac080.
25. Tao, K., Tzou, P. L., Nouhin, J., Gupta, R. K., de Oliveira, T., Kosakovsky Pond, S. L., Fera, D., & Shafer, R. W. (2021). The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews. Genetics*, 22(12), 757–773.
26. Adhikari, P., Jawad, B., Podgornik, R., & Ching, W. Y. (2022). Mutations of omicron variant at the ınterface of the receptor domain motif and human angiotensin-converting enzyme-2. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(5), 2870.
27. Chaguza, C., Hahn, A. M., Petrone, M. E., Zhou, S., Ferguson, D., Breban, M. I., Pham, K., Peña-Hernández, M. A., Castaldi, C., Hill, V., Yale SARS-CoV-2 Genomic Surveillance Initiative, Schulz, W., Swanstrom, R. I., Roberts, S. C., & Grubaugh, N. D. (2023). Accelerated SARS-CoV-2 intrahost evolution leading to distinct genotypes during chronic infection. *Cell Reports. Medicine*, 4(2), 100943.
28. Gonzalez-Reiche, A. S., Alshammary, H., Schaefer, S., Patel, G., Polanco, J., Carreño, J. M., Amoako, A. A., Rooker, A., Cognigni, C., Floda, D., van de Guchte, A., Khalil, Z., Farrugia, K., Assad, N., Zhang, J., Alburquerque, B., PARIS/PSP study group, Sominsky, L. A., Gleason, C., Srivastava, K., … van Bakel, H. (2023). Sequential intrahost evolution and onward transmission of SARS-CoV-2 variants. *Nature Communications*, 14(1), 3235.
29. Korber, B., Fischer, W. M., Gnanakaran, S., Yoon, H., Theiler, J., Abfalterer, W., Hengartner, N., Giorgi, E. E., Bhattacharya, T., Foley, B., Hastie, K. M., Parker, M. D., Partridge, D. G., Evans, C. M., Freeman, T. M., de Silva, T. I., Sheffield COVID-19 Genomics Group, McDanal, C., Perez, L. G., Tang, H., … Montefiori, D. C. (2020). Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell*, 182(4), 812–827.e19.
30. Yadav, P. D., Nyayanit, D. A., Majumdar, T., Patil, S., Kaur, H., Gupta, N., Shete, A. M., Pandit, P., Kumar, A., Aggarwal, N., Narayan, J., Vijay, N., Kalawat, U., Sugunan, A. P., Munivenkatappa, A., Sharma, T., Devi, S., Majumdar, T., Jaryal, S., Bakshi, R., … Bhargava, B. (2021). An epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genomic sequences from different regions of India. *Viruses*, 13(5), 925.
31. Parsons, R. J., & Acharya, P. (2023). Evolution of the SARS-CoV-2 Omicron spike. *Cell Reports*, 42(12), 113444.
32. Xia, S., Wang, L., Zhu, Y., Lu, L., & Jiang, S. (2022). Origin, virological features, immune evasion and intervention of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Signal Transduction And Targeted Therapy*, 7(1), 241.
33. Saxena, S. K., Kumar, S., Ansari, S., Paweska, J. T., Maurya, V. K., Tripathi, A. K., & Abdel-Moneim, A. S. (2022). Characterization of the novel SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) variant of concern and its global perspective. *Journal of Medical Virology*, 94(4), 1738–1744.
34. Wang, Q., Guo, Y., Liu, L., Schwanz, L. T., Li, Z., Nair, M. S., Ho, J., Zhang, R. M., Iketani, S., Yu, J., Huang, Y., Qu, Y., Valdez, R., Lauring, A. S., Huang, Y., Gordon, A., Wang, H. H., Liu, L., & Ho, D. D. (2023). Antigenicity and receptor affinity of SARS-CoV-2 BA.2.86 spike. *Nature*, 624(7992), 639–644.

35. Lewnard, J. A., Mahale, P., Malden, D., Hong, V., Ackerson, B. K., Lewin, B. J., Link-Gelles, R., Feldstein, L. R., Lipsitch, M., & Tartof, S. Y. (2024). Immune escape and attenuated severity associated with the SARS-CoV-2 BA.2.86/JN.1 lineage. *Nature Communications*, 15(1), 8550.
36. Mellis, I. A., Wu, M., Hong, H., Tzang, C. C., Bowen, A., Wang, Q., Gherasim, C., Pierce, V. M., Shah, J. G., Purpura, L. J., Yin, M. T., Gordon, A., Guo, Y., & Ho, D. D. (2025). Antibody evasion and receptor binding of SARS-CoV-2 LP.8.1.1, NB.1.8.1, XFG, and related subvariants. *Cell Reports*, 44(10), 116440.
37. Aljabali, A. A. A., Lundstrom, K., Hromić-Jahjefendić, A., El-Baky, N. A., Nawn, D., Hassan, S. S., Rubio-Casillas, A., Redwan, E. M., & Uversky, V. N. (2025). The XEC variant: genomic evolution, ımmune evasion, and public health ımplications. *Viruses*, 17(7), 985.
38. Benlarbi, M., Ding, S., Bélanger, É., Tauzin, A., Poujol, R., Medjahed, H., El Ferri, O., Bo, Y., Bourassa, C., Hussin, J., Fafard, J., Pazgier, M., Levade, I., Abrams, C., Côté, M., & Finzi, A. (2024). Temperature-dependent Spike-ACE2 interaction of Omicron subvariants is associated with viral transmission. *mBio*, 15(8), e0090724.
39. Wang, Q., Guo, Y., Casner, R. G., Yu, J., Nair, M. S., Ho, J., Reddem, E. R., Mellis, I. A., Wu, M., Tzang, C. C., Hong, H., Huang, Y., Shapiro, L., Liu, L., & Ho, D. D. (2025). Optimizing a human monoclonal antibody for better neutralization of SARS-CoV-2. *Nature Comm*unications, 16(1), 6195.
40. Lundrigan, E., Toudic, C., Pennock, E., & Pezacki, J. P. (2024). SARS-CoV-2 Protein Nsp9 Is Involved in Viral Evasion through Interactions with Innate Immune Pathways. *ACS Omega*, 9(24), 26428–26438.
41. Sievers, B. L., Cheng, M. T. K., Csiba, K., Meng, B., & Gupta, R. K. (2024). SARS-CoV-2 and innate immunity: the good, the bad, and the "goldilocks". *Cellular & Molecular Immunology*, 21(2), 171–183.
42. Zou, H. M., Huang, Z. F., Yang, Y., Luo, W. W., Wang, S. Y., Luo, M. H., Fu, Y. Z., & Wang, Y. Y. (2020). Human Cytomegalovirus Protein UL94 Targets MITA to Evade the Antiviral Immune Response. *Journal of Virology*, 94(12), e00022-20.
43. Gambadauro, A., Galletta, F., Li Pomi, A., Manti, S., & Piedimonte, G. (2024). Immune Response to Respiratory Viral Infections. *International Journal Of Molecular Sciences*, 25(11), 6178.
44. Leon, C., Tokarev, A., Bouchnita, A., & Volpert, V. (2023). Modelling of the ınnate and adaptive immune response to SARS viral infection, cytokine storm and vaccination. V*accine*s, 11(1), 127.
45. Martín-Vicente, M., Resino, S., & Martínez, I. (2022). Early innate immune response triggered by the human respiratory syncytial virus and its regulation by ubiquitination/deubiquitination processes. *Journal Of Biomedical Science*, 29(1), 11.
46. Sette, A., & Crotty, S. (2021). Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, 184(4), 861–880.
47. Hamdan, T. A., Bhat, H., Cham, L. B., Adomati, T., Lang, J., Li, F., Murtaza, A., Hardt, C., Lang, P. A., Duhan, V., & Lang, K. S. (2020). Map3k14 as a regulator of innate and adaptive immune response during acute viral infection. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(2), 96.
48. Pons, S., Uhel, F., Frapy, E., Sérémé, Y., Zafrani, L., Aschard, H., & Skurnik, D. (2023). How protective are antibodies to SARS-CoV-2, the main weapon of the B-cell response?. *Stem Cell Reviews And Reports*, 19(3), 585–600.
49. van Dam, K. P. J., Volkers, A. G., Wieske, L., Stalman, E. W., Kummer, L. Y. L., van Kempen, Z. L. E., Killestein, J., Tas, S. W., Boekel, L., Wolbink, G. J., van der Kooi, A. J., Raaphorst, J., Takkenberg, R. B., D'Haens, G. R. A. M., Spuls, P. I., Bekkenk, M. W., Musters, A. H., Post, N. F., Bosma, A. L., Hilhorst, M. L., … T2B! Immunity against SARS-CoV-2 study group (2023). Primary SARS-CoV-2 infection in patients with immune-mediated inflammatory diseases: long-term humoral immune responses and effects on disease activity. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 332.
50. 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.
51. Li, Y., Lu, J., He, L., Jiang, C., Bao, Y., Ji, P., Xu, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2025). Repeated omicron infections overcome T cell immune imprinting to original SARS-CoV-2. *Journal of Medical Virology*, 97(2), e70264.
52. Hilligan, K. L., & Ronchese, F. (2020). Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cellular & Molecular İmmunology*, 17(6), 587–599.

53. Landry, S. J., Mettu, R. R., Kolls, J. K., Aberle, J. H., Norton, E., Zwezdaryk, K., & Robinson, J. (2023). Structural framework for analysis of CD4+ T-cell epitope dominance in viral fusion proteins. *Biochemistry,* 62(17), 2517–2529.
54. Kervevan, J., & Chakrabarti, L. A. (2021). Role of CD4+ T cells in the control of viral infections: recent advances and open questions. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(2), 523.
55. Osum, K. C., & Jenkins, M. K. (2023). Toward a general model of CD4+ T cell subset specification and memory cell formation. *Immunity*, 56(3), 475–484.
56. Ueda, H., Morphew, M. K., McIntosh, J. R., & Davis, M. M. (2011). CD4+ T-cell synapses involve multiple distinct stages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(41), 17099–17104.
57. Molon, B., Liboni, C., & Viola, A. (2022). CD28 and chemokine receptors: Signalling amplifiers at the immunological synapse. *Frontiers in Immunology*, 13, 938004.
58. Meitei, H. T., & Lal, G. (2023). T cell receptor signaling in the differentiation and plasticity of CD4+ T cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 69, 14–27.
59. Adu-Berchie, K., Obuseh, F. O., & Mooney, D. J. (2023). T Cell Development and Function. *Rejuvenation Research*, 26(4), 126–138.
60. Rogozynski, N. P., & Dixon, B. (2024). The Th1/Th2 paradigm: A misrepresentation of helper T cell plasticity. *Immunology Letters*, 268, 106870.
61. Read, K. A., Powell, M. D., Sreekumar, B. K., & Oestreich, K. J. (2019). In vitro differentiation of effector CD4+ T helper cell subsets. *Methods in Molecular Biology(Clifton, N.J.)*,1960,75-84.
62. Zielinski C. E. (2023). T helper cell subsets: diversification of the field. *European Journal of Immunology*, 53(12), e2250218.
63. Zhang, C., Li, J., Cheng, Y., Meng, F., Song, J. W., Fan, X., Fan, H., Li, J., Fu, Y. L., Zhou, M. J., Hu, W., Wang, S. Y., Fu, Y. J., Zhang, J. Y., Xu, R. N., Shi, M., Hu, X., Zhang, Z., Ren, X., & Wang, F. S. (2023). Single-cell RNA sequencing reveals intrahepatic and peripheral immune characteristics related to disease phases in HBV-infected patients. *Gut*, 72(1), 153–167.
64. Lopez-Scarim, J., Mendoza, D., Nambiar, S. M., & Billerbeck, E. (2024). CD4+ T cell help during early acute hepacivirus infection is critical for viral clearance and the generation of a liver-homing CD103+CD49a+ effector CD8+ T cell subset. *PLoS Pathogens*, 20(10), e1012615.
65. Shaan Lakshmanappa, Y., Elizaldi, S. R., Roh, J. W., Schmidt, B. A., Carroll, T. D., Weaver, K. D., Smith, J. C., Verma, A., Deere, J. D., Dutra, J., Stone, M., Franz, S., Sammak, R. L., Olstad, K. J., Rachel Reader, J., Ma, Z. M., Nguyen, N. K., Watanabe, J., Usachenko, J., Immareddy, R., … Iyer, S. S. (2021). SARS-CoV-2 induces robust germinal center CD4 T follicular helper cell responses in rhesus macaques. *Nature Communications*, 12(1), 541.
66. Hobbs, S. J., Harbour, J. C., Yates, P. A., Ortiz, D., Landfear, S. M., & Nolz, J. C. (2020). Vaccinia Virus Vectors Targeting Peptides for MHC Class II Presentation to CD4+ T Cells. *ImmunoHorizons*, 4(1), 1–13.
67. 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), e0285728.
68. Narr, K., Ertuna, Y. I., Fallet, B., Cornille, K., Dimitrova, M., Marx, A. F., Martin, K., Abreu Mota, T., Künzli, M., Schreiner, D., Brunner, T. M., Kreutzfeldt, M., Wagner, I., Geier, F., Bestmann, L., Löhning, M., Merkler, D., King, C. G., & Pinschewer, D. D. (2021). Vaccine-elicited CD4 T cells prevent the deletion of antiviral B cells in chronic infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(46), e2108157118.
69. Bugya, Z., Prechl, J., Szénási, T., Nemes, É., Bácsi, A., & Koncz, G. (2021). Multiple Levels of Immunological Memory and Their Association with Vaccination. *Vaccines*, 9(2), 174.
70. Gray, J. I., Westerhof, L. M., & MacLeod, M. K. L. (2018). The roles of resident, central and effector memory CD4 T-cells in protective immunity following infection or vaccination. *Immunology*, 154(4), 574–581.
71. Matyushenko, V., Isakova-Sivak, I., Kudryavtsev, I., Goshina, A., Chistyakova, A., Stepanova, E., Prokopenko, P., Sychev, I., & Rudenko, L. (2021). Detection of IFNγ-Secreting CD4+ and CD8+ Memory T Cells in COVID-19 Convalescents after Stimulation of Peripheral Blood Mononuclear Cells with Live SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(8), 1490.
72. Painter, M. M., Mathew, D., Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Pattekar, A., Kuthuru, O., Baxter, A. E., Herati, R. S., Oldridge, D. A., Gouma, S., Hicks, P., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Giles, J. R., Weirick, M. E., McAllister, C. M., … Wherry, E. J. (2021). Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells is associated with

coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity*, 54(9), 2133–2142.e3.
73. Weiskopf, D., Schmitz, K. S., Raadsen, M. P., Grifoni, A., Okba, N. M. A., Endeman, H., van den Akker, J. P. C., Molenkamp, R., Koopmans, M. P. G., van Gorp, E. C. M., Haagmans, B. L., de Swart, R. L., Sette, A., & de Vries, R. D. (2020). Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome. *Science Immunology*, 5(48), eabd2071.
74. Opstelten, R., Suwandi, J. S., Slot, M. C., Morgana, F., Scott, A. M., Laban, S., Nikolic, T., Turksma, A. W., Kroeze, A., Voermans, C., Zwaginga, J. J., Roep, B. O., & Amsen, D. (2021). GPA33 is expressed on multiple human blood cell types and distinguishes CD4+ central memory T cells with and without effector function. *European Journal Of Immunology*, 51(6), 1377–1389.
75. Raphael, I., Joern, R. R., & Forsthuber, T. G. (2020). Memory CD4+ T Cells in Immunity and Autoimmune Diseases. *Cells*, 9(3), 531.
76. Vanamudhu, A., Devi Arumugam, R., Nancy, A., Selvaraj, N., Moiden, K., Hissar, S., Ranganathan, U. D., Bethunaickan, R., Babu, S., & Kumar, N. P. (2024). Elucidating the Immune Response to SARS-CoV-2: Natural Infection versus Covaxin/Covishield Vaccination in a South Indian Population. *Viruses*, 16(8), 1178.
77. Kratzer, B., Trapin, D., Ettel, P., Körmöczi, U., Rottal, A., Tuppy, F., Feichter, M., Gattinger, P., Borochova, K., Dorofeeva, Y., Tulaeva, I., Weber, M., Grabmeier-Pfistershammer, K., Tauber, P. A., Gerdov, M., Mühl, B., Perkmann, T., Fae, I., Wenda, S., Führer, H., … Pickl, W. F. (2021). Immunological imprint of COVID-19 on human peripheral blood leukocyte populations. *Allergy*, 76(3), 751–765.
78. Al Saihati, H. A., Hussein, H. A. M., Thabet, A. A., Wardany, A. A., Mahmoud, S. Y., Farrag, E. S., Mohamed, T. I. A., Fathy, S. M., Elnosary, M. E., Sobhy, A., Ahmed, A. E., El-Adly, A. M., El-Shenawy, F. S., Elsadek, A. A., Rayan, A., Zahran, Z. A. M., El-Badawy, O., El-Naggar, M. G. M., Afifi, M. M., & Zahran, A. M. (2023). Memory T cells discrepancies in COVID-19 patients. *Microorganisms*, 11(11), 2737.
79. George, B., Dahlquist, K. J. V., Grant, M. K. O., Daniel, M. R., Smith, D. M., Ahlberg, I., Sadak, K. T., Seelig, D., Camell, C. D., & Zordoky, B. N. (2025). Divergent immediate and delayed effects of juvenile exposure to doxorubicin on the thymus in C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 15(1), 15557.
80. Zhang, W., Morris, A. B., Peek, E. V., Karadkhele, G., Robertson, J. M., Kissick, H. T., & Larsen, C. P. (2021). CMV status drives distinct trajectories of CD4+ T cell differentiation. *Frontiers in Immunology*, 12, 620386.
81. Kirkby, M., & Veldhoen, M. (2025). CD4+ tissue-resident memory T cells and their role in immunity. *Immunology and Cell Bology*, 103(8), 809–819.
82. Wang, B., Hu, S., Fu, X., & Li, L. (2023). CD4+ Cytotoxic T lymphocytes in cancer immunity and immunotherapy. *Advanced Biology*, 7(4), e2200169.
83. Sircy, L. M., Harrison-Chau, M., Novis, C., Baessler, A., Nguyen, J., & Hale, J. S. (2021). Protein immunization induces T follicular helper memory cells and nonpolarized T helper (Tnp) memory cells. *The Journal of Immunology, 206(1_Supplement)*, 24.16.
84. Hsieh, L. E., Grifoni, A., Dave, H., Wang, J., Johnson, D., Zellner, J., Sidney, J., Chambers, C., & Franco, A. (2022). SARS-CoV-2-specific T cell responses and immune regulation in infected pregnant women. *Journal Of Reproductive İmmunology*, 149, 103464.
85. Zhang, Z., Butler, R., Koestler, D. C., Bell-Glenn, S., Warrier, G., Molinaro, A. M., Christensen, B. C., Wiencke, J. K., Kelsey, K. T., & Salas, L. A. (2022). Comparative analysis of the DNA methylation landscape in CD4, CD8, and B memory lineages. *Clinical Epigenetics*, 14(1), 173.
86. Semelka, C. T., DeWitt, M. E., Blevins, M. W., Holbrook, B. C., Sanders, J. W., & Alexander-Miller, M. A. (2023). Frailty impacts immune responses to Moderna COVID-19 mRNA vaccine in older adults. *Immunity & Ageing*, 20(1), 4.
87. Kado, A., Tsutsumi, T., Yotsuyanagi, H., Ikeuchi, K., Okushin, K., Moriya, K., Koike, K., & Fujishiro, M. (2024). Differential peripheral memory T cell subsets sensitively indicate the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research : The Official Journal Of The Japan Society Of Hepatology*, 54(6), 525–539.
88. Jo, N., Zhang, R., Ueno, H., Yamamoto, T., Weiskopf, D., Nagao, M., Yamanaka, S., & Hamazaki, Y. (2021). Aging and CMV infection affect pre-existing SARS-CoV-2-reactive CD8+ T cells in unexposed individuals. *Frontiers in Aging,* 2, 719342.
89. Matyushenko, V., Isakova-Sivak, I., Kudryavtsev, I., Goshina, A., Chistyakova, A., Stepanova, E., Prokopenko, P., Sychev, I., & Rudenko, L. (2021). Detection of IFNγ-secreting CD4+ and

CD8+ memory T cells in COVID-19 convalescents after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with live SARS-CoV-2. *Viruses,* 13(8), 1490.

90. McGuire, D. J., Akondy, R. S., Yang, S., Edupuganti, S., Nagar, S., Michael, G., De Rosa, S. C., Newell, E. W., Farber, D. L., Kissick, H. T., McElrath, M. J., & Ahmed, R. (2025). Regulation of CD45 isoforms during human effector and memory CD8 T cell differentiation: implications for T cell nomenclature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(32), e2322982122.
91. Saris, A., Reijnders, T. D. Y., Nossent, E. J., Schuurman, A. R., Verhoeff, J., Asten, S. V., Bontkes, H., Blok, S., Duitman, J., Bogaard, H. J., Heunks, L., Lutter, R., van der Poll, T., Garcia Vallejo, J. J., & ArtDECO consortium and the Amsterdam UMC COVID study group (2021). Distinct cellular immune profiles in the airways and blood of critically ill patients with COVID-19. *Thorax*, 76(10), 1010–1019.
92. Winford, E., Lutshumba, J., Martin, B. J., Wilcock, D. M., Jicha, G. A., Nikolajczyk, B. S., Stowe, A. M., & Bachstetter, A. D. (2024). Terminally differentiated effector memory T cells associate with cognitive and AD-related biomarkers in an aging-based community cohort. *Immunity & Ageing*, 21(1), 36.
93. van der Ploeg, K., Kirosingh, A. S., Mori, D. A. M., Chakraborty, S., Hu, Z., Sievers, B. L., Jacobson, K. B., Bonilla, H., Parsonnet, J., Andrews, J. R., Press, K. D., Ty, M. C., Ruiz-Betancourt, D. R., de la Parte, L., Tan, G. S., Blish, C. A., Takahashi, S., Rodriguez-Barraquer, I., Greenhouse, B., Singh, U., … Jagannathan, P. (2022). TNF-α+ CD4+ T cells dominate the SARS-CoV-2 specific T cell response in COVID-19 outpatients and are associated with durable antibodies. *Cell Reports. Medicine*, 3(6), 100640.
94. Painter, M. M., Mathew, D., Goel, R. R., Apostolidis, S. A., Pattekar, A., Kuthuru, O., Baxter, A. E., Herati, R. S., Oldridge, D. A., Gouma, S., Hicks, P., Dysinger, S., Lundgreen, K. A., Kuri-Cervantes, L., Adamski, S., Hicks, A., Korte, S., Giles, J. R., Weirick, M. E., McAllister, C. M., … Wherry, E. J. (2021). Rapid induction of antigen-specific CD4+ T cells is associated with coordinated humoral and cellular immunity to SARS-CoV-2 mRNA vaccination. *Immunity*, 54(9), 2133–2142.e3.
95. Mazzoni, A., Vanni, A., Spinicci, M., Capone, M., Lamacchia, G., Salvati, L., Coppi, M., Antonelli, A., Carnasciali, A., Farahvachi, P., Giovacchini, N., Aiezza, N., Malentacchi, F., Zammarchi, L., Liotta, F., Rossolini, G. M., Bartoloni, A., Cosmi, L., Maggi, L., & Annunziato, F. (2022). SARS-CoV-2 spike-specific CD4+ T cell response is conserved against variants of concern, including Omicron. *Frontiers in Immunology*, 13, 801431.
96. Peng, Y., Mentzer, A. J., Liu, G., Yao, X., Yin, Z., Dong, D., Dejnirattisai, W., Rostron, T., Supasa, P., Liu, C., López-Camacho, C., Slon-Campos, J., Zhao, Y., Stuart, D. I., Paesen, G. C., Grimes, J. M., Antson, A. A., Bayfield, O. W., Hawkins, D. E. D. P., Ker, D. S., … Dong, T. (2020). Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nature Immunology*, 21(11), 1336–1345.
97. 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, 1343716.
98. Swanson, P. A., 2nd, Padilla, M., Hoyland, W., McGlinchey, K., Fields, P. A., Bibi, S., Faust, S. N., McDermott, A. B., Lambe, T., Pollard, A. J., Durham, N. M., Kelly, E. J., & AstraZeneca/Oxford/VRC Study Group (2021). AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific TH1 response with a diverse TCR repertoire. *Science Translational Medicine*, 13(620), eabj7211.
99. Zavaglio, F., Cassaniti, I., Sammartino, J. C., Tonello, S., Sainaghi, P. P., Novelli, V., Meloni, F., Lilleri, D., & Baldanti, F. (2022). mRNA BNT162b Vaccine Elicited Higher Antibody and CD4+ T-Cell Responses than Patients with Mild COVID-19. *Microorganism*s, 10(6), 1250.
100. Zhang, H., Deng, X., Dai, R., Fu, J., Ding, L., Hu, X., Sun, P., Shu, R., Chen, L., & Xu, X. (2025). Inadequate immune response to inactivated COVID-19 vaccine among older people living with HIV: a prospective cohort study. *Journal of Virology*, 99(9), e0068825.
101. Bessen, C., Plaza-Sirvent, C., Simsek, A., Bhat, J., Marheinecke, C., Urlaub, D., Bonowitz, P., Busse, S., Schumann, S., Blanco, E. V., Skaletz-Rorowski, A., Brockmeyer, N. H., Overheu, O., Reinacher-Schick, A., Faissner, S., Watzl, C., Pfaender, S., Potthoff, A., & Schmitz, I. (2022).

Impact of SARS-CoV-2 vaccination on systemic immune responses in people living with HIV. *Frontiers in Immunology*, 13, 1049070.
102. Mestiri, S., Merhi, M., Inchakalody, V. P., Taib, N., Smatti, M. K., Ahmad, F., Raza, A., Ali, F. H., Hydrose, S., Fernandes, Q., Ansari, A. W., Sahir, F., Al-Zaidan, L., Jalis, M., Ghoul, M., Allahverdi, N., Al Homsi, M. U., Uddin, S., Jeremijenko, A. M., Nimir, M., … Dermime, S. (2023). Persistence of spike-specific immune responses in BNT162b2-vaccinated donors and generation of rapid ex-vivo T cells expansion protocol for adoptive immunotherapy: A pilot study. *Frontiers in Immunology*, 14, 1061255.
103. Matyushenko, V., Isakova-Sivak, I., Kudryavtsev, I., Goshina, A., Chistyakova, A., Stepanova, E., Prokopenko, P., Sychev, I., & Rudenko, L. (2021). Detection of IFNγ-secreting CD4+ and CD8+ memory T cells in COVID-19 convalescents after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with live SARS-CoV-2. *Viruses*, 13(8), 1490.
104. Trimbake, D., Singh, D., K, Y. G., Babar, P., S, V. D., & Tripathy, A. S. (2025). Durability of Functional SARS-CoV-2-Specific Immunological Memory and T Cell Response up to 8-9 Months Postrecovery From COVID-19. *Journal of Immunology Research*, 2025, 9743866.
105. Agrati, C., Castilletti, C., Goletti, D., Sacchi, A., Bordoni, V., Mariotti, D., Notari, S., Matusali, G., Meschi, S., Petrone, L., Aiello, A., Najafi Fard, S., Farroni, C., Colavita, F., Lapa, D., Leone, S., Agresta, A., Capobianchi, M., Ippolito, G., Vaia, F., … INMI COVID-19 Vaccine Study Group (2022). Persistent Spike-specific T cell immunity despite antibody reduction after 3 months from SARS-CoV-2 BNT162b2-mRNA vaccine. *Scientific Reports,* 12(1), 6687.
106. Hurme, A., Jalkanen, P., Heroum, J., Liedes, O., Vara, S., Melin, M., Teräsjärvi, J., He, Q., Pöysti, S., Hänninen, A., Oksi, J., Vuorinen, T., Kantele, A., Tähtinen, P. A., Ivaska, L., Kakkola, L., Lempainen, J., & Julkunen, I. (2022). Long-Lasting T Cell Responses in BNT162b2 COVID-19 mRNA Vaccinees and COVID-19 Convalescent Patients. *Frontiers in Immunology*, 13, 869990.
107. Gozzi-Silva, S. C., Oliveira, L. M., Alberca, R. W., Pereira, N. Z., Yoshikawa, F. S., Pietrobon, A. J., Yendo, T. M., de Souza Andrade, M. M., Ramos, Y. A. L., Brito, C. A., Oliveira, E. A., Beserra, D. R., Orfali, R. L., Aoki, V., Duarte, A. J. D. S., & Sato, M. N. (2022). Generation of Cytotoxic T Cells and Dysfunctional CD8 T Cells in Severe COVID-19 Patients. *Cells*, 11(21), 3359.
108. Pérez-Nicado, R., Massa, C., Rodríguez-Noda, L. M., Müller, A., Puga-Gómez, R., Ricardo-Delgado, Y., Paredes-Moreno, B., Rodríguez-González, M., García-Ferrer, M., Palmero-Álvarez, I., Garcés-Hechavarría, A., Rivera, D. G., Valdés-Balbín, Y., Vérez-Bencomo, V., García-Rivera, D., & Seliger, B. (2023). Comparative Immune Response after Vaccination with SOBERANA® 02 and SOBERANA® plus Heterologous Scheme and Natural Infection in Young Children. *Vaccines*, 11(11), 1636.
109. Mazzoni, A., Maggi, L., Capone, M., Vanni, A., Spinicci, M., Salvati, L., Tekle Kiros, S., Semeraro, R., Pengue, L., Colao, M. G., Magi, A., Rossolini, G. M., Liotta, F., Cosmi, L., Bartoloni, A., & Annunziato, F. (2021). Heterogeneous magnitude of immunological memory to SARS-CoV-2 in recovered individuals. *Clinical & Translational İmmunology*, 10(5), e1281.
110. Altosole, T., Rotta, G., Uras, C. R. M., Bornheimer, S. J., & Fenoglio, D. (2023). An optimized flow cytometry protocol for simultaneous detection of T cell activation induced markers and intracellular cytokines: Application to SARS-CoV-2 immune individuals. *Journal of Immunological Methods*, 515, 113443.
111. 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, 1012526.
112. Chen, Z. Y., Wang, L., Gu, L., Qu, R., Lowrie, D. B., Hu, Z., Sha, W., & Fan, X. Y. (2020). Decreased expression of CD69 on T cells in tuberculosis infection resisters. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1901.
113. Curato, C., Aparicio-Soto, M., Riedel, F., Wehl, I., Basaran, A., Abbas, A., Thierse, H. J., Luch, A., & Siewert, K. (2022). Frequencies and TCR Repertoires of Human 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic Acid-specific T Cells. *Frontiers in Toxicology*, 4, 827109.
114. Gao, Y., Luo, C., Yang, H., Xie, Q., He, H., Li, J., & Miao, J. (2025). Enhanced efficacy of dual chimeric antigen receptor-T cells targeting programmed death-ligand 1 and cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer in vitro. *CytoJournal,* 22, 29.
115. Campillo-Davo, D., Versteven, M., Roex, G., Reu, H., Heijden, S. V., Anguille, S., Berneman, Z. N., Tendeloo, V. F. I. V., & Lion, E. (2020). Rapid assessment of functional avidity of tumor-

specific t cell receptors using an antigen-presenting tumor cell line electroporated with full-length tumor antigen mRNA. *Cancers*, 12(2), 256.
116. Cavalcante-Silva, L. H. A., Leite, E. G., Almeida, F. S., Andrade, A. G., Comberlang, F. C., Lucena, C. K. R., Pachá, A. S. C., Csordas, B. G., & Keesen, T. S. L. (2023). T Cell Response in Tuberculosis-Infected Patients Vaccinated against COVID-19. *Microorganisms,* 11(11), 2810.
117. Shi, H., Yang, L., Zhang, F., Zhou, Y., & Zhou, Y. (2023). Diagnostic value of CD25, CD69, and CD134 on tuberculosis-specific antigen-stimulated cd4+ t cells for tuberculous pleurisy. *Journal of Immunology Research*, 2023, 5309816.
118. Aguilar-Bretones, M., Fouchier, R. A., Koopmans, M. P., & 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), e162192.
119. Brown, E. L., & Essigmann, H. T. (2021). Original antigenic sin: the downside of immunological memory and implications for COVID-19. *mSphere*, 6(2), e00056-21.
120. King, S. M., Bryan, S. P., Hilchey, S. P., Wang, J., & Zand, M. S. (2023). First impressions matter: Immune imprinting and antibody cross-reactivity in influenza and SARS-CoV-2. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(2), 169.
121. Meade, P., Kuan, G., Strohmeier, S., Maier, H. E., Amanat, F., Balmaseda, A., Ito, K., Kirkpatrick, E., Javier, A., Gresh, L., Nachbagauer, R., Gordon, A., & Krammer, F. (2020). Influenza virus infection induces a narrow antibody response in children but a broad recall response in adults. *mBio*, 11(1), e03243-19.
122. McLean, H. Q., & Belongia, E. A. (2021). Influenza vaccine effectiveness: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(6), a038315.
123. Wang, Q., Guo, Y., Tam, A. R., Valdez, R., Gordon, A., Liu, L., & Ho, D. D. (2023). Deep immunological imprinting due to the ancestral spike in the current bivalent COVID-19 vaccine. *Cell reports. Medicine,* 4(11), 101258.
124. Arevalo, C. P., Le Sage, V., Bolton, M. J., Eilola, T., Jones, J. E., Kormuth, K. A., Nturibi, E., Balmaseda, A., Gordon, A., Lakdawala, S. S., & Hensley, S. E. (2020). Original antigenic sin priming of influenza virus hemagglutinin stalk antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 117(29), 17221–17227.
125. van Zelm M. C. (2022). Immune memory to SARS-CoV-2 Omicron BA.1 breakthrough infections: To change the vaccine or not?. *Science Immunology*, 7(74), eabq5901.
126. 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., Saliba, C., … Veesler, D. (2023). Neutralization, effector function and immune imprinting of Omicron variants. *Nature*, 621(7979), 592–601.
127. Castillo-Aleman, Y. M., Villegas-Valverde, C. A., Ventura-Carmenate, Y., Suarez-Formigo, G. M., & Bencomo-Hernandez, A. A. (2022). "Original Antigenic Sin" in SARS-CoV-2 vaccination followed by infection. *Cureus*, 14(12), e32548.
128. Pušnik, J., Zorn, J., Monzon-Posadas, W. O., Peters, K., Osypchuk, E., Blaschke, S., & Streeck, H. (2024). Vaccination impairs de novo immune response to omicron breakthrough infection, a precondition for the original antigenic sin. *Nature Communications*, 15(1), 3102.
129. Park, Y. J., Pinto, D., Walls, A. C., Liu, Z., De Marco, A., Benigni, F., Zatta, F., Silacci-Fregni, 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., Dang, H. V., … Veesler, D. (2022). Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Science (New York, N.Y.)*, 378(6620), 619–627.
130. Kaku, C. I., Bergeron, A. J., Ahlm, C., Normark, J., Sakharkar, M., Forsell, M. N. E., & Walker, L. M. (2022). Recall of preexisting cross-reactive B cell memory after Omicron BA.1 breakthrough infection. *Science immunology*, 7(73), eabq3511.
131. Dykema, A. G., Zhang, B., Woldemeskel, B. A., Garliss, C. C., Cheung, L. S., Choudhury, D., Zhang, J., Aparicio, L., Bom, S., Rashid, R., Caushi, J. X., Hsiue, E. H., Cascino, K., Thompson, E. A., Kwaa, A. K., Singh, D., Thapa, S., Ordonez, A. A., Pekosz, A., D'Alessio, F. R., … Smith, K. N. (2021). Functional characterization of CD4+ T cell receptors crossreactive for SARS-CoV-2 and endemic coronaviruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 131(10), e146922.
132. 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., Hippenstiel, S., … Giesecke-Thiel, C.

(2021). Cross-reactive CD4+ T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination. *Science (New York, N.Y.)*, 374(6564), eabh1823.
133. Riou, C., du Bruyn, E., Stek, C., Daroowala, R., Goliath, R. T., Abrahams, F., Said-Hartley, Q., Allwood, B. W., Hsiao, N. Y., Wilkinson, K. A., Arlehamn, C. S. L., Sette, A., Wasserman, S., Wilkinson, R. J., & HIATUS consortium (2021). Relationship of SARS-CoV-2-specific CD4 response to COVID-19 severity and impact of HIV-1 and tuberculosis coinfection. *The Journal Of Clinical Investigation*, 131(12), e149125.
134. Rydyznski Moderbacher, C., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Grifoni, A., Hastie, K. M., Weiskopf, D., Belanger, S., Abbott, R. K., Kim, C., Choi, J., Kato, Y., Crotty, E. G., Kim, C., Rawlings, S. A., Mateus, J., Tse, L. P. V., Frazier, A., Baric, R., Peters, B., Greenbaum, J., … Crotty, S. (2020). Antigen-specific adaptive immunity to SARS-CoV-2 in acute COVID-19 and Associations with age and disease severity. *Cell*, 183(4), 996–1012.e19.
135. Aydillo, T., Rombauts, A., Stadlbauer, D., Aslam, S., Abelenda-Alonso, G., Escalera, A., Amanat, F., Jiang, K., Krammer, F., Carratala, J., & García-Sastre, A. (2021). Immunological imprinting of the antibody response in COVID-19 patients. *Nature Communications*, 12(1), 3781.
136. Delgado, J. F., Vidal-Pla, M., Moya, M. C., Espasa, M., Casabella, A., Seda, M., Calvet, J., Gratacós, J., Serrano, R. M., & Peña, P. (2022). SARS-CoV-2 spike protein vaccine-induced immune imprinting reduces nucleocapsid protein antibody response in SARS-CoV-2 infection. *Journal Of İmmunology Research*, 2022, 8287087.
137. 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., Schneiderhan-Marra, N., … Walz, J. S. (2021). SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nature Immunology*, 22(1), 74–85.
138. Kundu, R., Narean, J. S., Wang, L., Fenn, J., Pillay, T., Fernandez, N. D., Conibear, E., Koycheva, A., Davies, M., Tolosa-Wright, M., Hakki, S., Varro, R., McDermott, E., Hammett, S., Cutajar, J., Thwaites, R. S., Parker, E., Rosadas, C., McClure, M., Tedder, R., … Lalvani, A. (2022). Cross-reactive memory T cells associate with protection against SARS-CoV-2 infection in COVID-19 contacts. *Nature Communications*, 13(1), 80.
139. Nelson, R. W., Chen, Y., Venezia, O. L., Majerus, R. M., Shin, D. S., MGH COVID-19 Collection & Processing Team, Carrington, M. N., Yu, X. G., Wesemann, D. R., Moon, J. J., & Luster, A. D. (2022). SARS-CoV-2 epitope-specific CD4+ memory T cell responses across COVID-19 disease severity and antibody durability. *Science Immunology*, 7(73), eabl9464.
140. Prakash, S., Dhanushkodi, N. R., Quadiri, A., Vahed, H., Chentoufi, A. A., Coulon, P. G., Ibraim, I. C., Babsiri, A. E., Tifrea, D. F., Figueroa, C. J., Gil, D., Ulmer, J. B., & BenMohamed, L. (2025). A multi-antigen broad-spectrum coronavirus vaccine induces potent and durable cross-protection against infection and disease caused by multiple SARS-CoV-2 variants. *Research Square*, rs.3.rs-7208748.
141. 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, 1357731.
142. Nielsen, M., Andreatta, M., Peters, B., & Buus, S. (2020). Immunoinformatics: Predicting peptide-MHC binding. *Annual Review Of Biomedical Data Science*, 3, 191–215.
143. Ngandu, N. K., Fielding, B. C., van Heusden, P., Mcinga, K., Francis, K., & Harkins, G. (2025). Population-level toggling of T cell immune escape at human leukocyte antigen anchor residues in SARS-CoV-2 Spike proteins, in an ethnically diverse population region. *PLoS Computational Biology*, 21(7), e1013261.
144. Kashiri, L., Choga, W. T., Musasa, T., Nziramasanga, P., Gutsire, R. B., Zijenah, L. S., Mukarati, N. L., Gaseitsiwe, S., Moyo, S., & Chin'ombe, N. (2025). In silico multi-epitope-based vaccine design for Mycobacterium avium complex species. *Frontiers in Immunology*, 16, 1589083.
145. Chen, X., Li, Y., & Wang, X. (2024). Multi-epitope vaccines: a promising strategy against viral diseases in swine. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1497580.
146. Sette, A., Sidney, J., & Grifoni, A. (2024). Pre-existing SARS-2-specific T cells are predicted to cross-recognize BA.2.86. *Cell Host & Microbe*, 32(1), 19–24.e2.
147. Sohail, M. S., Ahmed, S. F., Quadeer, A. A., & McKay, M. R. (2024). Cross-Reactivity Assessment of Vaccine-Derived SARS-CoV-2 T Cell Responses against BA.2.86 and JN.1. *Viruses,* 16(3), 473.

148. Hammer, J. M., Gutierrez, A. H., Huntimer, L., Gabriel, B., Martin, W. D., Hammer, S. E., Käser, T., & De Groot, A. S. (2025). T cell epitope content comparison using EpiCC correlates with vaccine efficacy against heterologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus type 2 strains. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1625309.
149. Saha, R., Ghosh, P., & Burra, V. L. S. P. (2021). Designing a next generation multi-epitope based peptide vaccine candidate against SARS-CoV-2 using computational approaches. *3Biotech*, 11(2),47.
150. Rastogi, A., Gautam, S., & Kumar, M. (2024). Bioinformatic elucidation of conserved epitopes to design a potential vaccine candidate against existing and emerging SARS-CoV-2 variants of concern. *Heliyon*, 10(15), e35129.
151. GISAID. hCov19 Variants [Internet]. [cited 2025 Jul 15]. Available from: https://gisaid.org/hcov19-variants/
152. NextStrain. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally over the past 6 months [Internet]. [cited 2025 Jul 18]. Available from:https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/6m
153. 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).
154. IEDB.org. Free epitope database and prediction resource [Internet]. [cited 2025 Jul 18]. Available from: https://iedb.org/
155. 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.
156. 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
157. 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*, 12(1), 4043.
158. 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 & Microbe*, 32(2), 162–169.e3.
159. 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., Estepp, J. H., … Thomas, P. G. (2022). SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8+ T cells. *Nature İmmunology*, 23(5), 781–790.
160. 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.
161. 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. *The Journal of Infection*, 90(2), 106402.
162. Uzunoğlu, A. S. (2025). 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 [Yayımlanmamış doktora tezi]. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul.
163. 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.

164. 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.
165. Gao, Y., Cai, C., Grifoni, A., Müller, T. R., Niessl, J., Olofsson, A., Humbert, M., Hansson, L., Österborg, A., Bergman, P., Chen, P., Olsson, A., Sandberg, J. K., Weiskopf, D., Price, D. A., Ljunggren, H. G., Karlsson, A. C., Sette, A., Aleman, S., & Buggert, M. (2022). Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant. *Nature Medicine*, 28(3), 472–476.
166. Sette, A., & Crotty, S. (2022). Immunological memory to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 vaccines. *Immunological Reviews*, 310(1), 27–46.
167. 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), 1570. 162
168. 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., Österborg, A., … Buggert, M. (2024). Memory T cells effectively recognize the SARS-CoV-2 hypermutated BA.2.86 variant. *Cell Host & Microbe*, 32(2), 156–161.e3.
169. Tarke, A., Sidney, J., Methot, N., Yu, E. D., Zhang, Y., Dan, J. M., Goodwin, B., Rubiro, P., Sutherland, A., Wang, E., Frazier, A., Ramirez, S. I., Rawlings, S. A., Smith, D. M., da Silva Antunes, R., Peters, B., Scheuermann, R. H., Weiskopf, D., Crotty, S., Grifoni, A., … Sette, A. (2021). Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4+ and CD8+ T cell reactivity in infected or vaccinated individuals. *Cell Reports. Medicine*, 2(7), 100355.

EKLER

EK-1.Etik Kurul Onayı

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Değerli katılımcı,

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

Araştırmanın içeriği, COVID-19 geçirmiş bireylerde Omicron varyantına özgü bellek CD4+ T hücre yanıtlarını ve önceki SARS-CoV-2 maruziyetinin bu yanıtlar üzerindeki etkisinin incelenmesine 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	**Araştırmacı**
İmza	**İmza**

EK-3.Çalışma Anket Formu

BİLGİLENDİRME METNİ

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 epitop örtüşmesi, korunumu, mutasyon analizi ve konumsal haritalama (positional mapping) işlemlerini gerçekleştiren bütünleşik analiz hattı.

```
# ============================================
# SARS-CoV-2 Epitope Analysis Pipeline
# Analyses included:
# 1. Epitope overlap (variants only / with ancestral)
# 2. Epitope preservation vs ancestral
# 3. Shared mutations across variants
# 4. Impact of variant-defining mutations on ancestral epitopes
# 5. Variant-specific epitopes
# 6. Positional mapping of mutated/conserved 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 = mcolors.LinearSegmentedColormap.from_list("firebrick_gray", ["#FFF3F2",
"#9C0000"])

# ============================================
# 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)

# ============================================
# 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)

# ============================================
# 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")

# ============================================
# 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_data.plot(kind="bar", stacked=True, ax=ax, color=["#949494", "#B22222"],
edgecolor="white")

    for i, (unmut, mut) in enumerate(zip(results_df["Unmutated Count"],
results_df["Mutated Count"])):
        ax.text(i, results_df.loc[i, "Unmutated %"]/2, str(unmut), ha="center",
va="center", color="white", fontsize=10)
        ax.text(i, results_df.loc[i, "Unmutated %"] + results_df.loc[i, "Mutated %"]/2,
str(mut), ha="center", va="center", color="white", fontsize=10)

    ax.set_ylabel("Percentage of Epitopes (%)")
    ax.set_title("Impact of Variant-Defining Mutations on Ancestral Spike CD4+ T Cell
Epitopes")
    plt.xticks(rotation=45)
    plt.legend(title="Epitope Status")
    plt.tight_layout()
    plt.show()

# ================================================
# 5. 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

    cmap = mcolors.LinearSegmentedColormap.from_list("custom_cmap", ["whitesmoke",
"firebrick"])
    plt.figure(figsize=(10, len(all_mutations) * 0.3))
    sns.heatmap(
        presence_matrix,
        cmap=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()

# ================================================
# 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("variant_epitopes.xlsx", include_ancestral=True)

    # Epitope preservation and variant-specific
    analyze_epitope_preservation("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("epitopes.xlsx", "variant_mutations.xlsx")

    # Positional mapping
    analyze_positional_mapping("epitopes.xlsx", "variant_epitopes.xlsx",
"variant_mutations.xlsx")
```

Kod 2: 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 = 'netmhciipan_el percentile'
PEPTIDE_COL = 'peptide'
ALLELE_COL = 'allele'
STRONG_BINDER_THRESHOLD = 10

# --- 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": "firebrick",   # red
    "Decreased": "royalblue",
    "Unchanged": "dimgray"      # gray
}
preserved_palette = ["dimgray", "firebrick"]

# --- 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="darkred")
    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 durumlarını 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
# 9. UpSet plot of conserved / unique / lost / shared sets
# ============================================================

%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 = 10
PERCENTILE_COL = "netmhciipan_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=False)

    plt.figure(figsize=(12, 6))
    ax = counts.plot(kind="bar", color="firebrick")
    plt.title(f"Distribution of Strong-Binding Epitopes per HLA Class II
Allele\n{variant}", fontsize=14)
    plt.xlabel("HLA Class II 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)

# Sort alleles by total epitope count
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-II
Allele", fontsize=14)
plt.xlabel("HLA Class II 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.tight_layout()
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=["firebrick", "dimgray"],
        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]

plt.figure(figsize=(12, max(6, 0.2*len(heatmap_data))))
sns.heatmap(
    heatmap_data,
    cmap=["lightgray", "firebrick"],
    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()

# ============================================================
# 9. UPSET PLOT - Conserved / Unique / Lost / Shared sets
# ============================================================
variant_sets = {}
for name, filepath in files.items():
    df = pd.read_csv(filepath, sep="\t")
    variant_sets[name] = set(df[PEPTIDE_COL] + "_" + df[ALLELE_COL])
```

```
all_pairs = set().union(*variant_sets.values())

memberships = []
for pair in all_pairs:
    present_in = [variant for variant, s in variant_sets.items() if pair in s]
    memberships.append(present_in)

data = from_memberships(memberships)

categories = []
for present_in in memberships:
    if set(files.keys()) == set(present_in):
        categories.append("Conserved")
    elif len(present_in) == 1 and present_in[0] != "Ancestral":
        categories.append("Unique")
    elif "Ancestral" in present_in and len(present_in) < len(files):
        categories.append("Lost")
    else:
        categories.append("Shared")

data = pd.DataFrame(data)
data["Category"] = categories

plt.figure(figsize=(14, 7))
up = UpSet(
    data,
    subset_size="count",
    show_counts=True,
    sort_categories_by="-input",
)
up.plot()
plt.suptitle("UpSet Plot: Unique vs Conserved vs Lost Epitope Sets", fontsize=14)
plt.tight_layout()
plt.show()
```

Kod 4: CD4+ T hücresi epitop-HLA çiftlerinin varyant bazlı kayıp analizi, korunma durumlarının karşılaştırılması ve Spike proteini üzerindeki konumsal/bölgesel (domain) haritalaması.

```
# ============================================================
# CD4 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:
    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="firebrick",
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=["lightgray", "firebrick"], cbar=False,
linewidths=0.4, linecolor='white')
    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=["lightgray", "firebrick"], cbar=False,
linewidths=0.5, linecolor='white')
    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()

lost_pairs = (variant_pairs_pos.get("Ancestral", set()) & 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 (Ancestral + JN.1 only): {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:
    for pair in lost_pairs:
        peptide, allele = pair.split("_", 1)
        start = jn1_seq.find(peptide)
        if start != -1:
            end = start + len(peptide)
            lost_positions.append((peptide, allele, start+1, end))  # 1-based

    lost_positions_df = pd.DataFrame(lost_positions, columns=["Peptide", "HLA", "Start",
"End"])
    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, 4))
    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="firebrick", linewidth=10)
    plt.title("Positional Mapping of Lost Epitopes (JN.1 reference)", fontsize=14)
    plt.xlabel("Spike Protein Position (JN.1 reference)")
    plt.yticks([])
    plt.tight_layout()
    plt.show()
else:
    print("Skipping JN.1 positional plotting (no JN.1 reference sequence available).")

# ============================================================
# 7. DOMAIN MAPPING & SUMMARY PLOTS FOR LOST EPITOPES
# ============================================================
# 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="firebrick")
            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="firebrick", 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: CD4+ T hücresi epitop-HLA çiftlerinin varyantlar arası korunum (conservation) analizi, farklı bağlanma eşik değerlerine göre filtrelenmesi ve allel/lokus bazlı dağılımlarının görselleştirilmesi.

```
# ============================================================
# CD4 T CELL CONSERVED EPITOPE-HLA PAIR ANALYSIS PIPELINE
# ============================================================
# ANALYSES
# 1. Strict conserved pairs (without threshold filtering)
#    - Identify conserved epitope-HLA pairs across all variants
#    - 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
#    - Heatmap visualization
#    - Plot per-allele and per-locus conserved counts
# ============================================================

import pandas as pd
import matplotlib.pyplot as plt
import seaborn as sns
import math

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"
}
# ============================================================
# 1. STRICT CONSERVED PAIRS (WITHOUT THRESHOLD FILTERING)
# ============================================================

variant_pairs = {}
for variant, filepath in variant_files.items():
    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"]))

# Find conserved pairs across all variants
```

```
conserved_pairs = set.intersection(*variant_pairs.values())
print(f"Number of conserved epitope-HLA pairs: {len(conserved_pairs)}")

# Save conserved pairs (TSV + Excel)
conserved_df = pd.DataFrame(list(conserved_pairs), columns=["peptide", "allele"])
conserved_df.to_csv("conserved_epitope_HLA_pairs.tsv", sep="\t", index=False)
conserved_df.to_excel("conserved_epitope_HLA_pairs.xlsx", index=False)

# Per-allele 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 table
allele_df.to_csv("conserved_epitope_counts_per_allele.tsv", sep="\t", index=False)

plt.figure(figsize=(10, 6))
bars = plt.barh(
    allele_df["allele"],
    allele_df["count"],
    color="firebrick",
    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 (≤10 percentile)", fontsize=12,
color="black")
plt.yticks(fontsize=10)  # allele list font size
plt.grid(axis="x", linestyle="--", alpha=0.7, color="dimgray", zorder=0)
for bar in bars:
    bar.set_zorder(3)
plt.tight_layout()
plt.show()

# Per-locus counts
locus_counts = {}
for pep, allele in conserved_pairs:
    locus = allele.split("-")[1][:2]  # DP, DQ, DR
    locus_counts[locus] = locus_counts.get(locus, 0) + 1

locus_df = pd.DataFrame(list(locus_counts.items()), columns=["locus", "count"])
locus_df = locus_df.sort_values(by="count", ascending=False)

# Save table
locus_df.to_csv("conserved_epitope_counts_per_locus.tsv", sep="\t", index=False)

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

# Add numbers inside bars
for bar in bars:
    height = bar.get_height()
    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 (≤10 percentile)", 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.show()

# ============================================================
# 2. THRESHOLD-BASED CONSERVED ANALYSIS
# ============================================================

def analyze_conserved(threshold, label, chunk_size=50, show_heatmap=False):
    print(f"\n=== Analysis for threshold: ≤{threshold} ===")

    # Load filtered epitope-HLA sets
    variant_pairs = {}
    for variant, filepath in variant_files.items():
        df = pd.read_csv(filepath, sep="\t")
        df["peptide"] = df["peptide"].str.strip()
        df["allele"] = df["allele"].str.strip()
        df = df[df["netmhciipan_el percentile"] <= threshold]
        variant_pairs[variant] = set(zip(df["peptide"], df["allele"]))

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

    # 1. Heatmap of conserved pairs
    if show_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)
        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, 0.25*len(chunk)))
            sns.heatmap(
                chunk,
                cmap=["firebrick", "lightgray"],
                cbar=False,
                linewidths=0.3,
                linecolor="white"
            )
            plt.title(f"Conserved Epitope-HLA Pairs (≤{threshold} percentile) [Part
{i+1}/{n_chunks}]")
            plt.xlabel("Variants")
            plt.ylabel("Peptide-HLA Pairs")
            plt.yticks(rotation=0, fontsize=6)
            plt.tight_layout()
            plt.show()

    # 2. Per-allele 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)

    plt.figure(figsize=(10, 6))
    plt.barh(allele_df["allele"], allele_df["count"], color="firebrick",
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 (≤{threshold} percentile)",
fontsize=12)
    plt.yticks(fontsize=10)
    plt.grid(axis="x", linestyle="--", alpha=0.6, color="dimgray", zorder=0)
    plt.tight_layout()
    plt.show()
```

```
    # 3. Per-locus counts
    locus_counts = {}
    for pep, allele in conserved_pairs:
        locus = allele.split("-")[1][:2]  # DP, DQ, DR
        locus_counts[locus] = locus_counts.get(locus, 0) + 1

    locus_df = pd.DataFrame(list(locus_counts.items()), columns=["locus", "count"])
    locus_df = locus_df.sort_values(by="count", ascending=False)

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

    # Add numbers inside bars
    for bar in bars:
        height = bar.get_height()
        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 (≤{threshold} percentile)",
fontsize=12)
    plt.grid(axis="y", linestyle="--", alpha=0.6, color="dimgray", zorder=0)
    plt.tight_layout()
    plt.show()


# Run analyses
analyze_conserved(5, "≤5", show_heatmap=False)
analyze_conserved(2, "≤2", show_heatmap=False)
analyze_conserved(1, "≤1", show_heatmap=True)
```