Fulya ERENDOR CİHAN

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İNSAN ADENOVİRAL VEKTÖR ARACILI SARS-COV-2 SPİKE GEN NAKLİNİN PANDEMİK KORONAVİRÜS HASTALIĞINA KARŞI (COVID-19) GELİŞEN HÜCRESEL VE HÜMORAL BAĞIŞIKLIK YANITININ BELİRLENMESİ

Fulya ERENDOR CİHAN

DOKTORA TEZİ

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İNSAN ADENOVİRAL VEKTÖR ARACILI SARS-COV-2 SPİKE GEN NAKLİNİN PANDEMİK KORONAVİRÜS HASTALIĞINA KARŞI (COVID-19) GELİŞEN HÜCRESEL VE HÜMORAL BAĞIŞIKLIK YANITININ BELİRLENMESİ

Fulya ERENDOR CİHAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2022-6067 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

2024-ANTALYA

Evrak Tarih ve Sayısı: 16.08.2024-578

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 18/07/2024

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Halit CANATAN
Erciyes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mutay AYDIN ASLAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Yunus Emre EKŞİ
Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ……/……./…….... tarih ve ……/…….. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Bu belge, güvenli elektronik İmza ile imzalanmıştır.
Evrak sorgulaması https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5543&eD=BSMMH1KA63&eS=578 adresinden yapılabilir. (PIN:43142)

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Fulya ERENDOR CİHAN
İmza

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
İmza

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında ve tamamlanmasında desteğini esirgemeyen birçok kişi ve kuruma minnettarım. Öncelikle, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na, yol göstericiliği, sabrı ve teşvik edici tavsiyeleri için en içten teşekkürlerimi sunarım. Kendisinin bilgi ve deneyimleri, bu çalışmanın ve tüm lisansüstü eğitim hayatımın her aşamasında bana ilham kaynağı olmuştur. Ayrıca, değerli Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavisi ile Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve öğrencilerine, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına ve Tez İzleme Komitesi üyelerine, geri bildirimleri ve yapıcı eleştirileri için teşekkür ederim. Onların katkıları, çalışmamın daha iyi bir noktaya gelmesini sağlamıştır. Elif Ö. Şahin'e projenin başında çalışmaya olan katkılarından dolayı teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarım sırasında bana destek olan ve her türlü yardımı sağlayan araştırma arkadaşlarım Büşra ÇETİN ve Büşra CESUR ERGÜN'e, gösterdikleri iş birliği ve dostluk için teşekkür ederim. Birlikte çalışmak büyük bir zevkti. Bu çalışmanın finansal olarak desteklenmesini sağlayan KOSGEB (42MUD) ve Akdeniz Üniversitesi BAP birimine teşekkür ederim. Destekleri olmadan bu araştırmayı gerçekleştirmek mümkün olmazdı. Ailem ve sevdiklerim, özellikle annem ve babama, verdikleri moral ve motivasyon için teşekkür ederim. Onların sevgisi ve inancı, bu süreçte en büyük gücüm oldu. Bana inanan ve bu uzun yolculukta yanımda olan başta H. Sevgi VARLI MA ve Funda ALKAN ÇANDIR olmak üzere tüm arkadaşlarıma ve sevgili kedilerime 🐾 teşekkür ederim. Sizlerin varlığı, karşılaştığım zorlukları aşmamda büyük rol oynadı.

Veee… kıymetli eşim Mehmet CİHAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Bu süreç boyunca beni sabırla beklediğin için, her zaman yanımda olup beni motive ettiğin ve her zorluğu birlikte aştığımız için sana minnettarım.

Teşekkürlerimle,

Fulya ERENDOR CİHAN

ÖZET

Amaç: SARS-CoV-2 virüsünün neden olduğu COVID-19'a karşı güvenli ve etkili bir aşı geliştirme aciliyeti, çeşitli aşı platformlarının geliştirilmesine vesile olmuştur. Bu platformlar arasında, özellikle adenovirüsleri kullanan viral vektör bazlı aşılar önemli avantajlar sunmaktadır. Adenovirüs bazlı vektörler, geniş doku tropizmi, iyi karakterize edilmiş vektör genomları, yüksek transgen kapasitesi, doğal adjuvan etkisi ve transgene özgü güçlü T hücresi ve B hücresi yanıtları oluşturma yetenekleri ile dikkat çekmektedir. Bu çalışma, insan adenoviral vektörlerini kullanarak SARS-CoV-2 Spike proteinini kodlayan aşı vektörlerini (Ad5Spike) geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Yöntem: Gateway® Klonlama Teknolojisi kullanılarak SARS-CoV-2 Spike proteinini kodlayan bir insan adenoviral ekspresyon plazmidi (pAd5Spike) oluşturuldu. Ad5Spike, 293A hücrelerine pAd5Spike'ın $CaCO_4$ aracılı geçici transfeksiyonu ile üretildi. Ardından CsCl yoğunluk gradientli ultrasantrifügasyon ile saflaştırıldı ve yoğunlaştırıldı. Bağışıklama için ilgili aşı vektörü, 10 mM Tris-Cl tamponunda farklı konsantrasyonlarda (10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül) 6-8 haftalık dişi BALB/c farelerine intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hem hücresel hem de hümoral bağışıklık yanıtları, bağışıklamadan sonraki 30 ve 90 günlerde ELISA, ELISpot ve nötralizasyon testleri kullanılarak değerlendirildi.

Bulgular: Aşılanan farelerin serumunda anti-spike IgG seviyelerinin yükseldiği gözlemlendi. Aşılanan farelerin T hücrelerinden TNF-α, IFN-γ ve IL-2 sitokinlerinin salınımının bariz bir şekilde arttığı görüldü. 3. nesil lentiviral bazlı bir psödovirüs kullanılarak yapılan nötralizasyon testleri, özellikle yüksek doz grubunda SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorların varlığını gösterdi.

Sonuç: Bu çalışma geliştirilen Ad5Spike vektörlerinin hem hümoral hem de hücresel bağışıklık mekanizmalarını aktive etme yeteneğinin olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla bu aşının COVID-19'a karşı etkili bir koruyucu bağışıklık sağlayabilme potansiyelinin olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: SARS-CoV-2, COVID-19, spike glikoprotein, adenovirüs, aşılama

ABSTRACT

Aim: The urgency of developing a safe and effective vaccine against COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, has led to the development of various vaccine platforms. Among these, viral vector-based vaccines, particularly those utilizing adenoviruses, offer significant advantages. Adenovirus-based vectors are notable for their broad tissue tropism, well-characterized vector genomes, high transgene capacity, natural adjuvant effect, and their ability to elicit robust transgene-specific T cell and B cell responses. This study aims to develop vaccine vectors encoding the SARS-CoV-2 Spike protein (Ad5Spike) using human adenoviral vectors.

Method: A human adenoviral expression plasmid encoding the SARS-CoV-2 Spike protein (pAd5Spike) was constructed using Gateway® Cloning Technology. Ad5Spike was produced by transient transfection of pAd5Spike into 293A cells via the $CaCO_4$-mediated method, then purified and concentrated by CsCl density gradient ultracentrifugation. For immunization, the vector was intraperitoneally injected at different concentrations (10^8, 10^{10}, and 10^{12} viral particules) into 6-8-week-old female BALB/c mice in 10 mM Tris-Cl. Both cellular and humoral immune responses were evaluated at 30- and 90-days post-immunization using ELISA, ELISpot, and neutralization assays.

Results: Elevated levels of anti-spike IgG were observed in the serum of vaccinated mice. Increased secretion of TNF-α, IFN-γ, and IL-2 cytokines from T cells of vaccinated mice was observed. Neutralization tests conducted using a third-generation lentiviral-based pseudovirus demonstrated the presence of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2, particularly in the high-dose group.

Conclusion: This study illustrates the generation of the Ad5Spike vector with the potential to activate both humoral and cellular immune systems. Thus, we can conclude that this vaccine may provide protection against COVID-19.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, spike glycoprotein, adenovirus, vaccination

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

İÇİNDEKİLER iii

TABLOLAR DİZİNİ viii

ŞEKİLLER DİZİNİ ix

SİMGELER ve KISALTMALAR xvi

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Antijen Seçimi 6

2.1.1. Tam Uzunluktaki Spike Proteini 6

2.1.2. Reseptör Bağlanma Bölgesi (RBD) 8

2.1.3. Amino Uç Bölgesi (NTD), S1 Alt ünitesi, Füzyon Proteini (FP) 8

2.1.4. Nükleokapsit Protein (N), Membran Proteini (M) ve Zarf Proteini (E) 9

2.2. Vektör Seçimi 10

2.2.1. Canlı-zayıflatılmış ya da İnaktif Virüs Aşıları 10

2.2.2. mRNA Aşıları 11

2.2.3. DNA Aşıları 12

2.2.4. Alt ünite Aşıları 13

2.2.5. Viral Vektör Tabanlı Aşılar 13

2.3. Adenovirüs Yapısı ve Vektör Tasarımı 14

2.3.1. Adenoviral Vektörler 15

2.4. Adenoviral Vektör Tabanlı Aşılar 16

2.5. Mevcut COVID-19 Adenoviral Vektör Aşıları 17

2.5.1. Ad26.COV2.S Aşısı (Janssen/Johnson & Johnson) 18

2.5.2. ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca) 18

2.5.3. CanSinoBio 19

2.5.4. Gamaleya Sputnik V Aşısı 20

2.6. Projenin Amacı 20

3. GEREÇ ve YÖNTEM 22

3.1. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Adenoviral Transfer Vektörlerinin Oluşturulması 22

3.2. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Transfer Plazmidlerinin Ekspresyon Analizi 23

3.3. SARS-CoV-2 Spike Glikoproteini Kodlayan Adenoviral Vektörlerin Üretimi 24

3.3.1. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Oluşturulması 24

3.3.2. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması 25

3.4. Adenoviral Aşı Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi 25

3.5. Yeşil Floresan Protein Kodlayan Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Üretilmesi 26

3.5.1. Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Oluşturulması 26

3.5.2. Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması 27

3.6. Adenoviral Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun

Gösterilmesi 28
3.7. Üretilen Adenoviral Vektörlerin Hedef Hücrelerin Transdüksiyon Etkinliğinin Gösterilmesi 29
3.8. Adenoviral Vektörlerin Plak Testi ile Saflaştırılması 29
3.9. Plak Testi Sonrası Adenoviral Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi 30
3.10. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Sephadex G-50 Kolonu ile Tuzdan Arındırılması 31
3.11. Deney Hayvanlarının İmmünizasyonu ve İmmün Hücre Eldesi 32
3.11.1. Dalak Hücre İzolasyonu 32
3.11.2. T Hücrelerinin Dynabeads Kullanılarak Zenginleştirilmesi 33
3.12. Hücresel Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi 34
3.12.1. Efektör T Hücre Yanıtı Saptama 34
3.12.2. ELISpot Analizi ile Splenosit Yanıtının Saptanması 34
3.13. Hümoral Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi 36
3.13.1. SARS-CoV-2 Spike Protein Spesifik IgG Antikor Yanıtlarının Ölçülmesi 36
3.14. Aşılama Sonrası Nötralize Edici Antikor Yanıtlarının Ölçülmesi 36
3.15. İstatistiksel Analizler 37

4. BULGULAR 38

4.1. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Adenoviral Ekspresyon Vektörü (pAd5Spike) Oluşturulması 38
4.2. pAd5Spike Ekspresyon Plazmidinden Spike Protein Sentezinin Tespiti 42

4.3. Adenovirüs Tabanlı Aşı Vektörünün (Ad5Spike) Yapımı 43

4.4. Ad5Spike Vektörlerinden Spike Protein Sentezinin Teyidi 44

4.5. Yeşil Floresan Protein Kodlayan Adenoviral Kontrol Vektörlerinin (AdGFP) Yapılması 45

4.6. AdGFP Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonu Gösterilmesi 47

4.7. RAW264.7 ve Thp-1 Hücre Hatlarının Adenoviral Kontrol Vektörleriyle Transdükte Edilmesi 48

4.7.1. AdGFP Kontrol Vektörlerinin RAW264.7 Makrofaj Hücre Hattını Transdükte Etme Yeteneği 48

4.7.2. Thp-1 Monositik Hücre Hattının AdGFP Kontrol Vektörüyle Transdüksiyonu 50

4.8. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Plak Testi ile Saflaştırılması 52

4.9. Plak Testi Sonrası Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Titresinin Belirlenmesi ve Protein Sentezi Tayini 54

4.10. Sephadex G-50 Kolonları ile Adenoviral Aşı Vektörleri Sezyum Klorürden Arındırılması 55

4.11. Deney Hayvanlarının Aşılanması 55

4.11.1. Efektör T Hücre Yanıtının ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi 56

4.11.2. Adenoviral Aşı Vektörünün IFN-γ Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Belirlenmesi 58

4.11.3. Adenoviral Aşı Vektörünün TNF-α Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Değerlendirilmesi 60

4.11.4. Adenoviral Aşı Vektörünün IL-2 Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Tayini 62

4.12. Geliştirilen Ad5Spike Aşı Vektörünün Farelerde Spike Spesifik IgG Antikor Yanıtı Oluşumuna Etkisi 64

4.13. Aşı Sonrası Nötralize Edici Antikor Düzeyinin Tespiti 66

5. TARTIŞMA 68

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 73

KAYNAKLAR 74

ÖZGEÇMİŞ 87

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. COVID-19'a karşı geliştirilen adenoviral vektör aşıları 19

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Şekilde SARS-CoV-2 virüsünün konak hücreye girişi ve bağışıklık sistemini aktivasyon mekanizmaları, SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü ve ana bulaşma yolu gösterilmektedir (Bisgin ve ark., 2021). Enfekte kişilerle doğrudan, dolaylı veya yakın temas ya da enfekte bir kişiden öksürme, hapşırma veya konuşma yoluyla saçılan solunum damlacıkları, SARS-CoV-2'nin bulaşmasına neden olabilir. Anjiyotensin I dönüştürücü enzim-2 (ACE2) ve transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2), konakçı hedef hücrelere SARS-CoV-2 (veya 2019-nCoV) girişinde yer alan reseptörler olarak işlev görür. Spike, virüs ve konak hücre membran füzyonunu sağlamak için hücre yüzeyinde TMPRSS2 proteaz tarafından kırılır. Daha sonra SARS-CoV-2 virüsü hücre içinde çoğalır ve potansiyel olarak ciddi pnömoniye yol açan alt hava yollarına geçer. Antijen sunan hücreler, hümoral ve hücresel bağışıklık yanıt aktivasyonu için viral antijenleri bağışıklık hücrelerine iletir. Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücresi oluşumuna ve SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesine yol açan aktivasyona aracılık eder. Aktive edilmiş B hücrelerinden üretilen nötralize edici antikorlar, SARS-CoV-2'ye bağlanır ve onu inaktive eder. Koruma süresi, dolaşımdaki bellek T ve B hücrelerinin varlığına ve ömrüne bağlıdır. SARS-CoV-2, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2. 4

Şekil 2.2. SARS-CoV-2 virüsünün viryon yapısı ve genom bileşimi (Bisgin ve ark., 2021). A. SARS-CoV-2 viryon yapısının şeması. Spike, Zarf, Zar ve Ribonükleoproteinlerin yerleri gösterilmiştir. B. SARS-CoV-2 genomu ~30 kb uzunluğundadır. Spike proteini (S), zarf (E), membran (M) ve nükleoprotein (N) virüs replikasyonu için gerekli; ve aksesuar genler (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b ve orf14) virüs 5

replikasyonu için gerekli değildir. SARS-CoV-2 Spike proteininin bileşenleri, SARS-CoV-2 genomu altında verilmektedir. NTD, N-terminal bölge; RBD, reseptör bağlama bölgesi; SD1, alt etki bölgesi 1; SD2, alt etki bölgesi 2; SS, sinyal dizisi; S2', S2'proteaz kesim bölgesi; FP, füzyon peptidi; HR1, heptad tekrar 1; CH, merkezi sarmal; CD, bağlayıcı etki alanı; HR2, heptad tekrarı 2; TM, transmembran alanı; CT, sitoplazmik kuyruk. Oklar proteaz bölünme bölgelerini gösterir. ORF, açık okuma çerçevesi.

Şekil 2.3. Adenovirüs yapısı ve vektör tasarım stratejisi (Bisgin ve ark., 2021). A. Doğrusal bir dsDNA adenovirüs genomunu, hekson kapsidleri, penton bazları ve fiber proteinlerin topuz alanlarını gösteren moleküler yapısı. B. Adenoviral vektörlerin yabanıl tip genomunun birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyonları ile karşılaştırmalı analizi. Yabanıl tip Ad, ITR ile çevrili erken ve geç genlerin genomik konumları ve Ψ paketleme sinyali taşır. Birinci nesil adenoviral vektörler, E1 ve/veya E3 bölgelerinde delesyonlar taşırken; ikinci nesil vektörlerde E1 ve E3'e ek olarak ek genler, E2 ve E4 çıkartılmıştır. C. Gutless Ad üretim şeması olarak da adlandırılan üçüncü nesil vektörler. Aktarım vektörü transgenini, paketleme sinyalini ve ITR'leri taşır. Paketleme sinyali komşu loxP bölgelerine sahip birinci nesil adenoviral vektörünkine benzer bir yardımcı Ad plazmidi, Gutless adenoviral vektörü üretmek için kullanılır. Transfer vektörü ve yardımcı Ad kodlayan plazmi ile HEK293 hücrelerini eksprese eden Cre rekombinazın (CreR) geçici transfeksiyonu, yalnızca gutless Ad vektörlerinin paketlenmesiyle sonuçlanır. Ad, adenovirüs; ITR, ters terminal tekrarı. 15

Şekil 3.1. Plak testi için viral stoktan seri dilüsyon hazırlanması şeması. Viral stoğun Tris-Cl içerisinde 10-kat tekrarlı dilüsyonuyla oluşturulur. İllüstrasyon, BioRender kullanılarak oluşturulmuştur. 29

Şekil 3.2. Plak testi deney akış şeması (Escalera ve ark., 2022). 1. Virüsler 10 kat seri dilüsyona tabi tutulur. 2. 293A hücreleri adenoviral vektörlerle transdükte edilir. 3. 293A hücrelerinin üzeri %4 agarozlu besiyeri ile kaplanır. 4. Plak oluşumu için hücrelerin takibi yapılır. 5. Oluşan plaklar pipet yardımıyla seçilir. 6. 293A hücreleri bu plaklarla muamele edilerek virüs üretilir. 30

Şekil 3.3. Tek kullanımlık şırıngalara Sephadex G-50 paketlenmesi (https://link.springer.com, Erişim Tarihi: 4 Mart 2024). 32

Şekil 3.4. Saflaştırılmamış T hücrelerinin 'Untouched Mouse T cells kit' kullanılarak basit izolasyonu (https://www.thermofisher.com/, Erişim Tarihi: 2 Haziran 2024). 33

Şekil 3.5. ELISpot ile sitokin ölçümü iş akış şeması (MUTLU, 2014). 35

Şekil 3.6. Psödovirüs nötralizasyon testi iş akış şeması (Cai ve ark., 2024). 37

Şekil 4.1. Gateway LR rekombinasyon reaksiyonu simülasyonu (SnapGene® ile oluşturuldu). Giriş plazmidi (A) üzerinde yer alan attL1/attL2 bölgeleri ile destinasyon vektörü (B) üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri, LR klonaz enzim karışımı aracılığıyla çaprazlanır. Giriş vektörü ile destinasyon vektörünün rekombinasyonu sonucu oluşan transfer vektörü (C) üzerindeki Spike geninin pozisyonu, adenoviral genlerle birlikte gösterilmiştir. 39

Şekil 4.2. Transformasyon sonrası amfisilin içeren (100 µg/ml) LB agar petrilere yayılan ekspresyon vektörlerini taşıyan bakteri kolonilerinin 16 saat sonraki görüntüleri. Mavi noktalar sayılan kolonileri temsil etmektedir. 40

Şekil 4.3. Oluşturulan pAdSpike plazmidlerinin jel görüntüsü. Soldaki panel Snapgene uygulamasıyla oluşturuan temsili jel görüntüsüdür. Sağdaki panelde 1, 2 ve 3 numaralı kuyular farklı kolonilerden izole edilen pAdSpike plazmidininin doğrulamasını temsil etmektedir. Sırasıyla pAd/CMV/V5-DEST™ ve MW isimli kuyu 1 kb plus 41

DNA Ladder moleküler belirtecini temsil etmektedir (Thermo, SM0313).

Şekil 4.4. Spike kodlayan adenoviral ekspresyon plazmidinden (pAd5Spike) SARS-CoV-2 spike glikoprotein ekspresyonunun 293T insan embriyonik böbrek hücre hattında gösterilmesi. Sol paneller, sadece PEI ile muamele edilen hücreleri temsil ederken, sağ paneller, pAdSpike plazmidi ile transfekte edilen hücreleri göstermektedir. Kahverengi boyamalar, spike proteini ekspresyonunu ifade etmektedir. (PEI: polietilenimin) 42

Şekil 4.5. Adenoviral aşı vektörlerinden ultrasantrifüj sonrası oluşan viral bantlar. A. İlk ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. B. İkinci ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. 44

Şekil 4.6. HT1080 hücre hattında SARS-CoV-2 spike glikoprotein ekspresyonu. HT1080 hücreleri artan oranlarda viral titrelerde Ad5Spike vektörü ile transdükte edildi (10^2, 10^3, 10^4, 10^5 vp). Transdüksiyondan 72 saat sonra Anti-SARS-CoV-2 spike glikoprotein antikoru ile immünofloresan boyama gerçekleştirildi. Yeşil ışımalar spike proteini ekspresyonunu ifade etmektedir. Çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı (Büyütme oranı 20X). 45

Şekil 4.7. LxR rekombinasyon reaksiyonu. Destinasyon vektörü üzerindeki (B) attR1/attR2 bölgeleri, LR klonaz enzim karışımı aracılığıyla, giriş plazmidindeki (A) attL1/attL2 bölgeleri ile yer değiştirir. 46

Şekil 4.8. Yeşil floresan proteini kodlayan adenoviral ekspresyon plazmidi haritası. Giriş vektörü ile destinasyon vektörünün LxR rekombinasyonu sonucu oluşan transfer vektörü üzerinde Spike geninin pozisyonu, adenoviral genlerle birlikte gösterilmiştir. Snapgene (Version 4.3.6) kullanılarak oluşturulmuştur. 46

Şekil 4.9. Adenoviral kontrol vektörlerinin saflaştırma basamakları. A. Kontrol vektörleriyle transdüksiyondan 36 saat sonra hücre süpernatantları. B. İlk ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. C. İkinci ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. 47

Şekil 4.10. HT1080 hücre hattında yeşil floresan proteini ekspresyonu. 0, negatif kontrol olarak virüs ile transdükte edilmemiş hücreleri temsil etmektedir. 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 ve 10^5 viral partikül dozlarını ifade etmektedir. Yeşil ışımalar yeşil floresan proteini ekspresyonunu göstermektedir (Büyütme oranı 10X). 48

Şekil 4.11. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin AdGFP ile transdüksiyonu. Objektif büyütmesi 20X. BF: Bright Field (Aydınlık alan), GFP: Yeşil Floresan Protein. 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 ve 10^6 ile belirtilen sayılar kuyu başına düşen virüs dozları olup birimi viral partiküldür. Yeşil ışımalar pozitif floresan protein varlığını temsil eder. 49

Şekil 4.12. Thp-1 insan monositik hücre hatlarının AdGFP ile transdüksiyonu. BF: Bright Field (Aydınlık alan), GFP: Yeşil Floresan Protein. Hücreler farklı objektif büyütmeleri kullanılarak görüntülenmiştir (10X, 20X, 40X). 10^3 ve 10^4 ile belirtilen sayılar kuyu başına eklenen virüs dozları olup birimi viral partiküldür. Yeşil ışımalar pozitif floresan protein varlığını temsil eder. 51

Şekil 4.13. Plak testi sonrası günlere göre plak oluşum çizelgesi. 53

Şekil 4.14. HT1080 hücre hattında yeşil floresan protein ekspresyonu. Hücreler, GFP kodlayan birinci nesil adenoviral vektörler ile kuyu başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4,10^5 ve 10^6 virüs partikülü olacak şekilde transdükte edildi. 0, deney kontrolü olarak virüs ile transdükte edilmemiş hücreleri temsil etmektedir. Yeşil ışımalar, yeşil floresan proteini ekspresyonunu ifade eder. 54

Şekil 4.15. Ad5Spike aşı vektörü ile intraperitoneal olarak aşılanmış farelerden alınan kan serumlarında gerçekleştirilen IFN-γ ELISA analizi. A. Enjeksiyondan 30 gün sonra gerçekleştirilen ELISA analizi. B. Enjeksiyondan 90 gün sonra gerçekleştirilen ELISA sonuçlarını temsil etmektedir. (Gruplar *n*=5; *p<0,01 One-way ANOVA) 57

Şekil 4.16. Ad5Spike aşı vektörü ile intraperitoneal olarak aşılanmış farelerden alınan splenositlerde IFN-γ ELISpot analizi. A. Enjeksiyondan 30 gün sonra gerçekleştirilen ELISpot analizi. B. Enjeksiyondan 90 gün sonra gerçekleştirilen ELISpot sonuçlarını temsil etmektedir. (Gruplar *n*=5; *p<0,05, ***p=0,0001, ****p <0,0001Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi ve One-way ANOVA) 59

Şekil 4.17. Aşılanan farelerden alınan splenositlerden 30 gün (A) ve 90 gün (B) sonra gerçekleştirilen TNF-α ELISpot analizi. (Gruplar *n*=5; ****p<0,0001 One-way ANOVA ve Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi) 61

Şekil 4.18. Aşılanan farelerden alınan splenositlerden 30 gün (A) ve 90 gün (B) sonra IL-2 ELISpot analizi. (Gruplar *n*=5; *p<0,05 One-way ANOVA ve Tukey Çoklu Karşılaştırma) 63

Şekil 4.19. Adenoviral aşı vektörleriyle aşılanan dişi BALB/c fare serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titresi. A. Aşılamadan 30 gün sonra 10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül ile aşılanan ve kontrol grubu farelerinin serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titreleri. B. Aşılamadan 90 gün sonra 10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül ile aşılanan ve kontrol grubu farelerinin serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titreleri (Deney grupları *n*=5; *p<0,05 Two Way ANOVA ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi) 65

Şekil 4.20. Aşılamanın ardından 30 (A) ve 90 (B) günlerinde Wuhan-1 varyantına karşı pseudovirüslerin nötralizasyonu değerlendirilmesi. ID50 değerleri, aşılanmış bireylerin belirli zaman dilimlerinde 67

Wuhan-1 varyantını nötralize etme yeteneklerini yansıtmaktadır. Hata barları ID50 titrelerinin %95 güven aralıklarını göstermektedir. (Deney grupları n=5; *p<0,05 One-way ANOVA)

SİMGELER ve KISALTMALAR

2019-nCoV	:	2019 Yeni Koronavirüs
aa	:	Aminoasit
AAV	:	Adeno-asosiye virüs
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
ACE2	:	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
Ad	:	Adenovirüs
Ad5Spike	:	Spike proteini kodlayan Serotip 5 Adenovirüs
Ad5-nCoV	:	Adenovirüs Serotip 5 Vektör Tabanlı Yeni Koronavirüs Aşısı
Ad26	:	Adenovirüs Serotip 26
Ad26.COV2.S	:	Adenovirüs 26 Vektör Tabanlı COVID-19 Aşısı
ADE	:	Antikora bağlı alevlenme
AdGFP	:	Yeşil floresan proteini kodlayan adenovirüs
AdHu5	:	Adenovirüs İnsan Serotip 5
Att	:	Bağlantı
BARDA	:	Biyomedikal İleri Araştırma ve Geliştirme Kurumu
BCIP	:	5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat
BF	:	Aydınlık alan
BHA	:	Bütün hücre antijenleri
BSA	:	Bovin serum albumin
BSL	:	Biyogüvenlik seviyesi
CAR	:	Kimerik antijen reseptör
CD	:	Bağlayıcı etki alanı

CEPI	:	Salgın Hazırlık İnovasyonları Koalisyonu
CH	:	Merkezi sarmal
ChAd1	:	Şempanze adenovirüs 1
ChAd68	:	Şempanze adenovirüs 68
CND	:	Kritik nötralize bölge
COVID-19	:	Koronavirüs hastalığı 2019
CPE	:	Sitopatik etki
CreR	:	Cre Rekombinaz
CsCl	:	Sezyum Klorür
CT	:	Sitoplazmik kuyruk
CTL	:	Sitotoksit T lenfosit
DAB	:	Diaminobenzidin
DAPI	:	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	:	Çift zincirli deoksiribonükleik asit
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
E	:	Zarf proteini
E. coli	:	Escherichia coli
ELISA	:	Enzim Bağlı İmmün Sorbent Testi
ELISpot	:	Enzim-bağlı İmmünospot
EMA	:	Avrupa İlaç Ajansı
ENSEMBLE2	:	İkinci Nesil Tahmin Modeli Topluluğu

EUL	:	Acil kullanım listesi
FBS	:	Fetal bovin serum
FCS	:	Fetal kanin serum
FDA	:	Amerika Gıda ve İlaç Kurumu
FP	:	Füzyon peptidi
GFP	:	Yeşil floresan protein
GMP	:	İyi üretim uygulaması
hACE2	:	İnsan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2
HAd5	:	İnsan Adenovirüs tip 5
HAd26	:	İnsan Adenovirüs Tip 26
HAd35	:	İnsan Adenovirüs Tip 35
HC-Adv	:	Yüksek kapasiteli üçüncü nesil adenovirüs
HCV	:	Hepatit C Virüsü
hDPP4	:	İnsan dipeptidil peptidaz 4 enzimi
HKU1-CoV	:	İnsan koronavirüs HKU1
HR1	:	Heptad tekrar 1
HR2	:	Heptad tekrarı 2
HRP	:	Horse Radish Peroksidaz
ID50%	:	İnhibisyon dilüsyonu
IF	:	İmmünofloresan
IFN-γ	:	İnterferon gama
IgG	:	İmmünoglobulin G
IHC	:	İmmünohistokimya

IL-4	:	İnterlökin 4
IL-1β	:	İnterlökin 1 beta
IL-6	:	İnterlökin 6
ITR	:	Ters terminal tekrarı
LentiRFPSpike	:	RFP kodlayan Spike Psödotiplendirilmiş Lentivirüs
LV	:	Lentivirüs
M	:	Membran
MERS	:	Orta Doğu Solunum Sendromu
MERS-CoV	:	Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü
MHC	:	Ana Histokompatibilite Kompleksi
MOI	:	Multiplicity of Infection
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MW	:	Moleküler Ağırlık
N	:	Nükleokapsid
NBT	:	Nitroblue Tetrazolium
NIAID	:	Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü
OD	:	Optik Densite
OPTIMEM	:	Opti-Minimum Essential Medium
ORF	:	Açık okuma penceresi
pAd5Spike	:	Spike geni taşıyan tip 5 adenovirüs ekspresyon plazmidi
PBS	:	Fosfat buffer salin
PEI	:	Polietilenimin
PF4	:	Trombosit faktör 4

PFA	:	Paraformaldehit
RBD	:	Reseptör bağlanma bölgesi
RNA	:	Ribonükleik asit
rpm	:	Dakikadaki devir sayısı
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
S	:	Spike
SARS	:	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu
SARS-CoV	:	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü
SARS-CoV-2	:	Şiddetli Akut Solunum Yolu Sendromu Koronavirüsü-2
SAVE	:	Sentetik Zayıflatılmış Virüs Modifikasyon
SD1	:	Alt etki bölgesi 1
SIV	:	Alt etki bölgesi 2
SS	:	Sinyal dizisi
TE	:	Tris EDTA
TGEV	:	Transmissible Gastroenteritis Virus
Th1	:	Yardımcı T hücreleri Tip 1
Th2	:	Yardımcı T hücreleri Tip 2
TM	:	Transmembran alanı
TMB	:	3,3',5,5'-tetrametilbenzinidin
TMPRSS2	:	Transmembran proteaz serin 2
TNF-α	:	Tumor Necrosis Factor-alpha
TTS	:	Trombositopeni sendromu

1. GİRİŞ

İlk olarak 2019 Aralık ayında ortaya çıkan ve çok kısa sürede tüm dünyaya yayılan SARS-CoV-2 pandemisi, yeni patojenlerin küresel sağlık üzerindeki korkutucu etkisini gözler önüne sermiştir. Bu tür tehditlere karşı mücadelede yeni ve etkili aşı teknolojilerinin geliştirilmesi hayati önem arz etmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün Temmuz 2023 itibariyle sunduğu verilere göre, 183 aşı klinik geliştirme aşamasında olup, 199 aşı klinik öncesi aşamada ve 13 aşı adayı ise kullanım onayı almıştır (https://extranet.who.int/, Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023). Onaylanmış aşılar, protein alt birimi aşıları, virüs vektör aşıları, virüs benzeri parçacıklar, DNA ve mRNA aşıları, zayıflatılmış virüs aşıları ve inaktif virüs içerikli aşıları içerir. Aşıların çalışma mekanizmaları birbirinden farklı olsa da ortak amaçları SARS-CoV-2'ye karşı uzun süreli hücresel ve hümoral bağışıklık yanıtı oluşturmaktır.

Viral vektörler, seçilmiş immünojenleri konak hücreye iletmek için rekombinant virüslerin kullanıldığı, nispeten yeni bir aşı platformudur. Rekombinant bir viral vektör olan hepatit-B yüzey antijeni geni taşıyan vaksinya virüsü, aşı taşıyıcı sistem olarak ilk kez 1984 yılında kullanılmıştır (Smith ve ark., 1983; Moss ve ark., 1984). 2020'den önce sadece 5 tanesi insanda kullanılmak üzere onay almıştır. Bununla birlikte, çeşitli enfeksiyon patojenlerine ve özellikle kanser gibi bulaşıcı olmayan hastalıklara karşı birçok viral vektör aşısı da geliştirilmiştir (Sasso ve ark., 2020).

Hızlı ve etkili bir şekilde bulaşıcı hastalıklara karşı aşı geliştirmek için tercih edilen vektörler arasında yer alan Adenoviral vektörler (Ad), COVID-19 için de aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır. Replikasyon yeteneği olmayan Ad vektörlerin, doku tropizminin geniş olması, yüksek transdüksiyon etkinlikleri, büyük transgen kapasiteleri ve yüksek titrelerde üretim gibi avantajları bulunur. Ayrıca, Ad vektörleri doğal adjuvan etkilidir ve oldukça etkin bir transgen özgün T hücre ve B hücre antikor yanıtı oluştururlar. Bu da onları potansiyel aşı vektörleri olarak son derece cazip kılar. 30 Mart 2023 itibarıyla, SARS-CoV-2'ye karşı 29 viral vektör aşısı geliştirilmekte olup, bunların büyük çoğunluğunu (18 tanesi) adenovirüs bazlı aşılar oluşturmaktadır (3'ü faz III'te, 5'i faz II'de itibariyle dört adenoviral vektör aşısı, Oxford-AstraZeneca (ChAdOx1-S), Johnson &

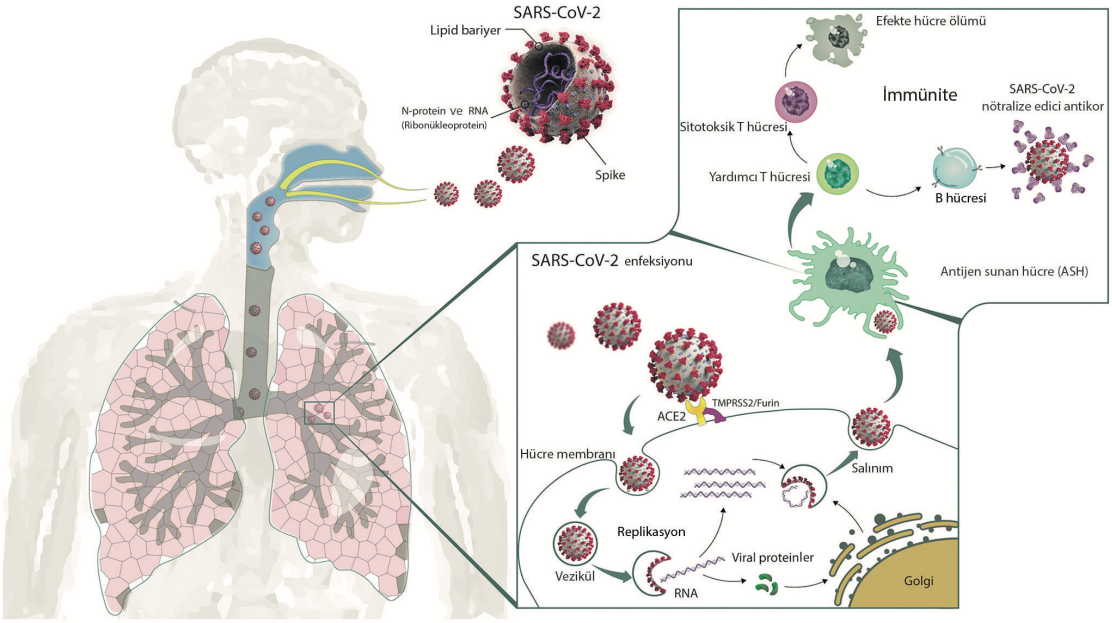
Johnson (Janssen), Sputnik V (Gam-COVID-Vac) ve Cansino (Convidecia) DSÖ tarafından Acil Kullanım Listesine (EUL) dahil edilmiştir (Chavda ve ark., 2023). Son 4 yılda SARS-CoV-2 pandemisine yanıt olarak, adenoviral vektör aşılarının hızla geliştirilmesi ve uygulanması, bu vektörlerin kullanışlılığını, etkisini, ölçeklenebilirliğini ve etkinliğini göstermiştir. Farklı popülasyonlarda güçlü hücresel ve hümoral bağışıklık yanıtları uyandırdığı gösterilen adenoviral aşı vektörleri, gelecekteki bulaşıcı hastalıklara karşı da kullanılacak gibi görünmektedir.

Bu çalışmada COVID-19 hastalığına karşı kullanılmak üzere, SARS-CoV-2'ye özgün tam uzunluktaki Spike glikoproteini taşıyan doğal adjuvan etkili 1. jenerasyon insan adenoviral vektörler (Ad5Spike) geliştirilmiştir. Bu bağlamda geliştirilen Ad5Spike vektörleri 4-6 haftalık dişi BALB/c farelere intraperitoneal yolla enjekte edilerek SARS-CoV-2 Spike glikoproteinine karşı kısa ve uzun dönemde gelişen hücresel ve hümoral immün yanıt profilinin aydınlığa kavuşturulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Koronavirüs hastalığı (COVID-19), şiddetli akut solunum yolu sendromu 2 (SARS-CoV-2) virüsünün neden olduğu bulaşıcı bir solunum yolu hastalığıdır. SARS-CoV-2, yarasalar ve kemirgenler gibi diğer konaklardan insanlara bulaşan yedinci koronavirüstür. Bu hastalık Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 30 Ocak 2020'de uluslarası boyutta acil halk sağlığı sorunu, 11 Mart 2020'de de pandemik bir hastalık olarak ilan edildi. 31 Ağustos 2023 itibariyle, dünya genelinde 770 milyondan fazla bireyi enfekte etmesi ve yaklaşık 7 milyon kişinin ölümüne sebebiyet vermesi, SARS-CoV-2'yi insanlık tarihindeki en ölümcül virüslerden biri haline getirmiştir (https://extranet.who.int/, Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023). 2020'den bugüne ülkemizde 17,004,681 vaka ve 101,419 ölüm Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bildirilmiştir (https://data.who.int, Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023).

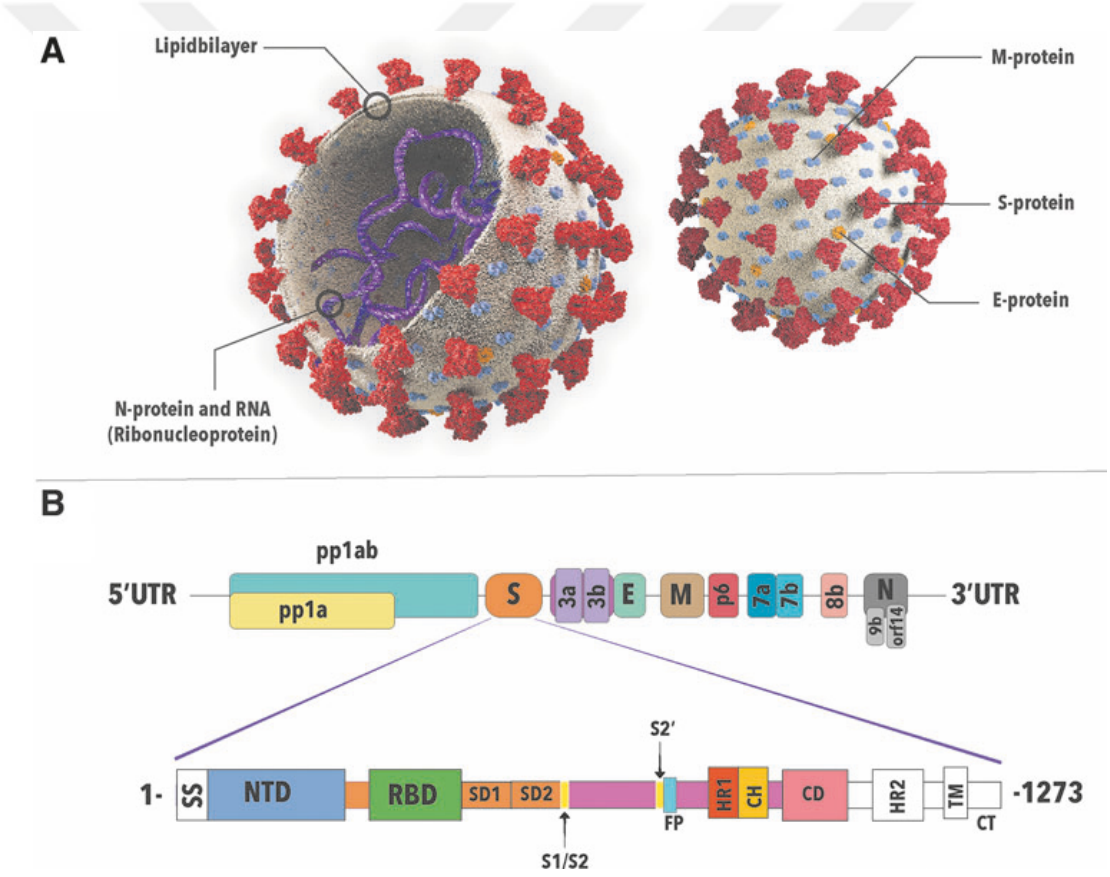
SARS-CoV-2, hedef hücre yüzeyinde bulunan Anjiotensin Değişim Enzimi 2 (ACE2) isimli reseptöre bağlanarak hücre içine girer (Hoffmann ve ark., 2020); ateş, kuru öksürük ve nefes daralmasıyla karakterize ölüme kadar gidebilen ciddi solunum yolu enfeksiyonuna sebebiyet verir (Huang ve ark., 2020). Yaşlılar, temel sağlık sorunları olanlar ve bağışıklık sistemi zayıf olanlar özellikle risk altındadır. COVID-19, öksürme, hapşırma veya konuşma sırasında çıkan damlacıkların temasıyla veya virüsün temas edilen yüzeylerden elin ağız, burun veya gözlere götürülmesiyle yayılır. Ayrıca, enfekte kişilerin soluduğu havadaki küçük damlacıkların solunmasıyla da bulaşabilir (Şekil 2.1). Hastalığın yayılmasını önlemek için maske takma, el hijyeni, sosyal mesafe ve aşılar gibi önlemler alınabilir. SARS-CoV-2'nin yüksek bulaşıcılığı, COVID-19 ile mücadelede aşılamanın önemli bir strateji haline gelmesine neden olmuştur (Krammer, 2020).



Şekil 2.1. Şekilde SARS-CoV-2 virüsünün konak hücreye girişi ve bağışıklık sistemini aktivasyon mekanizmaları, SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü ve ana bulaşma yolu gösterilmektedir (Bisgin ve ark., 2021). Enfekte kişilerle doğrudan, dolaylı veya yakın temas ya da enfekte bir kişiden öksürme, hapşırma veya konuşma yoluyla saçılan solunum damlacıkları, SARS-CoV-2'nin bulaşmasına neden olabilir. Anjiyotensin I dönüştürücü enzim-2 (ACE2) ve transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2), konakçı hedef hücrelere SARS-CoV-2 (veya 2019-nCoV) girişinde yer alan reseptörler olarak işlev görür. Spike, virüs ve konak hücre membran füzyonunu sağlamak için hücre yüzeyinde TMPRSS2 proteaz tarafından kırılır. Daha sonra SARS-CoV-2 virüsü hücre içinde çoğalır ve potansiyel olarak ciddi pnömoniye yol açan alt hava yollarına geçer. Antijen sunan hücreler, hümoral ve hücresel bağışıklık yanıt aktivasyonu için viral antijenleri bağışıklık hücrelerine iletir. Yardımcı T hücreleri, sitotoksik T hücresi oluşumuna ve SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesine yol açan aktivasyona aracılık eder. Aktive edilmiş B hücrelerinden üretilen nötralize edici antikorlar, SARS-CoV-2'ye bağlanır ve onu inaktive eder. Koruma süresi, dolaşımdaki bellek T ve B hücrelerinin varlığına ve ömrüne bağlıdır. SARS-CoV-2, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2.

Aşılar enfeksiyöz hastalıkların kontrolü ve korunmasında en ekonomik ve en etkin yol olduğundan, SARS-CoV-2 enfeksiyonu için aşı geliştirilme çalışmaları hızla başlamıştır (Remy ve ark., 2014). SARS-CoV-2 suşlarının coğrafya dağılımın, transmisyon yeteneğinin ve sebep oldukları hastalık şiddetinin farklı olması aşı geliştirme çalışmalarını komplike hale getirmektedir (Tang ve ark., 2020). Yeni ve etkili aşı teknolojilerinin geliştirilmesi, bu tür tehditlerle mücadelede hayati öneme sahiptir (McCann ve ark., 2022). Aşı geliştirme çalışmalarında en önemli konu hücresel ve hümoral bağışıklığı uyaracak antijen seçimi olup kullanılan vektör tipi ve adjuvan tercihi de başarı şansını etkileyen faktörlerdendir (Zhang J. ve ark., 2020a). Bu durumda, etkili bir SARS-CoV-2 aşısının geliştirilebilmesi için virüsün moleküler yapısının iyi bir şekilde aydınlatılması gerekmektedir (Zhang Y. ve ark., 2020b).

SARS-CoV-2 virüsü, beta koronavirüs ailesinin bir üyesi olup yapısında pozitif zincir RNA taşır. Toplam genomu 29,700 nükleotit uzunluğunda olan ve SARS-CoV ile %79,5 benzerlik taşıyan bu virüsün genomunun 5'ucunda 15-16 tane yapısal olmayan proteinleri kodlayan oldukça uzun ORF1ab diye isimlendirilen poliprotein kodlayan bir sekans bulunur (Şekil 2.2) (Guo ve ark., 2020). Genomun 3' ucunda ise Spike (S), nükleokapsit (N), membran (M) ve zarf (E) adı verilen en önemli 4 ana yapısal proteinleri kodlayan genler vardır (Phan, 2020). Bu yapısal proteinlerin tümü, aşağıda belirtildiği gibi aşı geliştirme çalışmalarında antijen olarak kullanılabilmektedir.



Şekil 2.2. SARS-CoV-2 virüsünün viryon yapısı ve genom bileşimi (Bisgin ve ark., 2021). A. SARS-CoV-2 viryon yapısının şeması. Spike, Zarf, Zar ve Ribonükleoproteinlerin yerleri gösterilmiştir. B. SARS-CoV-2 genomu ~30 kb uzunluğundadır. Spike proteini (S), zarf (E), membran (M) ve nükleoprotein (N) virüs replikasyonu için gerekli; ve aksesuar genler (3a, 3b, p6, 7a, 7b, 8b, 9b ve orf14) virüs replikasyonu için gerekli değildir. SARS-CoV-2 Spike proteininin bileşenleri, SARS-CoV-2 genomu altında verilmektedir. NTD, N-terminal bölge; RBD, reseptör bağlama bölgesi; SD1, alt etki bölgesi 1; SD2, alt etki bölgesi 2; SS, sinyal dizisi; S2', S2'proteaz kesim bölgesi; FP, füzyon peptidi; HR1, heptad tekrar 1; CH, merkezi sarmal; CD, bağlayıcı etki alanı; HR2, heptad tekrarı 2; TM, transmembran alanı; CT, sitoplazmik kuyruk. Oklar proteaz bölünme bölgelerini gösterir. ORF, açık okuma çerçevesi.

2.1. Antijen Seçimi

Bütün hücre antijenleri denince (BHA) virüse ait tüm proteinler, lipitler, polisakkaritler ve nükleik asitler kastedilmektedir. BHA'lar ölü veya canlı/zayıflatılmış aşıların geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Barteling, 2002; Minor, 2015). BHA'ların kompleks kompozisyonlarından dolayı kalite kontrolü ve etkinlik değerlendirme aşamalarında güçlüklerle karşılaşılmaktadır. Aslında SARS-CoV-2 aşı geliştirme çalışmalarında en ümit verici antijen Spike proteinidir. Bunun 3 sebebi vardır. Birincisi, virüsün kendi yüzeyinde bulunduğundan konakçı immün sistem hücreleri tarafından kolaylıkla tanınarak virüse karşı bir bağışıklık yanıtının gelişmesine sebebiyet verir (Wrapp ve ark., 2020). İkincisi, virüsün ACE2 reseptörüne bağlanarak hücre içine girmesine ve patojenik etkisini göstermesine sebep olan bir protein olmasıdır (Lan ve ark., 2020). Sonuncusu da SARS-CoV ve MERS-CoV virüslerine ait homolog S proteinlerinin aşı geliştirme çalışmalarında daha önce kullanılarak oldukça etkin olduklarının gösterilmesidir (He ve ark., 2004; Woo ve ark., 2005; Zakhartchouk ve ark., 2007; Du ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2018). SARS-CoV-2 virüsünün Spike proteini monomerik formda 140 kDa ağırlığında olup 1273 aa içerir (Şekil 2.2). Doğal olarak kendiliğinden trimer yapabilen Spike proteinin S1 ve S2 isimli 2 alt bölgesi bulunur. Spike proteinin reseptör bağlanma bölgesi (RBD) S1 alt ünitesinin karboksil ucunda (CTD) yer alır. S2 alt ünite; membran füzyonu için gerekli olan füzyon peptidi (FP), iki 7 peptid tekrarı (HR) ve transmembran bölgesini içerir (TM) (Li F., 2016). SARS-CoV-2 Spike proteinin trimerik füzyon konformasyonundaki yapısının ve RBD/ACE2 kompleksinin görüntülenmesi, bu proteinin aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmasıyla ilgili önemli ip uçları sunmuştur (Lan ve ark., 2020; Wrapp ve ark., 2020). Şu ana kadar aşı geliştirme çalışmalarında potansiyel olarak Spike proteinin kendisi dahil (bütün Spike proteini), RBD bölgesi, S1, NTD ve FP gibi farklı alt üniteleri ayrı ayrı kullanılmıştır.

2.1.1. Tam Uzunluktaki Spike Proteini

Proteinler ancak kısaltılmaksızın bir bütün olarak kullanıldıklarında hem doğal konformasyonunda olacaklarından hem de bağışıklık sistem hücrelerine daha fazla epitop sunabileceklerinden daha immünojenik olurlar. Bakulovirüs aracılı insekt hücrelerinde

üretilen Spike proteini nanopartiküller içerisinde ve alum adjuvanıyla birlikte farelere verildiğinde yüksek titrede nötralize antikor üretimine sebebiyet verdiler (Coleman ve ark., 2014). MERS-CoV S proteini kodlayan DNA aşısı enfeksiyon sonucu gelişen zatürre klinik bulgularını azaltarak; farelerde, develerde ve resüs maymunlarda bağışıklık yanıtı oluşturdu (Muthumani ve ark., 2015). Rekombinant, tam uzunluktaki Spike proteini trimerik konfigürasyonda yüksek düzeyde immünojenik olup koruyucu bağışıklık yanıt oluşturduğu bildirilmiştir. Spike proteini, doğal formunda zaten trimeriktir ancak ökaryotik hücrelerde ektodomain bölgesi rekombinant protein olarak sentezlendiğinde monomerik formda kalmaktadır. Normalde bakteriofaj T4 fibritin proteininde bulunan foldon isimli 27-aminoasit sekans uzunluğundaki (YIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFLG) bir protein dizisi rekombinant Spike proteinini trimerik forma sokmak için kullanılmıştır (Li J. ve ark., 2013). Rekombinant prefüzyon MERS-CoV Spike-foldon, MERS-CoV Spike proteinine kıyasla BALB/c farelerde 2,8 kat daha fazla nötralize antikorlar oluşturmuştur (Pallesen ve ark., 2017). Nihayetinde Clover Biopharmaceuticals isimli bir firma, patentli Trimer-Tag© teknolojisi kullanarak SARS-CoV-2 S protein trimer aşısını (S-Trimer) geliştirdiklerini açıklamışlardır. Ulusal Alerji ve Enfeksiyöz Hastalıklar Enstitüsü'nün Aşı Araştırma Merkezi'ndeki araştırmacılar da Spike proteinini prefüzyon konformasyonunda kilitleyen (US Application No. 62/412,703) yeni bir aşı geliştirdiğini duyurmuştur. Bu teknoloji HKU1-CoV, SARS-CoV ve MERS-CoV virüslerinin Spike proteinlerine de uygulanmıştır. MERS-CoV virüsünün S2 alt bölgesindeki HR1 ve CH bölgeleri arasındaki bölgede iki prolin değişimi yaparak (V1060 ve L1061) prefüzyon ektodomainlerin ekspresyonları arttırılarak füzyon proteinin zamansız aktivasyonu engellenmiştir (Pallesen ve ark., 2017). Bazı çalışmalarda tam uzunluktaki S proteininin antikor bağımlı alevlenme (ADE) denen bir etkiyle (Luo ve ark., 2018) karaciğer hasarına yol açarak enfeksiyon bulgularını arttırdığı iddia edilmiştir (Du ve ark., 2009). Bu etkinin Spike proteine özgü antikorlar tarafından oluşturulduğuna inanılmaktadır (Wang Q. ve ark., 2016; Liu L. ve ark., 2019). Ancak şu an için SARS-CoV-2 Spike proteinin hangi bölgesinin karaciğer hasarından sorumlu olduğu bilenmemekle birlikte etkin nötralize edici antikor oluşumu durumunda bu yan etkinin gözlemlenmediği saptanmıştır. Pfizer-BioNTech COVID-19 aşısı (Comirnaty veya BNT162b2) ve Moderna COVID-19 aşısı

(mRNA-1273) SARS-CoV-2'nin Spike proteininin tam uzunluğunu kodlayan, FDA ve EMA tarafından tam kullanım onaylı, mRNA aşılarıdır (Teo, 2022).

2.1.2. Reseptör Bağlanma Bölgesi (RBD)

Spike proteinin RDB bölgesi ACE2 reseptörleriyle direkt olarak interaksiyona girdiğinden, RBD immünizasyon sonucu oluşan spesifik antikorların virüse bağlanarak virüsün hücreye girmesini önleyeceği beklenir. RBD aşılarının Th2 tip immünopatolojik yanıt oluşturan diğer aşılara göre daha güvenli olduğu öne sürülmektedir. Spike proteinin RDB bölgesi Kritik Nötralize Bölge (CND) içerdiğinden farklı SARS-CoV suşları arasında kros reaksiyon gösteren yüksek düzeyde nötralize antikor yanıtı oluşturur. Bu sebeple, RBD bölgesi SARS-CoV (Zhu X. ve ark., 2013) ve MERS-CoV (Lan ve ark., 2015) aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır (Nyon ve ark., 2018). Örneğin, Novavax COVID-19 aşısı ve Covaxin gibi RBD'yi antijen olarak kullanan aşılar, SARS-CoV-2'nin hücreye girmesini engelleyen spesifik antikorlar oluşturmayı hedefler ("Covid-19 protein subunit vaccine (novavax)," 1994; Sharma R. ve ark., 2021). Ancak, koronavirüsler RBD bölgesinde antikordan kaçış mutasyonları sergileyebileceğinden, bu aşıların kullanımı halen tartışmalıdır.

2.1.3. Amino Uç Bölgesi (NTD), S1 Altünitesi, Füzyon Proteini (FP)

RBD bölgesine benzer şekilde farklı koronavirüslerin Spike proteininin NTD bölgesi, karbonhidrat reseptör bağlanma özelliği gösterir. Örneğin TGEV virüsünün Spike proteinin NTD bölgesi sialik asite bağlanır (Krempl ve ark., 1997). MERS-CoV Spike proteinin NTD bölgesi etkin bir hücresel immün yanıt ve antijene özgü nötralize antikorlar oluşumuna sebebiyet vererek fareleri virüs enfeksiyonundan koruduğu tespit edilmiştir (Jiaming ve ark., 2017). Bunun yanında MERS-CoV S1 altünitesinin NTD bölgesine bağlanan monoklonal bir antikorun, MERS-CoV virüsünün EMC/2012 suşuna karşı etkin bir nötralize antikor yanıtı oluşturduğu bulunmuştur (Chen ve ark., 2017). Ancak koronavirüslerin genomları sürekli değişebildiğinden virüsün immün yanıttan kaçmasını engellemek için farklı epitopları hedefleyen antikorlar kullanmak gerekir. RBD ve NTD bölgeleri içeren S1 altünitesi Spike proteininin hücre reseptörüne bağlanmasını sağlar. MF59 adjuvanlı MERS-CoV S1 nötralize antikorlar oluşturarak hDPP4 transgenik fareleri

öldürücü virüs dozundan korumuştur (Wang Y. ve ark., 2017). Adjuvan S1 proteini ile immünizasyonun develeri ve alpakaları MERS-CoV enjeksiyonuyla oluşturulan üst solunum yolu enfeksiyonundan koruduğu belirlenmiştir (Adney ve ark., 2019). S2 altünitesinin FP bölgesi virüsle membranın füzyonunu sağlayan viral patojenitede önemli bir bölgedir (Alsaadi ve ark., 2019). Örneğin, Tianjin Üniversitesi araştırmacıları RBD-FP füzyon proteini inşa ederek fareleri immünize etmişlerdir ve bu füzyon proteini ile aşılanan farelerde yüksek düzeyde antikor tespit edilmiştir (Zhang J. ve ark., 2020a). Bu aşıların etkinliği halen klinik öncesi araştırma aşamasındadır.

2.1.4. Nükleokapsit Protein (N), Membran Proteini (M) ve Zarf Proteini (E)

50 kDa ağırlığında ve dizisi türler arasında oldukça korunmuş olan N proteini koronavirüslerde en çok bulunan proteindir. Nükleokapsiti oluşturmanın dışında, mRNA transkripsiyonu, virüsün hücreden çıkması ve RNA replikasyonunu sağlama gibi farklı görevleri vardır (McBride ve ark., 2014). Bu protein oldukça antijenik olup SARS geliştiren hastaların %89'unda bu antijene karşı antikor saptanmıştır (Leung ve ark., 2004). SARS-CoV N protein kodlayan DNA aşısı C57BL/6 farelerde N antijenine karşı oldukça güçlü hümoral ve hücresel immün yanıt geliştirip vaccinia virüsü enjeksiyonuna karşı kısmi koruma sağlamıştır (Kim ve ark., 2004). Diğer taraftan avian infectious bronchitis virüsünün N proteininin sitotoksit T lenfosit (CTL) indüksiyonuyla hücresel yanıt geliştirerek klinik bulgularda azalmaya sebebiyet verdiğini gösteren çalışmalar da vardır (Collisson ve ark., 2000; Seo ve ark., 2000). Tersine, başka bir çalışmada ise N protein ile immünizasyonun nötralize antikor oluşumuna sebebiyet vermediği, hamsterleri enfeksiyondan korumadığı ileri sürülmüştür (Buchholz ve ark., 2004). Dolayısıyla bu proteinin aşı geliştirilmesinde kullanılıp kullanılamayacağıyla ilgili tereddütler vardır. En azından antijenik özelliğinden dolayı diagnostik çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir. M proteini 25 kDa ağırlığında bir transmembran glikoproteini olup SARS-CoV virüsünün yüzeyinde en yaygın bulunan proteindir ve yeni viryon oluşmasında görev alır (Neuman ve ark., 2011). Tam uzunluktaki M proteinin immünizasyonu SARS hastalarında etkin bir nötralize antikor oluşumuna sebebiyet vermiştir (Pang ve ark., 2004). İmmünolojik ve yapısal çalışmalarla M proteininin transmembran bölgesinde T hücre epitopu bulunduğu ve bunun çok güçlü hücresel immün

yanıt oluşturduğu tespit edilmiştir (Liu J. ve ark., 2010). M proteini türler arasında da oldukça korunan bir protein olduğundan (Neuman ve ark., 2011), SARS-CoV-2 aşısı geliştirmek için aday antijen olarak değerlendirilmektedir. Spike, N ve M proteinleriyle karşılaştırıldığında E proteininin immünojen olarak kullanımı önerilmemektedir. Zira E proteini kanal aktiviteli immünojenitesi düşük bir proteindir. Ancak E proteininin yokluğunda IL-1β, TNF-α ve IL-6 gibi inflamatuvar moleküllerin salınımı azaldığından SARS-CoV için önemli bir virülans faktörü olduğuna inanılmaktadır (Nieto-Torres ve ark., 2014). Ancak, bu aşılar henüz klinik denemelerde veya geniş çapta kullanımda değillerdir.

2.2. Vektör Seçimi

2.2.1. Canlı-zayıflatılmış ya da İnaktif Virüs Aşıları

Laboratuvar ortamında zayıflatılmış virüslerin kullanılmasıyla oluşturulan canlı-zayıflatılmış aşılar 1950'lerden beri kullanılmaktadır. Bu zayıflatılmış virüsler, aşılanmış kişilerde çoğalabilir ve minimum veya hiç yan etki göstermeden immün yanıt oluşturabilirler. Yabanıl tip virüs enfeksiyonuna kıyasla, canlı-zayıflatılmış viral aşılar hafıza hücrelerinin oluşumu için gereken antijenik uyarımı sağlayabilirler (Sharma A. ve ark., 2011). Ancak, bu aşıların kullanımıyla ilgili bazı güvenlik endişeleri bulunmaktadır. Canlı-zayıflatılmış patojenler, nadiren aşılanmış bireylerde patojenik forma dönüşebilir ve hastalığa neden olabilirler. Ayrıca, zayıf bağışıklık sistemine sahip kişilerde etkili bir immün yanıt alınamayabilir. Bununla birlikte, Codagenix ve Hindistan Serum Enstitüsü gibi şirketler, SARS-CoV-2'ye karşı tek doz intranazal olarak uygulanan COVI-VAC adlı canlı-zayıflatılmış aşıyı geliştirmiştir. Bu aşının üretiminde, Codagenix'in sentetik biyolojiden yararlanarak geliştirdiği Sentetik Zayıflatılmış Virüs Modifikasyon (SAVE) platformu kullanılmıştır. Aşının etkinliği halen klinik denemelerde test edilmektedir (Gordeychuk ve ark., 2023). Fiziksel (ısı) veya kimyasal (formaldehit) yöntemlerle öldürülen virüslerden üretilen inaktif virüs aşıları da önemlidir. Hem inaktif hem de canlı-zayıflatılmış aşılar, konakçıya birçok antijenik bölge sunarak patojene karşı değişken bir bağışıklık yanıtı oluşumunu sağlarlar. Geleneksel aşılar olarak kabul edilen inaktif virüs aşıları, kolayca üretilebilir ve klinik çalışmalara hızlıca dahil edilebilirler. Dünya genelinde, SARS-CoV-2 suşlarını başarıyla izole eden birçok kurum, zamandan tasarruf

etmek için hızla geleneksel aşı geliştirme çalışmalarına başlamıştır. Örneğin, Çin'de Sinovac tarafından geliştirilen CoronaVac adlı COVID-19 aşısı için Nisan 2020'de klinik bir deneme onaylanmıştır. CoronaVac aşısının Faz III klinik çalışmaları Brezilya, Şili, Endonezya, Filipinler ve Türkiye'de yapılmıştır. CoronaVac aşısının Türkiye'de %92, Endonezya'da %65 ve Brezilya'da %50.38 gibi farklı etkinlik seviyeleri göstermesinin her ülkede yapılan Faz 3 çalışmalarındaki gönüllülerin özelliklerinden ve izlenen parametrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Zhang Y. ve ark., 2020b; Jin ve ark., 2022).

Türkiye, COVID-19 aşı geliştirme çalışmalarını başlatan ilk ülkelerden biridir (Mandal, 2021). TURCOVAC adını alan yerli aşı, inaktive edilmiş tam virüs SARS-CoV-2'ye dayanmaktadır. Aşının ön klinik ve ara dönem faz 1 (NCT04691947) ve faz 2 (NCT04824391) denemelerine göre, iki adet intramusküler enjeksiyon şeklinde, 28 gün ara ile uygulanması önerilmektedir (Pavel ve ark., 2021; Ozdarendeli ve ark., 2023). Aşı, Aralık 2021'den bu yana Türkiye'de acil kullanım izni ile uygulanmakta; Faz 3 klinik denemeleri ise halen devam etmektedir (https://www.aa.com.tr/, Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023).

2.2.2. mRNA Aşıları

Son yıllarda, özellikle mRNA'lar gibi nükleik asit terapötikleri, geleneksel aşı yaklaşımlarına alternatifler olarak önem kazanmıştır. mRNA sentezi, modifikasyonu ve transferindeki teknolojik ilerlemeler, mRNA'nın aşı geliştirme alanında umut verici bir terapötik yaklaşım olmasını sağlamıştır. Canlı-zayıflatılmış ve inaktif virüs aşılarına kıyasla, mRNA bazlı aşıların bir dizi avantajı bulunmaktadır. mRNA'lar bulaşıcı değildir ve genom entegrasyonu riski taşımazlar. Ayrıca, hücrelerde mRNA'nın yarı ömrü ve immünojenitesi, genetik modifikasyon yöntemleriyle kolaylıkla değiştirilebilir (Kariko ve ark., 2008). mRNA'ların *in vivo* etkin transferi için çeşitli taşıyıcı moleküller (kovalent konjugatlar, protamin kompleksleri, lipit veya polimer bazlı nanopartiküller ve hibrit formülasyonlar) kullanılabilir (Kauffman ve ark., 2016). Ayrıca, mRNA aşıları, vektöre karşı gelişen immün yanıt endişesi olmaksızın tekrar tekrar uygulanabilirler. mRNA aşılarının hızlı, ucuz ve ölçeklenebilir bir şekilde üretilebilmesi de diğer avantajları

arasındadır (Pardi ve ark., 2018). mRNA aşı geliştirme süreci; antijen seçimi, sekans optimizasyonu, modifiye nükleotid taraması, transfer sistemlerinin optimizasyonu, immün yanıt ve güvenlik testlerini içerir (Jahanafrooz ve ark., 2020).

BioNTech ve Pfizer, Comirnaty (BNT162b2 kod adı Tozinameran) olarak bilinen mRNA bazlı bir COVID-19 aşısı geliştirmiştir. Bu aşı, SARS-CoV-2'nin spike proteininin mutasyona uğramış bir formunu kodlayan ve lipit nanopartiküller içinde kapsüllenmiş modifiye nükleozit mRNA'dan oluşur. Pfizer-BioNTech COVID-19 aşısının klinik denemeleri Nisan 2020'de başlamış olup dünya çapında toplam 43.548 katılımcıda test edilmiştir. İki dozlu Pfizer-BioNTech COVID-19 aşısının 16 yaş ve üstü kişilerde %95 oranında koruma sağladığı rapor edilmiştir (Polack ve ark., 2020). Bu aşı, 11 Aralık 2020'de 16 yaş ve üstü kişilerde acil kullanım için onaylanan ilk COVID-19 aşısı olmuştur.

Moderna olarak bilinen mRNA-1273, Ulusal Alerji ve Bulaşıcı Hastalıklar Enstitüsü (NIAID), Moderna ve Biyomedikal Gelişmiş Araştırma ve Geliştirme Kurumu (BARDA) tarafından geliştirilen bir mRNA bazlı COVID-19 aşısıdır. Bu aşı, SARS-CoV-2'nin spike proteinini kodlayan ve modifiye nükleotid mRNA kompleksi içeren bir teknoloji kullanır (Jackson ve ark., 2020). Moderna'nın COVID-19 aşısının 30 Aralık 2020'de Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 99 merkezde 30.420 gönüllüde gerçekleştirilen Faz III klinik çalışmasında %94.1 etkinlik gösterdiği rapor edilmiştir (Baden ve ark., 2020). FDA, Moderna COVID-19 aşısına 18 Aralık 2020'de acil kullanım izni vermiştir.

2.2.3. DNA Aşıları

DNA aşıları, geleneksel canlı-zayıflatılmış virüs aşılarına kıyasla birçok fayda sağlar; örneğin, replikasyon olmaksızın hem hücresel hem de hümoral bağışıklığı indükler, tek seferde farklı antijenleri kodlayan bir vektörün oluşturulmasına izin verir, ayrıca büyük ölçekli ve düşük maliyetli üretimi mümkün kılar (Xu ve ark., 2014). Canlı virüs aşılarının etkinliğinin korunması için soğuk saklama gerekir, ancak DNA aşıları soğutmaya gerek kalmadan kararlı yapılarını korurlar. DNA bazlı aşılar, bir veya daha fazla antijeni kodlayan plazmidlerden oluşur. Bu aşılar, mRNA bazlı aşılara göre daha stabil olup daha yüksek transfeksiyon etkinliğine sahiptirler. Ancak vektör entegrasyonundan dolayı

insersiyonel mutagenez riski taşırlar (Liu M. A., 2019). Şu an için 13 klinik DNA aşısı çalışması mevcuttur ve bunlar intradermal, intramuscular ya da oral yolla uygulanabilmektedir (Khalid ve Poh, 2023).

2.2.4. Alt ünite Aşıları

İnaktif virüs aşıları gibi, alt birim aşıları da canlı virüs partikülleri içermez, bu nedenle güvenli kabul edilirler. Ancak, inaktif virüs aşılarından farklı olarak, koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturmak için sadece virüsün antijenik kısımlarını içerirler. Bu amaçla, hangi kombinasyonun etkili bir bağışıklık yanıtı sağlayacağını belirlemek için virüsün çeşitli alt birimlerinin antijenik özellikleri ayrıntılı olarak incelenmelidir. Alt birim aşıları, bir veya daha fazla antijene sahip oldukları için konakçı bağışıklık sistemini etkin bir şekilde uyarabilir. Ancak güçlü bir koruyucu bağışıklık yanıtı oluşturmak için adjuvan ilavesi gereklidir. Şu anda test edilen SARS-CoV-2 alt birim aşılarının çoğu, antijen olarak spike proteinini kullanır. Örneğin, Clover Biyofarmasötik şirketi, memeli hücrelerinde trimerik spike proteininin ifadesi için Trimer-Tag teknolojisini kullanarak SARS-CoV-2'ye karşı bir alt birim aşısı geliştirmiştir (Liang ve ark., 2021). Peptit tabanlı aşılar, sentetik olarak üretilmiş küçük antijen parçalarıdır. Büyük ölçekli üretimleri kolay olmasına rağmen, düşük immünojeniteye sahip olmaları nedeniyle yapısal değişiklikler, özel transfer sistemleri ve adjuvanlar gerektirebilir. Şu anda klinik deney aşamasında birçok peptit tabanlı SARS-CoV-2 aşı adayı bulunmaktadır (Chavda ve ark., 2024). Bunlardan bir tanesi, Novavax NVX-CoV2373 Covid-19 aşısı, Amerikan biyoteknoloji şirketi Novavax ve Salgın Hazırlık İnovasyonları Koalisyonu (CEPI) vakfı tarafından ortak geliştirilmiştir. Rekombinant alt birim aşısı, baculovirus-Sf 9 böcek hücresi ifade sisteminde üretilmiştir. Aşı, bir saponin tabanlı Matrix-M™ adjuvan ile stabilize edilmiş prefüzyon konformasyonunda tam uzunlukta S glikoprotein içerir (Guebre-Xabier ve ark., 2020; Tian ve ark., 2021). Faz 3 klinik denemeleri, Novavax'ın semptomatik COVID-19'a karşı %96,4 koruma sağladığını göstermiştir (Heath ve ark., 2021).

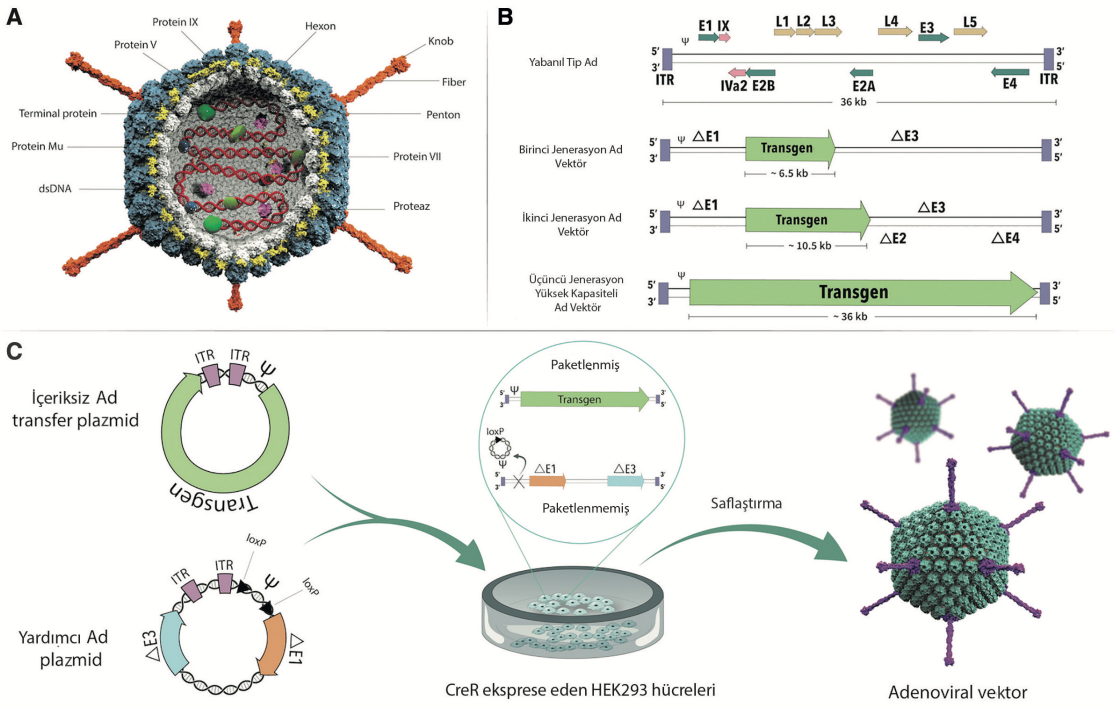
2.2.5. Viral Vektör Tabanlı Aşılar

Viral vektörler heterolog gen nakliyle immün yanıt oluşturan en etkin gen taşıyıcıdırlar. Gen transfer vektörleri olarak yapıları çok iyi bilindiğinden ve doğal olarak immünojenik

olduklarından, viral vektörler aşı geliştirme çalışmalarında tercih edilen vektörlerdir (Krause ve Worgall, 2011). Viral vektörler arasında en çok adenovirüs (Ad), adeno ilişkili virüs (AAV), pox virüsleri ve lentivirüsler kullanılmaktadır. Viral vektör tabanlı aşılar bir taraftan etkin bir hücresel immün yanıt oluştururken diğer taraftan bağışıklık hücrelerini enfekte ederek doğal adjuvan özellikleri sebebiyle hümoral immün yanıt gelişmesine sebebiyet verirler. Viral vektörlerin hedefleme için değiştirilebilmeleri, daha uzun süre antijenleri eksprese edip sunabilmeleri onları konvansiyonel aşılardan üstün kılan özellikleridir. İnsanlarda viral vektör aşılarının potansiyel uygulamaları enfeksiyöz hastalıklardan kansere kadar uzanan bir yelpaze içerir.

2.3. Adenovirüs Yapısı ve Vektör Tasarımı

Adenovirüsler zarfsız 90-100 nm çapında penton ve hekzon alt ünitelerinden oluşan ikozahedral kapsitli bir virüstür. Pentonla ilişkili fiber ve topuz (knop) bölgeleriyle konakçı hücreye bağlanırlar (Şekil 2.3-A) (Sharon ve Kamen, 2018). Topuz bölgesinin farklı hücre reseptörlerine karşı afinitesi serotipe bağlı olsa da adenovirüs hücreye bağlanmak için coxsackievirus adenovirüs reseptörü (CAR), CD46 ve integrinleri kullanır. Adenovirüsün genomu 26-35 kb uzunluğunda çift zincirli linear bir DNA'dan oluşur. Genom yapısı her biri diferansiyel işlenme ile oluşan çoklu proteinleri sentezleyen erken genler (E1, E2a, E2b, E3 ve E4), ara genler (IVA2, IX) ve geç genler (L1, L2, L3, L4 ve L5) olmak üzere 3 ana gruba bölünmüştür (Şekil 2.3-B). Genomun protein kodlamayan elementleri; DNA replikasyonunu başlatan sınırdaş ITR sekanslarını, olgun viryonların oluşması için gerekli E1 geninin önündeki ψ paketleme sekansını ve kodlama yapmayan virüsle ilişkili RNA'lar (VAI, VAII) içerir. Şu anda kullanılan adenovirüslerin çoğu E1 ve E3 genleri çıkartılmış replikasyon özürlü adenovirüslerdir. Bu sebeple bu virüsler yalnızca E1 transkompenzasyonu yapılan hücre hatlarında çoğaltılabilirler. E3 delesyonu adenoviral vektörlerin paketleme kapasitesini arttırır neticede E1 ve E3 delesyonu taşıyan adenovirüsler (birinci jenerasyon) 8 kb transgen taşıyabilirler (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Adenovirüs yapısı ve vektör tasarım stratejisi (Bisgin ve ark., 2021). A. Doğrusal bir dsDNA adenovirüs genomunu, hekson kapsidleri, penton bazları ve fiber proteinlerin topuz alanlarını gösteren moleküler yapısı. B. Adenoviral vektörlerin yabanıl tip genomunun birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyonları ile karşılaştırmalı analizi. Yabanıl tip Ad, ITR ile çevrili erken ve geç genlerin genomik konumları ve Ψ paketleme sinyali taşır. Birinci nesil adenoviral vektörler, E1 ve/veya E3 bölgelerinde delesyonlar taşırken; ikinci nesil vektörlerde E1 ve E3'e ek olarak ek genler, E2 ve E4 çıkartılmıştır. C. Gutless Ad üretim şeması olarak da adlandırılan üçüncü nesil vektörler. Aktarım vektörü transgenini, paketleme sinyalini ve ITR'leri taşır. Paketleme sinyali komşu loxP bölgelerine sahip birinci nesil adenoviral vektörünkine benzer bir yardımcı Ad plazmidi, Gutless adenoviral vektörü üretmek için kullanılır. Transfer vektörü ve yardımcı Ad kodlayan plazmi ile HEK293 hücrelerini eksprese eden Cre rekombinazın (CreR) geçici transfeksiyonu, yalnızca gutless Ad vektörlerinin paketlenmesiyle sonuçlanır. Ad, adenovirüs; ITR, ters terminal tekrarı.

2.3.1. Adenoviral Vektörler

Adenoviral vektörler (Ad), memeli hücrelerine gen transferinde sıkça kullanılan viral taşıma/nakil araçlarıdır (Tatsis ve Ertl, 2004). Bunlar, 7,5 kb'ye kadar yabancı DNA taşıma kapasitesine sahip çift sarmallı bir DNA (dsDNA) genomuna sahip zarfsız virüslerdir. Ancak, Ad shuttle vektörleri, 14 kb'ye kadar yabancı DNA'yı barındıracak şekilde modifiye edilmiştir (Dirice ve ark., 2009; Ehrke-Schulz ve ark., 2016). Birinci nesil Ad vektörleri, genomdan E1/E3 genlerinin çıkarılmasına rağmen güçlü bir immün yanıta neden olmuştur (Crystal, 2014). Birinci nesil Ad vektörlerinin güçlü immün yanıtı, aşı geliştirme çalışmaları için önemli bir avantaj sağlar. Ancak, replikasyon-defekt ikinci

ve üçüncü nesil Ad vektörlerinde immünojenite önemli ölçüde azaltılmıştır (Wen ve ark., 2000). Yüksek kapasiteli üçüncü nesil adenovirüs (HC-Adv) vektörleri, 37 kb'ye kadar yabancı DNA'yı barındırma kapasitesine sahiptir (Ricobaraza ve ark., 2020). Ayrıca, spesifik olarak tümor hücrelerinde replike olabilen replikasyon yetenekli onkotik adenovirüsler tümör hücrelerini öldürür (Wang F. ve ark., 2012). Paketleme hücre hatlarının geliştirilmesi, büyük ölçekli GMP sınıfı Ad vektör üretimini kolaylaştırmıştır (Wei ve ark., 2017). Ad vektörleri, konak hücre genomuna entegre olmamasına rağmen, en az bir yıl süren kalıcı ekrokromozomal transgen ifadesi sağlar (Ehrhardt ve ark., 2003). Ayrıca, non-human primatlarda yapılan bir takip çalışması, transgenin yan etkileri olmadan, 7 yıl boyunca ifade edildiğini göstermiştir (Brunetti-Pierri ve ark., 2013).

2.4. Adenoviral Vektör Tabanlı Aşılar

Adenovirüsler, doğal bağışıklıkta görevli bağışıklık hücrelerinin hücre içi sinyal yolaklarını aktive ederek bir seri proinflamatuvar sitokin salınımına sebebiyet verirler. Bu proinflamatuvar sitokinler, oldukça güçlü adaptif hümoral ve hücresel immün yanıt oluşturarak efektör bağışıklık hücrelerinin stimülasyonuna sebep olurlar. Virüs gibi hücre içi patojenleri yok etmek için CD8+ sitotoksik T lenfosit hücre (CTL) yanıtı çok önemlidir. Adenoviral vektörlerin taşıdığı transgen antijenleri T hücrelerine MHC sınıf 1 molekülleri tarafından sunularak oldukça dayanıklı ve güçlü bir CTL yanıtı oluşturur. CTL hücreleri virüs enfekte hücreleri ve hücre içi patojenleri kolayca tanıyarak onları öldürür. Adenovirüslerin bu özellikleri onların gelecekte ümit vadeden etkin bir aşı vektörü olarak kullanılması ihtimalini arttırır.

Farklı adenovirüs vektörleri farklı laboratuvar hayvan ve türlerinde değişken immün yanıt oluşturabilir. HAd5, HAd26 ve HAd35 ile aşılanan farelerde SIV Gag spesifik CD8(+) T hücre yanıtına bakıldığında; HAd5 vektörünün HAd26 ve HAd35'den daha immünojenik olduğu saptanmıştır (Tan ve ark., 2013). Fakat HAd26 ve HAd35 uzun yaşam süreli hafıza T hücreleri oluştururken, HAd5 ise farklılaşmasını tamamlamış fenotipe sahip T hücreleri oluşturduğu belirlenmiştir. İnsan orijinli adenoviral vektörlerin kross-reaktif hepatit C virüs (HCV)-spesifik hümoral ve hücresel immün yanıt oluşturdukları gözlemlenmiştir (Singh ve ark., 2016). Bu sebeple, adenoviral vektörlerin insanlarda yaygın kullanımının; HCV enfeksiyonunun immün patolojisini ve hastalık yaygınlığını etkileyen, HCV'ye

karşı gelişecek doğal bağışıklık için yararlı veya zararlı olabilecek düzeyde kross-reaktif bir bağışıklık yanıtı oluşturabileceği düşünülmektedir.

Ancak adenovirüslere karşı önceden var olan bağışıklık, adenovirüs tabanlı aşı ve gen nakil vektörlerinin immünojenitesini baskılar. Adenoviral vektörlere karşı önceden var olan bu immün yanıttan kaçınmak için, daha az yaygın farklı adenovirüs serotiplerinin kullanılması, immünizasyon için aşının vücuda farklı yollardan verilmesi ve heterolog asal destek (prime boost) gibi farklı stratejilerin kullanılması önerilmektedir. Bu stratejide aşının ilk dozu (priming) ve tekrarlayan dozları (boosting) ya aynı türün farklı serotipleri ya da tamamıyla farklı bir konakçı türünden gelen serotipler kullanılarak gerçekleştirilir. Örneğin ilk aşı DNA ile sonrakiler ise HAd5 ile ya da ilk doz ChAd68, sonrakilerse ChAd1 vektörleri kullanılarak aşılama yapılabilir (McCoy ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, önceden var olan adenovirüs bağışıklığının adenovirüs temelli aşıların nazal uygulamalarında sorun yaratmadığı tespit edilmiştir (Croyle ve ark., 2008). Bir patojene karşı antijen kodlayan adenoviral vektörlerin nazal uygulaması acısız ve kaygısız olmasının yanında mukozal patojenlere karşı hızlı ve etkin bir koruma sağlar. Adenoviral vektörler üzerlerinde transgen taşımadan da vücuda verildiğinde hava yollarında enfluenza (COVID-19) karşıtı bir yanıt oluşturur.

2.5. Mevcut COVID-19 Adenoviral Vektör Aşıları

Dünya Sağlık Örgütü tarafından onaylanan Janssen Jcovden (Johnson & Johnson) COVID-19 aşısı ve Astrazeneca Vaxzevria COVID-19 aşısı, adenoviral vektör tabanlı aşılar arasındadır. Bu aşılarla, enjeksiyon sonrasında adenovirüsler hücrelerde SARS-CoV-2 spike proteini üretir. Bu protein, hastalığa yol açmaz; işlevini yerine getirir ve daha sonra kaybolur. Bu süreç, vücudu virüse maruz bırakmadan, vücudun spike proteinine karşı güçlü bir bağışıklık tepkisi göstermesini sağlar.

Tablo 2.1. COVID-19'a karşı geliştirilen adenoviral vektör aşıları.

Aşılar	Antijen	Avantajları	Dezavantajları	İlişkili Ürün
Viral Vektör Aşıları	SARS-CoV-2 spike antijenlerini kodlayan genler içeren viral vektör	• Güvenli ve etkili • Çok bileşenli aşı geliştirme için uygun • Hücresel bağışıklık oluşturabilir	• Önceden mevcut olan adenovirüslere karşı bağışıklık, etkinliği tehlikeye atabilir	Ad26.COV2.S-Janssen (Johnson & Johnson)
				AZD1222-Oxford/AstraZeneca
				Covishield- Serum Institute of India
				Ad5-nCoV-CanSino
				Sputnik V, Sputnik Light- Gamaleya

2.5.1. Ad26.COV2.S Aşısı (Janssen/Johnson & Johnson)

Ad26.COV2.S aşısı, COVID-19'a karşı geliştirilen bir aşıdır ve insan adenovirüsü tip 26 (Ad26) vektörünü kullanarak, furin kesim bölgesinde bir mutasyon ve iki prolin stabilizasyonu mutasyonu içeren bir prefüzyon-stabilize SARS-CoV-2 S glikoproteini kodlar (Mercado ve ark., 2020). Johnson & Johnson'ın geliştirdiği Ad26.COV2.S aşısı için yapılan faz III çalışması, Arjantin, Brezilya, Şili, Kolombiya, Meksika, Peru, Güney Afrika ve Amerika Birleşik Devletleri'nden 44.000'den fazla katılımcıyı içermiştir. Araştırılan tüm bölgelerde, tek bir doz Ad26.COV2.S enjeksiyonunun 28 gün sonraki etkinliği %85 olarak belirlenmiş olup hastaneye yatma ve ölüm riskine karşı %100 koruma sağlamış olduğu tespit edilmiştir (Sadoff ve ark., 2021). Ad26.COV2.S, ABD'de 27 Şubat 2021'de ve Avrupa'da 11 Mart 2021'de acil kullanım onayı almıştır. Bu aşı, tek doz uygulama şeklinde birçok ülkede kullanıma sunuldu. COVID-19'a karşı korumayı artırmak için Ad26.COV2.S aşısının artırıcı dozlarının etkisini değerlendirmek üzere ENSEMBLE2 çalışması yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, Ad26.COV2.S'nin birincil dozunun ardından 56 gün sonra bir artırıcı dozla birlikte uygulanmasının etkinliği, güvenliği ve bağışıklık tepkisinin kabul edilebilir olduğunu göstermektedir (Hardt ve ark., 2022).

2.5.2. ChAdOx1 nCoV-19 (AstraZeneca)

Oxford-AstraZeneca AZD1222 COVID-19 aşısı, İngiltere'deki Oxford Üniversitesi ile İsveç merkezli ilaç şirketi AstraZeneca'nın işbirliğiyle geliştirilmiştir (Folegatti ve ark.,

2020). Bu aşı, bir adenovirüs vektörü olan ChAdOx1 (şempanze adenovirüsü) kullanılarak SARS-CoV-2 virüsünün tam uzunlukta spike proteinini ve bir adjuvan dizisi olan doku plazminojen aktivatörünü içerir (Van Doremalen ve ark., 2020; Watanabe ve ark., 2021). Bu aşı, pek çok ülkede acil kullanım izni almış ve yaygın olarak dağıtılmıştır. Örneğin, Birleşik Krallık'ta Aralık 2020'de acil kullanım onayı alarak dağıtılmaya başlanmıştır. İngiltere, Brezilya ve Güney Afrika'da yapılan analizler, 12 hafta arayla iki doz AZD1222 aşısını alan katılımcılarda semptomatik COVID-19'u %81,3 oranında önlediğini göstermiştir (Voysey ve ark., 2020; Voysey ve ark., 2021). ChAdOx1 nCoV-19 aşısının yaygın yan etkileri arasında enjeksiyon bölgesinde reaksiyon (hassasiyet, ağrı, sıcaklık, kaşıntı veya morarma), titreme veya ateş, baş ağrısı, bulantı, yorgunluk, halsizlik hissi ve eklem veya kas ağrısı bulunur; tümü birkaç gün içinde çözümlenir (Hernández ve ark., 2021). Ancak, ChAdOx1 nCov-19 aşısı uygulamasından kısa bir süre sonra tromboz ve trombositopeni sendromu (TTS) vakaları ve bazı durumlarda ölümler görülmesi nedeniyle 18 Avrupa ve Asya ülkesinde aşının kullanımı askıya alınmıştır (Greinacher ve ark., 2021). İki hafta sonra, İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Ajansı, 18,1 milyon doz AZD1222 aşısında 30 (7'si ölümlü) kan pıhtısı vakası rapor etmiştir (Andreas Greinacher, 07 April 2021). Tüm bu vakalarda, heparine maruziyet olmamasına rağmen, trombosit faktör 4'e (PF4) karşı yüksek düzeyde oto-antikorlar tespit edilmiştir. AstraZeneca aşısının kullanımı, güvenlik endişeleri nedeniyle bazı ülkelerde sınırlandırılmış veya durdurulmuştur. Ancak, uluslararası sağlık otoriteleri aşının genel olarak güvenli ve etkili olduğunu belirtmiş ve aşının faydalarının risklerinden daha fazla olduğunu vurgulamıştır. Güncel bilgilere göre, aşının kullanım kararları ülke bazında farklılık göstermektedir ve bazı ülkeler aşının kullanımını belirli yaş grupları ile sınırlamaya devam etmektedir. Türkiye ise, AstraZeneca aşısını kullanmayı durdurmuştur ve alternatif aşı seçeneklerine yönelmiş ülkelerdendir.

2.5.3. CanSinoBio

CanSino (Ad5-nCoV) aşısı, CanSinoBIO tarafından Tianjin, Çin'de geliştirilen rekombinant bir viral vektör aşısıdır. İnsan adenovirüs tip 5 tabanlı SARS-CoV-2'nin spike proteininin tamamını içerir. 19 Mayıs 2022'de DSÖ tarafından acil kullanım onayı almıştır. Mililitresinde 5×10^{10} virüs parçacığı içeren tek bir doz olarak intramusküler

uygulandığında kabul edilebilir bir güvenlik profiline sahiptir (Zhu F. C. ve ark., 2020). CanSino aşısı, diğer viral vektör aşılarıyla benzer bir koruma sağlayabilir, ancak mRNA aşıları kadar güçlü bir bağışıklık tepkisi uyandırmayabilir (Guzmán-Martínez ve ark., 2021). Faz III klinik denemelerinde CanSino aşısının 28 gün sonrasındaki etkinliği %58 olarak bulunmuştur (Halperin ve ark., 2022). 4 Eylül 2022'de aerosolize inhalasyon yoluyla booster doz olarak Çin'de kullanım onayı almıştır (Wang S. Y. ve ark., 2023).

2.5.4. Gamaleya Sputnik V Aşısı

Sputnik V Rusya'daki Gamaleya Epidemiyoloji ve Mikrobiyoloji Araştırma Enstitüsü tarafından üretilmiştir. İki adenoviral vektör (Ad26 ve Ad5) içeren bir adenovirüs tabanlı aşıdır ve tam uzunlukta S proteinini kodlayan geni taşır (Balakrishnan, 2020). Diğer bir deyişle, Sputnik V, farklı adenoviral vektörlerin kombinasyonunu içeren bir aşıdır. Bu özellik, aşının bağışıklık sisteminde daha güçlü ve uzun süreli bir yanıt oluşturabileceği anlamına gelir. Faz III çalışmaları, Sputnik V'nin semptomatik COVID-19'a karşı %91,6 etkinlik sağladığını göstermiştir (Logunov ve ark., 2020). Haziran 2021'in sonunda, Sputnik V geliştiricileri aşının Delta varyantına karşı yaklaşık %90 etkili olduğunu duyurmuştur (Logunov ve ark., 2021).

2.6. Projenin Amacı

COVID-19 salgını öncesinde, MERS ve SARS gibi insan koronavirüs enfeksiyonlarına karşı aşı geliştirme çalışmaları yapıldıysa da son pandemiye kadar lisanslı bir antiviral ilaç veya aşı bulunmuyordu. İnaktif virüslerin kullanıldığı ilk jenerasyon aşılar genellikle nötralize antikor yanıtı oluşturmak için başvurulan bir yöntem olsa da tamamen inaktive edilmemiş virüslerin kullanımı enfeksiyon riski taşıyabilir. Bu nedenle, daha güvenli ve etkili olan nötralize epitopları içeren aşıların kullanılması tercih edilir. Viral vektörler, istenen viral proteini yüksek konsantrasyonlarda üretebilirler, bu da yeni nesil aşı geliştirmenin temelini oluşturur. Replike olmayan Ad vektörler, yüksek verimli, cGMP üretime uyumlu, kullanımı güvenli, klinik denemelerde yüksek etkili ve kolay yönetilebilir nakliye ve depolama prosedürleri sayesinde enfeksiyöz hastalıklar için umut verici aşı taşıyıcılarıdır.

SARS-CoV-2'de, Spike proteininin virüs enfeksiyonuna karşı koruyucu bağışıklık ve nötralize antikorlar oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, aşı ve antiviral ilaç geliştirme çalışmalarında Spike proteini hedef olarak seçilmiştir. Adenovirüs tabanlı aşılar, özellikle Spike proteinini kodlayan genlerle birlikte, COVID-19'a karşı etkili bir bağışıklık yanıtı oluşturabilir. Bu aşılar, antijen sunumu ve immün yanıtı artırmada etkili araçlar olarak öne çıkar. Bu çalışmada COVID-19'a karşı etkin bir bağışıklık yanıtı oluşturmak için geliştirilen Ad5Spike aşısı SARS-CoV-2'nin Spike proteinine karşı antikorlar üretebilir. Ayrıca, tek dozda uygulanabilmesi, aşının yaygın erişilebilirliğini sağlar ve aşılanmış popülasyonun korunmasını kolaylaştırır. Aşının uzun süreli koruma sağlama potansiyeli, hastalığın yayılmasını kontrol altına almak için kritik öneme sahiptir. Ayrıca, Ad5Spike aşısı, gerektiğinde yeni varyantlara hızlıca uyum sağlayabilecek şekilde üzerindeki Spike proteinini kodlayan geni değiştirme imkânı sunar. Bu da virüsün olası mutasyonlarına karşı etkinliğini korumasını sağlar.

COVID-19'un mevsimsel bir virüse dönüşmesi beklenmektedir ve bu da sürekli virüs takibi ve aşı geliştirme gerektiren bir süreçtir. Ayrıca SARS-CoV-2 karşılaşacağımız son koronavirüs olmayabilir; bu yüzden benzer salgınlara karşı hazırlıklı olunması önemlidir.

Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında bu tez çalışmasının içeriğini şu şekilde özetleyebiliriz:

1- Potansiyel SARS-CoV-2 aşısı geliştirebilmek için, SARS-CoV-2'ye özgün Spike proteinini kodlayan geni taşıyan doğal adjuvan etkili 1. jenerasyon insan adenoviral aşı vektörleri (Ad5Spike) oluşturulması,

2- Oluşturulan bu aday aşının, dişi BALB/c farelere farklı dozlarda intraperitoneal olarak enjekte edilerek 30 ve 90. günlerde bu aşıya karşı gelişen hücresel ve hümoral bağışıklık yanıtının etkinliğinin değerlendirilmesi.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Adenoviral Transfer Vektörlerinin Oluşturulması

SARS-CoV-2 Spike geni kodlayan sekans 3822 baz çifti uzunluğunda olup, spektinomisin dirençlilik geni içeren pDONR223 giriş vektörüne klonlanmış şekilde (Addgene, plasmid 149329), *E. coli* bakterisi içerisinde agara gömülü olarak temin edildi. Öncelikle giriş vektörlerinin izolasyonu amacıyla bakteriler, spektinomisin içeren (50 µg/ml) LB Agar petrilere çizgi ekim yöntemiyle yayıldı ve petriler 37°C'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün oluşan kolonilerden, 3 ml spektinomisinli LB Broth (L3022, Sigma) besiyeri içeren tüplerde mini bakteri kültürü kuruldu ve 12-16 saat 37°C'de 225 rpm hızla çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda, 300 µl bakteri kültürü ve 300 µl %50 gliserol içerecek şekilde stok hazırlandı ve stoklar -80°C'de saklandı. Kalan kültürden Qiagen Plasmid Mini Kit (Cat No.ID: 12125) kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

İzole edilen giriş vektörü üzerindeki Spike kodlayan gen bölgesinin, pAd/CMV/V5-DEST™ destinasyon vektörüne klonlanmasında Gateway teknolojisinden yararlanıldı (K493000, Thermo Fisher). Giriş vektörü (200 ng veya 400 ng) ile destinasyon vektörü arasında, Gateway LR Klonaz II Enzim Mix kullanılarak iki farklı LxR rekombinasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon ürünü daha sonra, kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş OneShot Stbl3 Chemically Competent *E. coli* bakterilerine transforme edildi ve transformantlar bir saat antibiyotiksiz besiyerinde çalkalandı. Ardından reaksiyon karışımı, doğru transformantların seçilimi amacıyla, oluşturulmaya çalışılan ekspresyon vektörünün iskeletinde bulunan amfisilin dirençlilik geninden faydalanılarak, amfisilin içeren (100 µg/ml) LB agar petrilere yayıldı. Seçilen transformantlardan kurulan mini kültürlerden mini prep plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Doğru plazmidi 4 noktadan kesen EcoRI (Fast Digest FD0274, Thermo Fisher) enzimi ile yapılan restriksiyon kesimi ile doğru boyutta kesilmiş fragment taşıyan koloniler tanımladı.

3.2. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Transfer Plazmidinin Ekspresyon Analizi

Gateway LR klonlama ile elde edilen transfer plazmidinden protein ekspresyonunu göstermek amacıyla 293T (CRL-3216) hücrelerine pAd5Spike plazmidi transfekte edildi. 293T hücreleri bilinen yüksek transfeksiyon kapasitesi sebebiyle tercih edildi. Transfeksiyon ajanı olarak polyethylenimine (PEI, branched, (Sigma, Kat. No: 408727)) kullanıldı. Bu deney için, 24 kuyucuklu hücre kültür petrilerine, her bir kuyuda $5x10^4$ hücre olacak şekilde 293T hücresi ekildi ve hücreler gece boyu %5 CO_2 ve 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün hücre yoğunluğu %70'e ulaşan kuyularda transfeksiyon gerçekleştirildi. PEI solüsyonu 1 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde distile suyla hazırlandı ve 0.22 µm'lik filtreden geçirildi. Transfeksiyon için plazmid:PEI oranı 1:3 olarak kullanıldı. Bunun için mikrosantrifüj tüplerinin içerisinde, 1 µg plazmid ve 3 µg PEI eklenip hafifçe karışması sağlandıktan sonra karışım 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüpün içerisindeki transfeksiyon karışımı kuyulara eklendi ve hücreler 37°C'de %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edildi. 24 saatin sonunda transfeksiyon ajanının olası toksik etkilerini önlemek üzere kuyulardaki besiyeri tazelendi ve inkübasyona devam edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra hücrelere Spike proteinine karşı immünositokimya (IHC) (ab236469 abcam) boyama yapıldı. Bu amaçla, besiyeri aspire edildikten sonra hücreler 1X PBS ile yıkanarak 1 ml %4'lük PFA ile 20 dk boyunca fikse edildi. Fiksatif solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla hücreler 3 kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra kuyular permeabilizasyon solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından hücreler 3 kere 1X PBS-T (%0,1 PBS-Tween20) ile yıkandı ve bloklama solüsyonu (%1 BSA) ile 1 saat muamele edildi. Sonrasında kuyular 1X PBS-T ile yıkandı ve anti-Spike antikoru (Abcam, Cat. No: ab272504) ile bir gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyular 1X PBS ile yıkandı ve HRP konjuge anti-rabbit sekonder antikor ile oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler 1X PBS ile yıkandıktan sonra DAB subtrat ve DAB kromojen karışımı ile muamele edildi. Sonrasında 1X PBS ile yıkanan hücrelerin üzerine yeniden 1X PBS eklendi ve hücreler Olympus IX-81 mikroskobunda 20X objektif büyütmeleri kullanılarak görüntülendi.

3.3. SARS-CoV-2 Spike Glikoproteini Kodlayan Adenoviral Vektörlerin Üretimi

3.3.1. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Oluşturulması

Gateway klonlama teknolojisi ile elde edilen SARS-CoV-2 Spike kodlayan ekspresyon plazmidinden (pAd5Spike) Spike protein ekspresyonunun doğrulanmasının ardından bu plazmidlerle adenoviral vektörlerin üretimi için öncelikli olarak 293A hücreleri kültüre edildi. Transfeksiyon işlemi öncesinde uygun viral replikasyon ve paketlemenin gerçekleşebilmesi için oluşturulan ekspresyon plazmidinin PacI (NEB R0547S) restriksiyon enzimiyle kesilip viral ITR'lerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu işlem için ilk olarak 5 µg pAd5Spike ekspresyon plazmidi 5 µl enzim ile 37°C'de 15 dakikalık reaksiyona tabii tutuldu. Plazmidin PacI enzimiyle kesilmesi, viral ITR'lerin açığa çıkarılması ve bakteri dizilerinin (pUC orijini ve amfisilin direnç geni) vektörden uzaklaştırılması ile sonuçlandı. Reaksiyon sonrasında elde edilen yeni ekspresyon plazmidi fenol/kloroform ekstraksiyonu ve ardından etanol ile saflaştırılıp transfeksiyona hazır hale getirildi.

Transfeksiyon işlemi için bir gün öncesinden 293A hücreleri kuyu başına $5x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür petrilerine ekildi ve 37°C inkübe edildi. 1 µg Pac I ile kesilmiş pAd5Spike plazmidi 3 µl Lipofectamine® 2000 transfeksiyon ajanı ile 1 ml OPTIMEM besiyeri içerisinde 20 dakika inkübe edildikten sonra plazmid/Lipofectamine® 2000 karışımı her bir kuyuya damla damla eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO_2 ortamında gece boyunca inkübe edildikten sonra besiyerleri DMEM ile değiştirildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle kaldırılarak 10 cm'lik hücre kültürü petrilerine aktarıldı. Bu hücreler yaklaşık %80 sitopatik etki (CPE) gözlemlenene kadar 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yaklaşık 12 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle toplanarak steril 15 ml'lik deney tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet 10 mM Tris-Cl solüsyonu ile çözdürülerek dondur – çözdür aşamasına geçildi. Bu aşamada elde edilen virüs karışımı öncelikli olarak 5 dk kuru buz-etanol banyosunda dondurulduktan sonra 5 dk 37°C'lik su banyosunda eritildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada eritilen karışım 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücre

atıkları uzaklaştırıldı ve elde edilen süpernatant ana viral stok (Crude Viral Lysate) olarak -80°C'de saklandı.

3.3.2. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Hazırlanan viral stoktan adenoviral vektörlerin çoğaltılması için 293A hücreleri 40 adet 15 cm'lik hücre kültürü petrilerinde büyütüldü. Kültüre edilen hücreler ilk aşamada oluşturulan viral stok ile öncelikli olarak 10 ml FBS içermeyen DMEM ile transdükte edilip 3 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 10 ml %20 FBS (A0500-3210, FBS) içeren DMEM eklenerek son FBS yüzdesi %10 olarak ayarlandı ve hücreler 36 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle steril deney tüplerine toplanarak 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet 20 ml 10mM Tris-Cl (Cat. No. 0497, amresco) ile çözdürülerek 15 ml'lik deney tüplerine aktarıldı. Tüpler 3 kez kuru buz – etil alkol banyosunda dondur – çözdür işleminden geçirildikten sonra 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant 10mM Tris-Cl ile 120 ml'ye tamamlandı. Bu sırada 40 ml'lik şeffaf ultrasantrifüj tüplerinde öncelikli olarak 10 ml ağır CsCl ve ardından da 10 ml hafif CsCl solüsyonlarıyla gradientli tampon oluşturuldu. Ardından her tüpe eşit miktarda viral süpernatant eklenerek tüpler 20000 rpm'de gece boyu ultrasantrifüj ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası santrüfüj tüplerinde öncelikli olarak üretici hücrelerden gelen protein atıkları steril cam pipetlerle çekildikten sonra oluşan viral bantlar steril enjektör yardımıyla toplandı ve 10 mM Tris-Cl ile son hacim 24 ml'ye tamamlandı. Şeffaf ultrasantrifüj tüplerinde öncelikli olarak 4 ml ağır CsCl ve ardından da 4 ml hafif CsCl solüsyonlarıyla gradientli tampon oluşturulup üzerlerine viral solüsyon eklendi. Hazırlanan viral solüsyon bir kez daha 20000 rpm'de 6 saat santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan viral bantlar enjektör yardımıyla toplandı ve spektrofotometre ile OD_{260} ölçümü yapılarak viral titre belirlendi. Titresi belirlenen viral vektörler hacminin %12,5'i gliserol olacak şekilde stoklara ayrılarak -80°C'de saklandı.

3.4. Adenoviral Aşı Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

Üretilen Ad5Spike viral aşı vektörlerinden Spike proteininin ekspresyonunun doğrulanması amacıyla HT1080 hücreleri (ATCC- CCL-121) kuyu başına $5x10^4$ hücre

olacak şekilde 24 kuyulu hücre kültürü petrilerine ekilip 37°C'de %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından HT1080 hücreleri hücre başına 10^2, 10^3, 10^4 ve 10^5 virüs partikülü olacak şekilde transdükte edildi. Transdüksiyon için hücreler öncelikli olarak gerekli miktarda viral stok içeren 250 µl FBS içermeyen DMEM ile 3 saat inkübe edildi. 3 saat sonra hücrelerin üzerine 250 µl %20 FBS içeren DMEM eklenmesi ile son FBS miktarı %10 olacak şekilde ayarlandı. Transdüksiyondan 72 saat sonra hücrelerde Spike proteinine karşı immünofloresan boyama yapıldı. Bunun için, besiyeri aspire edildikten sonra hücreler 1X PBS ile yıkanarak 1 ml %4'lük PFA ile 20 dk boyunca fikse edildi. Fiksatif solüsyonunun uzaklaştırılması amacıyla hücreler 3 kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra kuyular permeabilizasyon solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından hücreler 3 kere 1X PBS-T (%0,1 PBS-Tween20) ile yıkandı ve bloklama solüsyonu (%1 BSA) ile 30 dakika muamele edildi. Sonrasında kuyular 1X PBS ile yıkandı ve anti-Spike antikoru (Abcam, Kat. No: ab272504) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyular 3 kere 1X PBS ile yıkandı ve sekonder antikor (Goat anti-Rabbit Alexa Flour 488, ab150077) ile oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından hücreler 3 kere 1X PBS ile yıkandıktan sonra DAPI ile çekirdek boyaması yapıldı. Hücrelerin üzerine 1X PBS eklenerek Olympus IX-81 floresan mikroskobunda 20X objektif büyütmeleri kullanılarak görüntüleri alındı.

3.5. Yeşil Floresan Protein Kodlayan Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Üretilmesi

3.5.1. Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Oluşturulması

Yeşil floresan proteini (GFP: Green Fluorescent Protein) kodlayan sekansı bulunduran giriş vektörlerinden Adenoviral ekspresyon vektörlerini oluşturulması amacıyla Adenoviral Vektör oluşturma kiti kullanılmıştır. Kit protokolüne bağlı kalınarak Gateway LR Klonaz II Enzim karışımı varlığında giriş vektörlerin ile destinasyon vektörlerin arasında LR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonucunda üzerinde adenoviral genler barındıran GFP kodlayan geni taşıyan adenoviral ekspresyon vektörü elde edilmiş oldu.

Ekspresyon vektörünün oluşumunu takiben, yeşil floresan proteini kodlayan giriş plazmidinden (pAdGFP) adenoviral vektörlerin üretimi için öncelikli olarak 293A

hücreleri kültüre edildi. Transfeksiyon işlemi öncesinde uygun viral replikasyon ve paketlemenin gerçekleşebilmesi için oluşturulan ekspresyon plazmidinin PacI restriksiyon enzimiyle kesilip viral ITR'lerin açığa çıkarılması gerekmektedir. Bu işlem için ilk olarak 5 µg pAdGFP ekspresyon plazmidi 5 µl PacI enzimi ile 37°C'de 15 dakikalık reaksiyona tabii tutuldu. Plazmidin PacI enzimiyle kesilmesi, viral ITR'lerin açığa çıkarılması ve bakteri dizilerinin (pUC orijini ve amfisilin direnç geni) vektörden uzaklaştırılması ile sonuçlanır. Reaksiyon sonrasında elde edilen yeni ekspresyon plazmidi fenol/kloroform ekstraksiyonu ve ardından etanol ile saflaştırılıp transfeksiyona hazır hale getirildi.

Transfeksiyon işlemi için bir gün öncesinden 293A hücreleri kuyu başına $5x10^5$ hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür petrilerine ekildi ve 37°C inkübe edildi. 1 µg PacI ile kesilmiş pAdGFP plazmidi 3 µl Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher, Cat. No. 11668027) transfeksiyon ajanı ile 1 ml OPTIMEM besiyeri (Gibco, 2195499) içerisinde 20 dakika inkübe edildikten sonra plazmid/Lipofectamine® 2000 karışımı her bir kuyuya damla damla eklendi. Hücreler 37°C'de %5 CO_2 ortamında gece boyunca inkübe edildikten sonra besiyerleri DMEM ile değiştirildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle kaldırılarak 10 cm'lik hücre kültürü petrilerine aktarıldı. Bu hücreler yaklaşık %80 sitopatik etki (CPE) gözlemlenene kadar 2-3 günde bir besiyeri değiştirilerek yaklaşık 12 gün boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle toplanarak steril 15 ml'lik deney tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet 10mM Tris-Cl solüsyonu ile çözdürülerek dondur-çözdür aşamasına geçildi. Bu aşamada elde edilen virüs karışımı öncelikli olarak 5 dk kuru buz-etanol banyosunda dondurulduktan sonra 5 dk 37°C'lik su banyosunda eritildi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son aşamada eritilen karışım 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücre atıkları uzaklaştırıldı ve elde edilen süpernatant ana viral stok (Crude Viral Lysate) olarak -80°C'de saklandı.

3.5.2. Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Çoğaltılması ve Saflaştırılması

Hazırlanan viral stoktan adenoviral vektörlerin çoğaltılması için 293A hücreleri 40 adet 15 cm'lik hücre kültürü petrilerinde büyütüldü. Kültüre edilen hücreler ilk aşamada oluşturulan viral stok ile öncelikli olarak 10 ml FBS içermeyen DMEM ile transdükte edilip 3 saat 37°C'de %5 CO_2 ortamında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerin

üzerine 10 ml %20 FBS içeren DMEM eklenerek son FBS yüzdesi %10 olarak ayarlandı ve hücreler 36 saatlik inkübasyona bırakıldı. 36 saat sonra hücreler 10 ml'lik serolojik pipetle steril deney tüplerine toplanarak 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan pelet 20 ml 10mM Tris-Cl ile çözdürülerek 15 ml'lik deney tüplerine aktarıldı. Tüpler 3 kez kuru buz-etil alkol banyosunda dondur-çözdür işleminden geçirildikten sonra 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant 10mM Tris-Cl ile 120 ml'ye tamamlandı. Bu sırada 40 ml'lik şeffaf ultrasantrifüj tüplerinde öncelikli olarak 10 ml ağır CsCl ve ardından da 10 ml hafif CsCl solüsyonlarıyla gradientli tampon oluşturuldu. Ardından her tüpe eşit miktarda viral süpernatant eklenerek tüpler 20000 rpm'de gece boyu ultrasantrifüj ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası santrifüj tüplerinde öncelikli olarak üretici hücrelerden gelen protein atıkları steril cam pipetlerle çekildikten sonra oluşan viral bantlar steril enjektör yardımıyla toplandı ve 10 mM Tris-Cl ile son hacim 24 ml'ye tamamlandı. Şeffaf ultrasantrifüj tüplerinde öncelikli olarak 4 ml ağır CsCl ve ardından da 4 ml hafif CsCl solüsyonlarıyla gradientli tampon oluşturulup viral solüsyon eklendi. Hazırlanan viral solüsyon bir kez daha 20000 rpm'de 6 saat santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında oluşan viral bantlar enjektör yardımıyla toplandı ve spektrofotometre ile OD_{260} ölçümü yapılarak viral titre belirlendi. Titresi belirlenen viral vektörler hacminin %12,5'i gliserol olacak şekilde stoklara ayrılarak -80°C'de saklandı.

3.6. Adenoviral Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

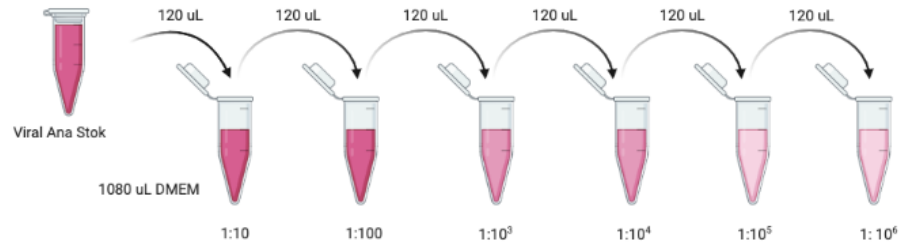
Saflaştırılan AdGFP viral kontrol vektörlerinden GFP ekspresyonunun doğrulanması amacıyla HT1080 hücreleri kuyu başına $5x10^4$ hücre olacak şekilde 24 kuyulu hücre kültürü petrilerine ekilip 37°C'de %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından HT1080 hücreleri, hücre başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 ve 10^5 virüs partikülü olacak şekilde AdGFP ile transdükte edildi. Transdüksiyon için hücreler öncelikli olarak gerekli miktarda viral stok içeren 250 µl FBS içermeyen DMEM ile 3 saat inkübe edildi. 3 saat ardından hücreler üzerine 250 µl %20 FBS içeren DMEM eklenmesi ile son FBS miktarı %10 olarak ayarlandı. Transdüksiyondan 72 saat sonra hücrelerdeki GFP ışımaları Olympus IX-81 floresan mikroskobunda 10X objektif büyütmeleri kullanılarak görüntülendi.

3.7. Üretilen Adenoviral Vektörlerin Hedef Hücreleri Transdüksiyon Etkinliğinin Gösterilmesi

RAW 264.7 (TIB-71) makrofaj hücreleri ve Thp-1 (TIB-202) monosit hücreleri 24 kuyulu hücre kültür petrilerine kuyu başına $50x10^4$ olacak şekilde ekildi. Ertesi gün %70-80 yoğunluğundaki RAW 264.7 hücreleri kuyu başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 ve 10^6 viral partikül olacak şekilde ve Thp-1 hücreleri kuyu başına 10^3, 10^4 viral partikül olacak şekilde AdGFP kontrol vektörleriyle transdükte edildi. Hücreler transdüksiyondan 72 saat sonra Olympus IX-81 floresan mikroskobunda görüntülendi.

3.8. Adenoviral Vektörlerin Plak Testi ile Saflaştırılması

Her hücreye verilen adenoviral partikül sayısının bilinebilmesi ve tekrarlanabilir ekspresyon sonuçları alınabilmesi amacıyla hem Ad5Spike hem de AdGFP vektörleri için ayrı ayrı plak testi gerçekleştirildi. Bu amaçla 293A hücreleri deney gününden bir gün önce kuyu başına 10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve bir gece 37°C'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi. Deney günü virüs stokları 10-kat seri dilüsyona tabii tutuldu (Şekil 3.1). Her bir dilüsyon kuyulara 1 ml olacak şekilde eklendi ve bir gece 37°C'de %5 CO_2 koşullarında inkübe edildi.

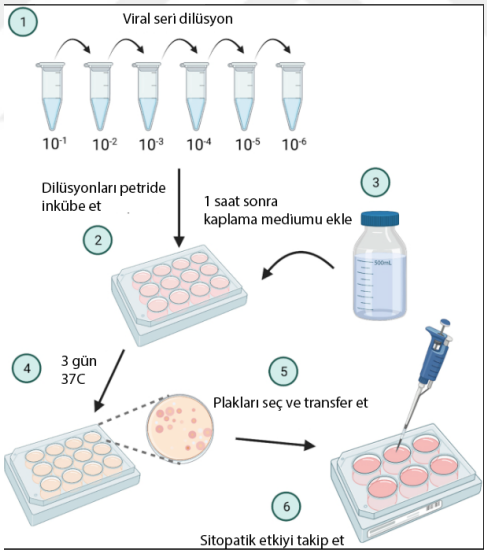


Şekil 3.1. Plak testi için viral stoktan seri dilüsyon hazırlanması şeması. Viral stoğun Tris-Cl içerisinde 10-kat tekrarlı dilüsyonuyla oluşturulur. İllüstrasyon, BioRender kullanılarak oluşturulmuştur.

Transdüksiyonun ertesi günü kuyulardaki besiyeri çekildi ve kuyulara %4 agaroz içeren besiyeri (1,2:12) eklendi. Burada amaç, oluşacak plakların hareket alanını kısıtlamak ve seçilimi kolaylaştırmaktır. Ardından petriler 8-10 gün kadar daha takip edildi ve plak oluşumu mikroskop altında belirli aralıklarla takip edildi. Takip süresi sonunda oluşan plaklardan 4 tane seçildi. Bir gün önce 10^6 hücre olacak şekilde ekilen 293A hücreleri

seçilen plaklar ile transdükte edildi ve hücreler takip edildi. Hücrelerin neredeyse %90'ının virüsle transdükte olduğunun tespit edilmesinin ardından hücreler kuyulardan toplanarak, önceden 10 mm hücre kültür petrilerinde büyütülmüş %70-80 yoğunluktaki 293A hücrelerine eklendi. 2-3 günlük takip süresinin ardından aynı işlem 150 mm'lik kültür kaplarındaki 293A hücreleri için tekrar edildi. Son olarak 4 adet 293A hücrelerinin büyütüldüğü 150 mm'lik petrileri, hali hazırda transdükte edilen 150 mm'lik 293A hücreleri ile transfekte edildi. İşlem sonunda toplanan tüm süpernatant 50 ml'lik deney tüplerine aktarıldı. 3000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra dibe çöken hücreler 10 mM Tris-Cl ile çözdürüldü.

Etil alkol-kuru buz/37°C su banyosu kullanılarak 3 kere dondur-çözdür işlemi yapılan hücreler daha yüksek hacimlerde virüs üretiminde kullanılmak üzere santrifüj edilerek -80°C'de saklandı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Plak testi deney akış şeması (Escalera ve ark., 2022). 1. Virüsler 10 kat seri dilüsyona tabi tutulur. 2. 293A hücreleri adenoviral vektörlerle transdükte edilir. 3. 293A hücrelerinin üzeri %4 agarozlu besiyeri ile kaplanır. 4. Plak oluşumu için hücrelerin takibi yapılır. 5. Oluşan plaklar pipet yardımıyla seçilir. 6. 293A hücreleri bu plaklarla muamele edilerek virüs üretilir.

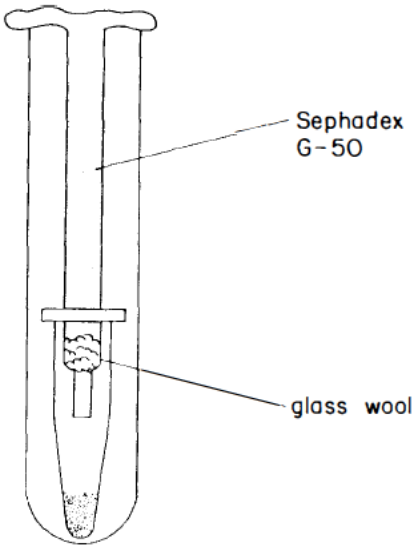
3.9. Plak Testi Sonrası Adenoviral Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Plak testi ile saflaştırılan AdGFP viral kontrol vektörlerinden yeşil floresan proteininin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi amacıyla HT1080 hücreleri kuyu başına $5x10^4$ hücre

olacak şekilde 24 kuyulu hücre kültürü petrilerine ekilip 37°C'de %5 CO_2 koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından HT1080 hücreleri kuyu başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4,10^5 ve 10^6 virüs partikülü olacak şekilde AdGFP ile transdükte edildi. Transdüksiyon için hücreler öncelikli olarak gerekli miktarda viral stok içeren 250 µl FBS içermeyen DMEM ile 3 saat inkübe edildi. 3 saatin ardından hücrelerin üzerine 250 µl %20 FBS içeren DMEM eklenmesi ile besiyerindeki son FBS konsantrasyonu %10 olarak ayarlandı. Ertesi gün virüslerin toksik etki yaratmasını önlemek amacıyla besiyeri tazelendi. Transdüksiyondan 72 saat sonra HT1080 hücreleri Olympus IX-81 floresan mikroskobunun 20X objektif büyütmeleri kullanılarak görüntülendi.

3.10. Adenoviral Aşı Vektörlerinin Sephadex G-50 Kolonu ile Tuzdan Arındırılması

Adenoviral vektörlerin CsCl'den arındırılması için jel filtrasyonu tekniği kullanıldı. Tek kullanımlık şırıngalarda paketlenmiş Sephadex G-50 (Sigma, G5080-50G) aracılığıyla santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Bunun için 100 ml'lik bir şişede 1 g Sephadex G-50'in üzerine 10 ml 1X TE (pH 8.0) yavaşça eklendi. 121°C'de 15 dakika otoklavlandı, daha sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Soğuyan solüsyonun üzerinde yer alan süpernatant atıldı ve daha sonra atılan hacim kadar 1X TE (pH 8.0) ile yeniden çözdürüldü. Kolonun hazırlanması için, 1 ml'lik tek kullanımlık bir şırınganın altına az miktarda steril cam yünü yerleştirildi. Şırıngada, 1X TE (pH 8.0) ile dengelenmiş Sephadex G-50 kolonu (0.9 ml yatak hacmi olacak şekilde) hazırlandı. Şırınga Şekil 3.3'te gösterildiği gibi bir santrifüj tüpüne yerleştirildi, 4 dakika 1600 xG'de santrifüjlendi. Paketlenmiş kolon hacmi 0,9 ml olana kadar Sephadex eklenmeye devam edildi ve santrifüj işlemi tekrarlandı. Daha sonra 0,1 ml 1X TE eklendi ve tekrar santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Daha sonra adenoviral aşı vektörleri kolona yüklendi. Düzeneğin ucuna temiz deney tüpü yerleştirilerek santrifüjlendi.



Şekil 3.3. Tek kullanımlık şırıngalara Sephadex G-50 paketlenmesi (https://link.springer.com, Erişim Tarihi: 4 Mart 2024).

3.11. Deney Hayvanlarının İmmünizasyonu ve İmmün Hücre Eldesi

Geliştirilen aşının bağışıklık yanıtı oluşturma etkinliğini test etmek için daha yüksek antikor yanıtı oluşturup, aşıya bağlı daha fazla yan etki sergilediklerinden dişi BALB/c fareler kullanıldı (Klein vd., 2015). 6 haftalık dişi fareler 5 gruba ayrıldı. Her grupta 10 hayvan olacak şekilde 3 grup hayvana, geliştirilen adenovirüs temelli aşılar farklı dozlarda (10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Diğer bir grup farelere intraperitoneal olarak 10^{12} viral partikül AdGFP enjekte edilirken diğer gruba aynı hacimde 1X PBS enjekte edildi. İmmünizasyondan 30 ve 90 gün sonra (grup başı 5 hayvan) fareler sakrifiye edilerek hedeflenen genetik ve immünolojik analizler gerçekleştirildi. Kan serumları ELISA analizleri gerçekleştirmek ve dalak hücreleri T hücre profilini değerlendirmek amacıyla toplandı. İmmünizasyondan 90 gün sonra alınan örnekler ise immün yanıtın kalıcılığı açısından değerlendirildi.

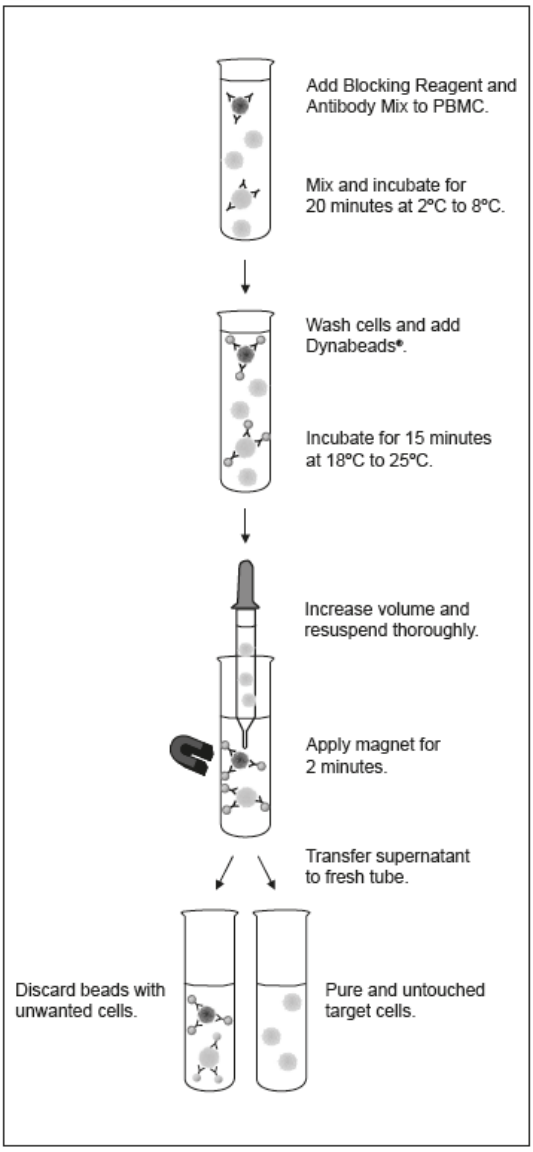
3.11.1. Dalak Hücre İzolasyonu

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan dalak dokuları, içerisinde 5 ml RPMI (%10 FBS, %1 Sodyum Pirüvat, %1 Penicillin streptomisin (Cegrogen P0100-790) hücre kültürü besiyeri

içeren bir petriye alındı ve bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Ardından dalak parçaları 70 µm'lik filtreden geçirilerek 50 ml'lik deney tüplerine aktarıldı ve 600 xG'de 10 dakika 4°C'de santrifüjlendi. Santifüj sonunda süpernatant atıldı. Hücre peleti 500 µl soğuk 1X PBS (%2 FBS'li) ile $1x10^8$ cells/ml olacak şekilde resüspanse edildi. Uzun süreli saklama için sıvı azot tanklarına kaldırıldı.

3.11.2. T Hücrelerinin Dynabeads Kullanılarak Zenginleştirilmesi

Elde edilen numuneler, Dynabeads magnetic beads (Untouched Mouse T cells kit; Life Technologies, US) kitleri kullanılarak T hücresi açısından zenginleştirildi (Şekil 3.4). Hücreler bir tüpe alındı ve üzerine 100 µl ısı ile inaktive edilmiş FCS eklendi. Daha sonra 100 µl antikor karışımı eklendi ve pipetaj yapılarak 4°C'de 20 dakika inkübe edildi. Hücreler, 10 ml izolasyon solüsyonu eklenerek yıkandı, karıştırıldı ve 350xG'de 8 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı. Hücreler 4 ml izolasyon solüsyonunda yeniden süspanse edildi ve üzerine 1 ml Dynabeads manyetik boncuklar eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında hafif karıştırılarak inkübe edilen karışımın üzerine inkübasyon süre sonunda 5 ml izolasyon solüsyonu eklendi. Dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra tüp 2 dakika süreyle manyetik alana yerleştirilerek süpernatant toplandı.



Şekil 3.4. Saflaştırılmamış T hücrelerinin 'Untouched Mouse T cells kit' kullanılarak basit izolasyonu (https://www.thermofisher.com/, Erişim Tarihi: 2 Haziran 2024).

3.12. Hücresel Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi

Hücresel bağışıklık yanıtının değerlendirilmesi için IFN-γ ELISA testi yapıldı. Bu test, antijen spesifik T hücrelerinden salınan IFN-γ miktarını ölçerek aşının etkinliğini belirlemeye yardımcı olur. IFN-γ, antijen sunumu ve Th1 tipi farklılaşma gibi immün modülasyon süreçlerinde önemli bir rol oynar ve bağışıklık yanıtının değerlendirilmesinde kritik bir göstergedir.

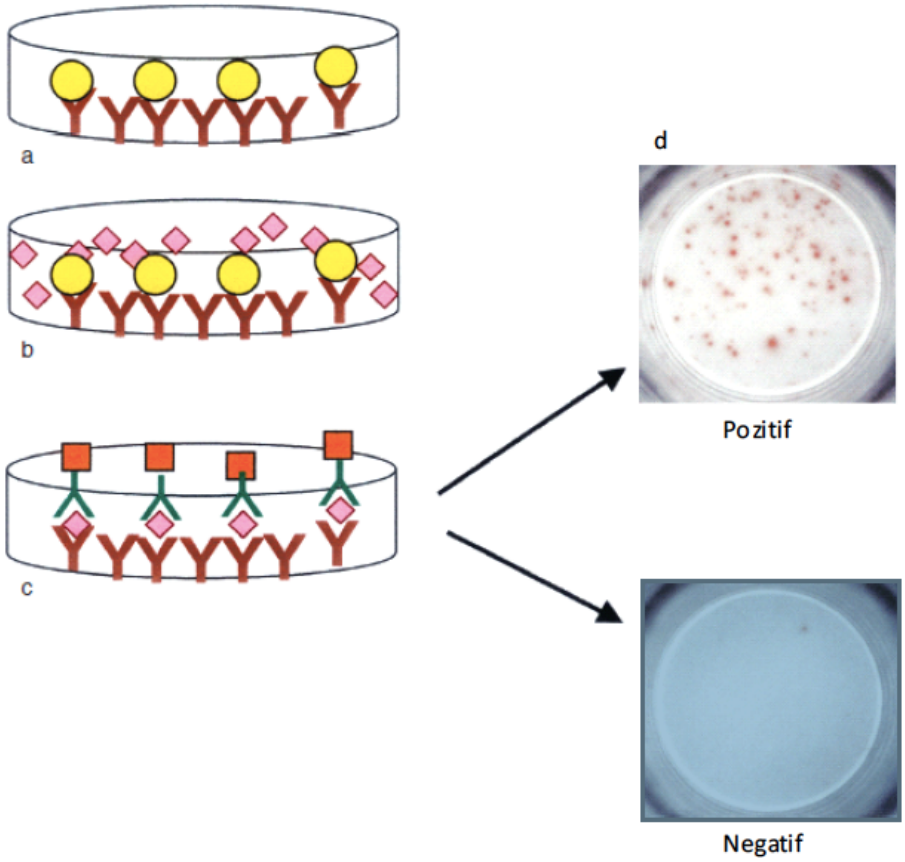
3.12.1. Efektör T Hücre Yanıtı Saptama

Aşılanan fareler sakrifiye edildikten sonra dalaklarından tek hücreli süspansiyon hazırlandı. Splenositler spike peptidi ile uyarıldı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Süpernatant toplandı ve IFN-γ miktarı IFN gamma Mouse ELISA Kit (ab100689) kullanılarak analiz edildi. Bu amaçla, kuyulara 100 µl splenositler eklendi ve üzeri kapatılarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün serum kuyulardan uzaklaştırıldı ve 4 kere 1X yıkama tamponu kullanılarak kuyular yıkandı. Kuyulara 100 µl biyotinlenmiş Interferon gama tespit etme antikoru eklendi ve petri oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Süre sonunda sıvı uzaklaştırıldı ve kuyular 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Daha sonra kuyulara HRP-Streptavidin solüsyonu eklendi ve 45 dakika oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak inkübe edildi. Sıvı süre sonunda uzaklaştırıldı ve yıkama tekrar edildi. 100 µl TMB substrat ajanı kuyulara eklendi ve 30 dakika karanlıkta petri inkübe edildi. 30 dakika bittiğinde kuyulara durdurma solüsyonu eklendi ve plate 450 nm dalga boyunda Thermo Fisher Multiskan Spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü.

3.12.2. ELISpot Analizi ile Splenosit Yanıtının Saptanması

ELISpot analizi için kit içerisinde yer alan 96-oyuklu hücre kültür petrisi kuyu başına 200 µl yıkama solüsyonuyla 4 defa yıkandı. Yıkama sonrası kuyulara dengeleme amacıyla 200 µl steril RPMI besiyerleri eklendi ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından besiyeri aspire edildi ve kuyulara 100 µl dalak hücresi ve antijen olarak Spike peptidi (abcam, ab273063) son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde eklendi. Pozitif kontrol hücreleri ise 0.5 µg/ml calsium ionomycin (Thermo, I24222) ile gece boyu 37°C'de ve %5 CO_2 ile stimüle edildi ve kuyulara eklendi. Petri alüminyum folyo ile sarılarak 48 saat

37°C'de ve %5 CO_2 inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyular 200 µl yıkama solüsyonuyla 4 defa yıkandı. Yıkanan kuyulara 100 µl Detection Antibody (TNF-α, IFN-γ veya IL-2) eklendi ve petri +4°C de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah kuyular için yıkama prosedürü tekrarlandı ve 100 µl Streptavidin-AP Konsantre A kuyulara eklenerek 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Kuyular tekrar yıkandıktan sonra kuyulara 100 µl BCIP/NBT substratı çeker ocak içinde eklendi ve 1 saat oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. 1 saat inkübasyonun ardından kuyulardaki solüsyon uzaklaştırıldı ve deiyonize su ile kuyular durulandı. 90 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra spotlar diseksiyon mikroskobu altında sayıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. ELISpot ile sitokin ölçümü iş akışı şeması (MUTLU, 2014).

3.13. Hümoral Bağışıklık Yanıtının Değerlendirilmesi

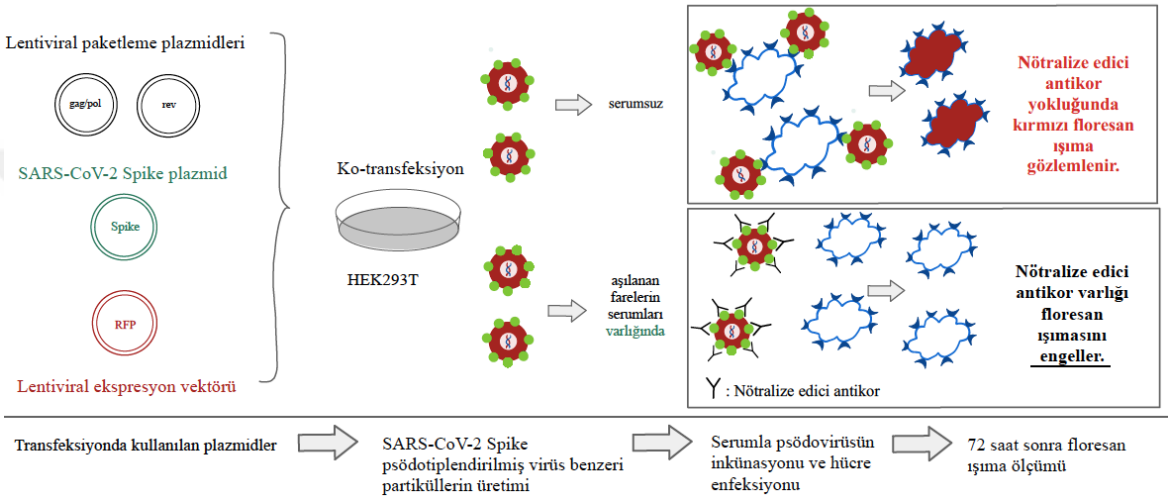
3.13.1. SARS-CoV-2 Spike Protein Spesifik IgG Antikor Yanıtlarının Ölçülmesi

PVC kaplı 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 1X PBS içinde 1 µg/ml Spike antijeni kuyu başına 50 µl olacak şekilde eklendi ve plate 16 saat +4°C'de inkübe edildi. Üzerine fare serumu eklendi ve gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün kaplama solüsyonu uzaklaştırıldı ve kuyular 1X PBS-T (0.05 % Tween-20 in PBS) ile üç defa yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla kuyulara bloklama solüsyonu (Bovin Serum Albumin) eklendi ve 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyulara aşılanan farelerden elde edilen serumlar 100 µl/kuyu olarak eklendi. Kuyular 1X PBS-T ile iki defa yıkandı ve kuyulara 100 µl dilüe edilmiş primer antikor (Abcam, ab272504) eklendi. Gece boyu inkübasyon süresi sonunda kuyular 4 defa 1X PBS-T ile yıkandı. İkinci antikor olarak kullanılan 1/1000 dilüsyonundaki Goat anti-rabbit IgG HRP konjugatı (Abcam, ab205718) kuyulara eklendi.30 dakika inkübasyon ve yıkama sonrası 100 µl TMB Substrat solüsyonu kuyulara eklendi. Kuyuların üzeri kapatıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda kuyulara 100 µl durdurma solüsyonu eklendi ve reaksiyon 450 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılarak 30 dakika içinde hesaplandı.

3.14. Aşılama Sonrası Nötralize Edici Antikor Yanıtlarının Ölçülmesi

Nötralizasyon testlerinde kullanılmak üzere SARS-CoV-2 Spike proteini ile psödotiplendirilmiş 3. jenerasyon lentivirüsler (LentiRFPSpike) oluşturulması amaçlandı. Bunun için öncelikle RFP geni taşıyan transfer vektörü (Addgene #26001), gag-pol, rev ve SARS-CoV-2 Spike (HDM-SARS2-Spike-delta21, plazmid #155130) geni kodlayan plazmidleri 293T hücrelerine kotransfekte edildi. 293T hücreleri virüsün hücre içine girmesine yetecek kadar yüzeylerinde spike reseptörü (TMPRSS-2) bulundurduğundan nötralizasyon testlerinde kullanıldı. Psödovirüs nötralizasyonunda kullanılacak virüs dozunu belirlemek için 293T hücreleri kuyu başına $5x10^4$ olacak şekilde 24 kuyulu petrilere ekildi. 24 saat inkübasyondan sonra kuyular 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 MOI dozlarında LentiRFPSpike virüsüyle transdükte edildi. Transdüksiyondan 72 saat sonra kuyulardaki hücrelerin %100'e yakınını transdükte eden minimum doz 5 MOI olarak belirlendi.

Aşılanmış farelerden elde edilen serum farklı dilüsyonlarda 5 MOI LentiRFPSpike ile 1 saat inkübe edilip sonrasında 293T hücrelerine verildi. Enfeksiyondan 72 saat sonra floresan mikroskopta RFP ışımalarına bakılarak LentiRFPSpike transdüksiyonunda bir azalma olup olmadığı belirlendi. %50 inhibisyon dilüsyonu (ID50), Prism9 yazılımı (GraphPad) kullanılarak belirlendi.



Şekil 3.6. Psödovirüs nötralizsyon testi iş akışı şeması (Cai ve ark., 2024).

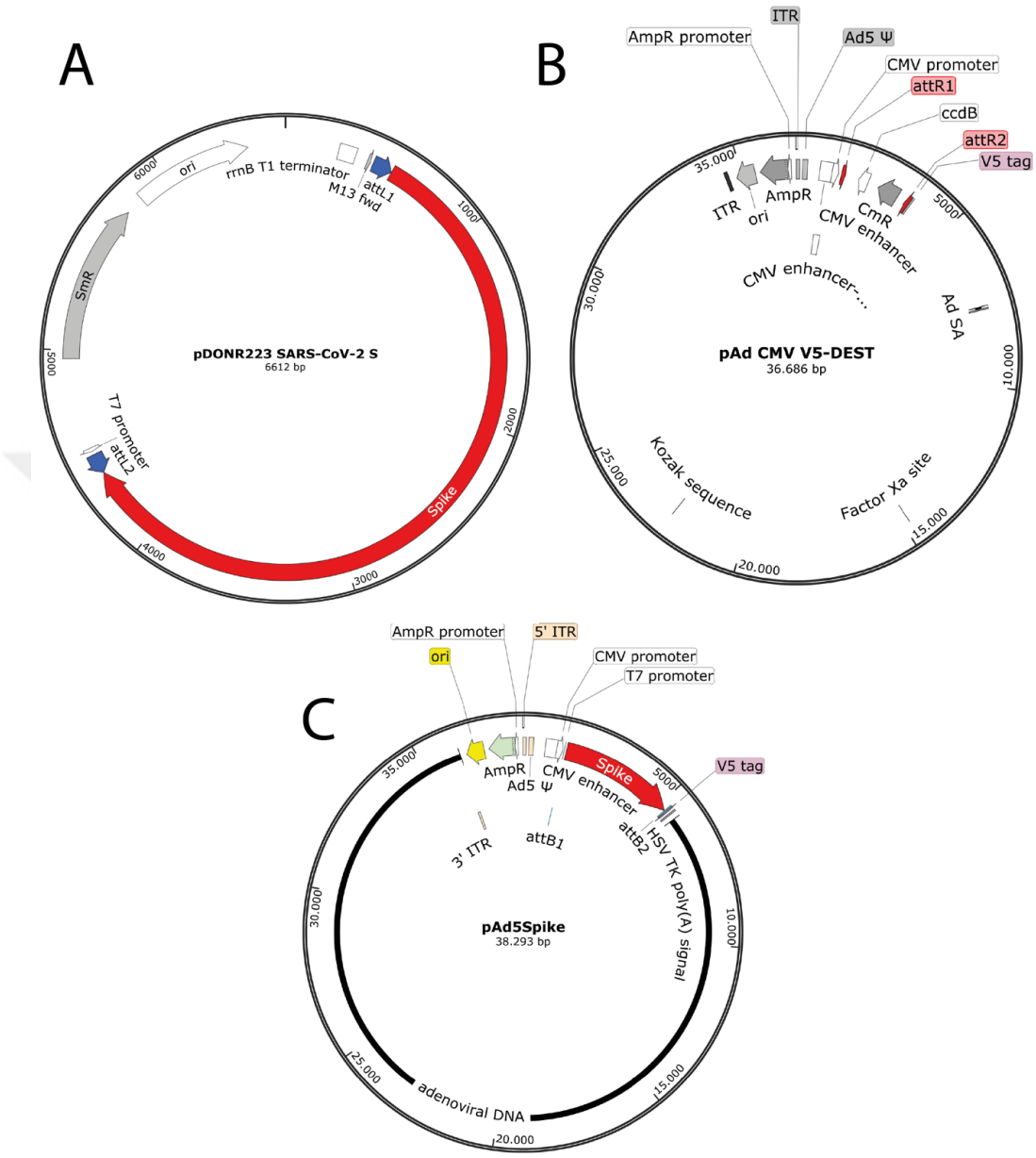
3.15. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler ve grafik çizimleri GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. İkiden çok grup söz konusu olduğunda, normal dağılım gösteriyorsa tek yönlü varyans analizi (One-Way ANOVA) testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık eşik değeri $p = 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

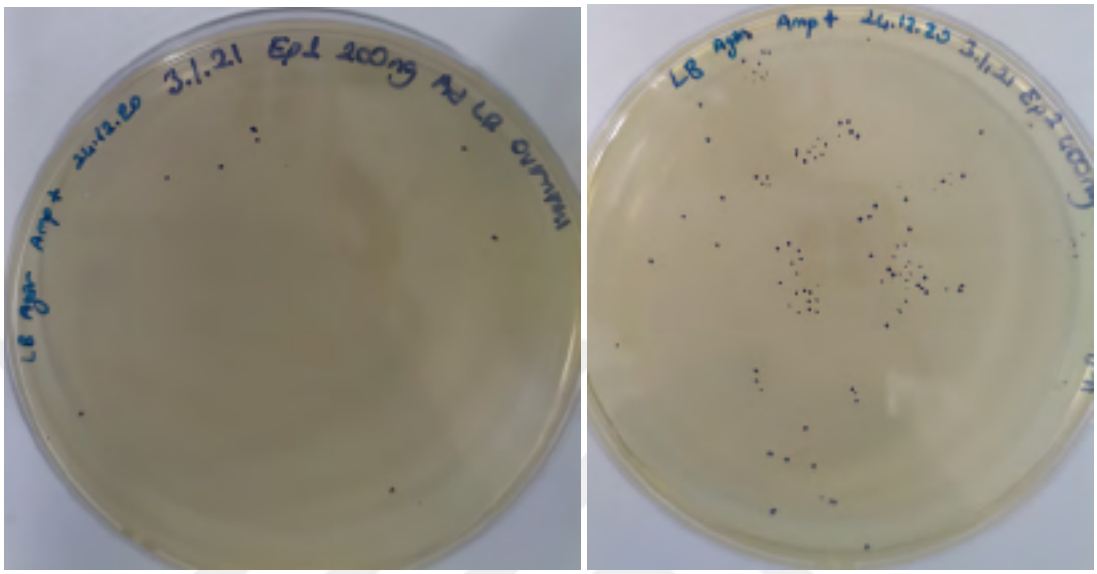
4.1. SARS-CoV-2 Spike Geni Taşıyan Adenoviral Ekspresyon Vektörü (pAd5Spike) Oluşturulması

SARS-CoV-2 Spike geninin adenoviral transfer vektörlerine klonlanması ve ekspresyon analizinin gerçekleştirilmesi amacıyla Gateway® rekombinasyon teknolojisi kullanıldı. Bu teknoloji, giriş vektöründe yer alan Spike geninin önünde ve arkasında bulunan attL1 ve attL2 bağlantı bölgeleri ile, destinasyon vektöründeki attR1 ve attR2 bölgeleri arasındaki genlerin yüksek verimlilikle ve hassasiyetle rekombine edilmesini hedefler. Giriş vektörü üzerindeki attL1 bölgesi, destinasyon plazmidi üzerindeki attR1 bölgesi ile ve giriş vektörü üzerindeki attL2 bölgesi, destinasyon plazmidi üzerinde yer alan attR2 bağlantı bölgesiyle çaprazlanır ve sonuçta, başlangıçta giriş vektörü üzerinde yer alan spike geni, üzerinde adenoviral genleri taşıyan destinasyon vektörü üzerine taşınır. Böylelikle üzerinde Spike geni taşıyan adenoviral ekspresyon plazmidi elde edilmiş olur (Şekil 4.1). İlk olarak spike gen sekansını içeren giriş vektörlerinin elde edilmesi için ilgili plazmidi taşıyan bakteriler, agar petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekildi. 24 saat sonra oluşan kolonilerden mini kültürler kuruldu. Giriş vektörlerinin bakterilerden izolasyonundan sonra, kit protokolüne uygun olarak Gateway LR Klonaz Enzim karışımı aracılığıyla LxR reaksiyonu kuruldu. Yapılan LR reaksiyonunun bilgisayar ortamında simülasyonu, SnapGene® programı kullanılarak gerçekleştirildi. 3822 baz çiftinden oluşan Spike gen sekansını kodlayan pDONR223 (Addgene, plasmid 149329) giriş vektörü, seçilen pAd/CMV/V5-DEST™ destinasyon vektörü ile LR klonlamaya tabii tutuldu ve pAd5Spike ekspresyon vektörü oluşturuldu (Şekil 4.1).



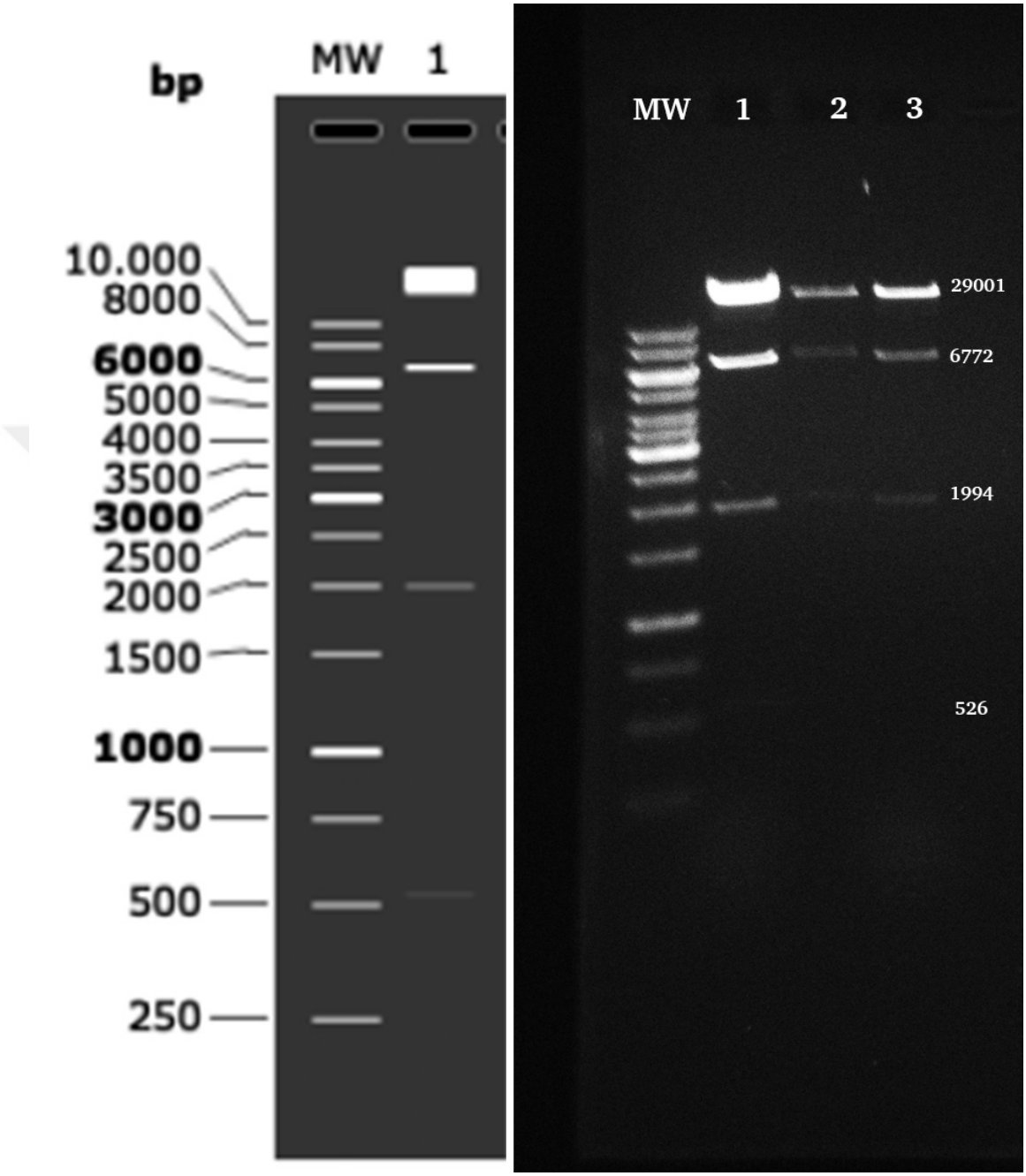
Şekil 4.1. Gateway LR rekombinasyon reaksiyonu simülasyonu (SnapGene® ile oluşturuldu). Giriş plazmidi (A) üzerinde yer alan attL1/attL2 bölgeleri ile destinasyon vektörü (B) üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri, LR klonaz enzim karışımı aracılığıyla çaprazlanır. Giriş vektörü ile destinasyon vektörünün rekombinasyonu sonucu oluşan transfer vektörü (C) üzerindeki Spike geninin pozisyonu, adenoviral genlerle birlikte gösterilmiştir.

200 ng ve 400 ng giriş vektörü kullanılarak kurulan reaksiyonların bakterilere transformasyonu sonucu koloniler elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Transformasyon sonrası amfisilin içeren (100 µg/ml) LB agar petrilere yayılan ekspresyon vektörlerini taşıyan bakteri kolonilerinin 16 saat sonraki görüntüleri. Mavi noktalar sayılan kolonileri temsil etmektedir.

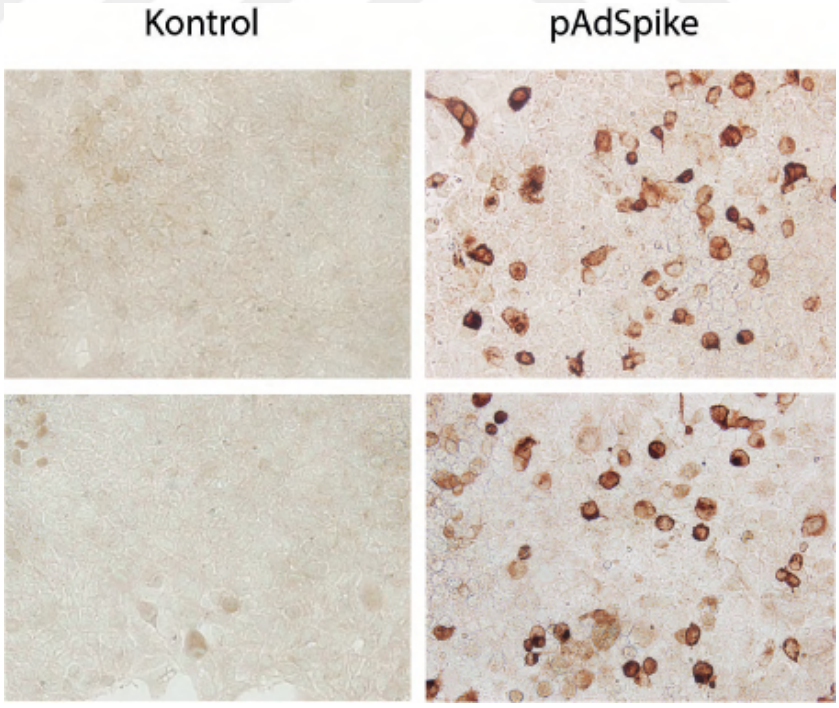
Transformasyondan sonra, hem 200 ng hem 400 ng ekilen petriler kullanıldı ve petrilerden raslantısal olarak seçilen kolonilerden mini kültür kuruldu ve plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Diagnostik restriksiyon enzim kesimleri (EcoRI) uygulanan plazmidler %1'lik agaroz jelde 60 dakika yürütüldü ve doğru klonlar belirlendi. Agaroz jel elektroforez sonuçları, SnapGene® programı kullanılarak oluşturulan simülasyonun görseliyle kıyaslanarak doğrulandı. (Şekil 4.3)



Şekil 4.3. Oluşturulan pAdSpike plazmidlerinin jel görüntüsü. Soldaki panel Snapgene uygulamasıyla oluşturuan temsili jel görüntüsüdür. Sağdaki panelde 1, 2 ve 3 numaralı kuyular farklı kolonilerden izole edilen pAdSpike plazmidininin doğrulamasını temsil etmektedir. Sırasıyla pAd/CMV/V5-DEST™ ve MW isimli kuyu 1 kb plus DNA Ladder moleküler belirtecini temsil etmektedir (Thermo, SM0313).

4.2. Ekspresyon Plazmidinden Spike Protein Sentezinin Tespiti

Adenoviral vektörlerin yapımında kullanılmak üzere oluşturulan ekspresyon plazmidinden (pAd5Spike) SARS-CoV-2 spike glikoproteininin sentez edildiğini göstermek amacıyla immünohistokimyasal (IHC) boyamalar yapıldı. Bu deney için insan embriyonik böbrek hücre hattı olan 293T hücreleri kullanıldı. Bu hücreler, Spike geni içermeyen bir hücre hattıdır. pAd5Spike ekspresyon plazmidi, PEI:DNA oranı 3:1 olacak şekilde 293T hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 72 saat sonra, hücreler Anti-SARS-CoV-2 spike glikoprotein antikoru ile immünositokimyasal olarak boyandı. Elde edilen sonuçlar, sadece PEI alan kontrol hücrelerinde herhangi bir boyama gözlenmediğini, ancak pAd5Spike plazmidi ile transfekte edilen hücrelerde Spike proteininin varlığını gösterdi (Şekil 4.4). Bu bulgular, ekspresyon vektörünün başarılı bir şekilde oluşturulduğunu ve taşıdığı Spike transgenin 293T hücrelerinde etkili bir şekilde ifade edildiğini göstermektedir.

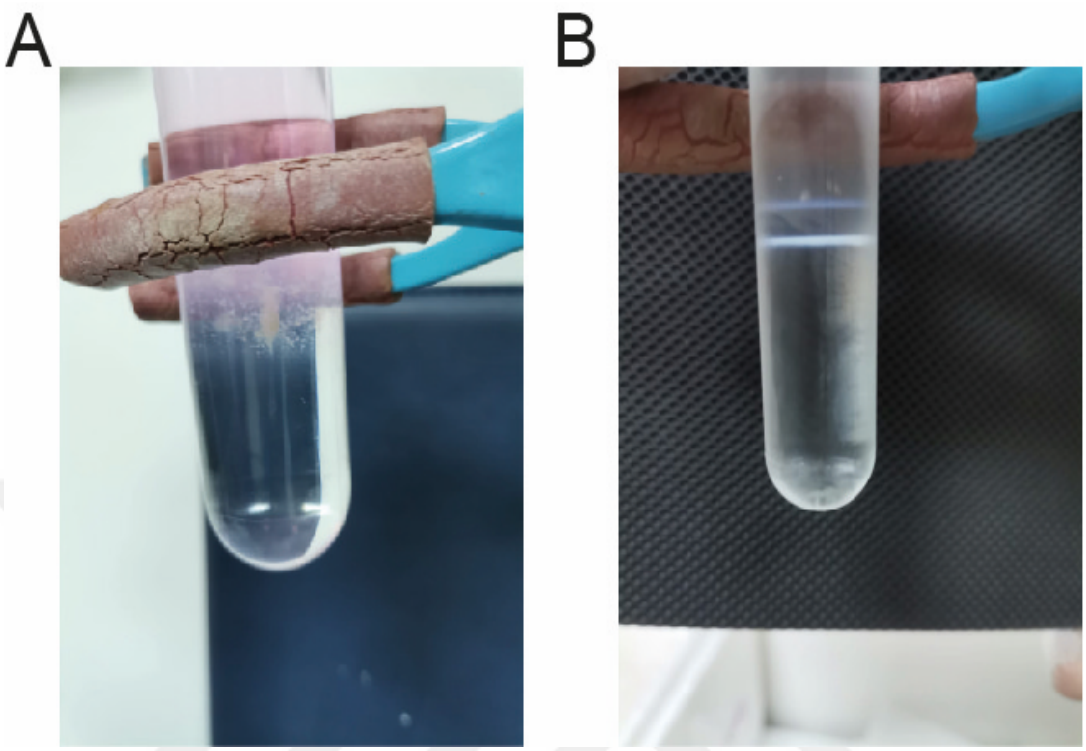


Şekil 4.4. Spike kodlayan adenoviral ekspresyon plazmidinden SARS-CoV-2 spike glikoprotein ekspresyonunun 293T insan embriyonik böbrek hücre hattında gösterilmesi. Sol paneller, sadece PEI ile muamele edilen hücreleri temsil ederken, sağ paneller, pAdSpike plazmidi ile transfekte edilen hücreleri göstermektedir. Kahverengi boyamalar, spike proteini ekspresyonunu ifade etmektedir. (PEI: polietilenimin)

4.3. Adenovirüs Tabanlı Aşı Vektörünün (Ad5Spike) Yapımı

SARS-CoV-2 Spike geninin hücrelere taşınmasını ve ifade edilmesini sağlayacak adenoviral vektörlerin üretimi için pAd5Spike ekspresyon plazmidinin 293A hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla ilk olarak, 293A hücreleri kültüre edildi. 293A hücreleri, adenoviral vektör üretimi için genetik stabilite, yüksek üretim verimliliği ve uygun rekombinasyon ortamı gibi avantajlar sunar. Ayrıca pAd5Spike plazmidinde yer almayan replikasyondan sorumlu E1, E3 genlerini eksprese ederek adenoviral vektörlerin üretimini ve çoğaltılmasını sağlar.

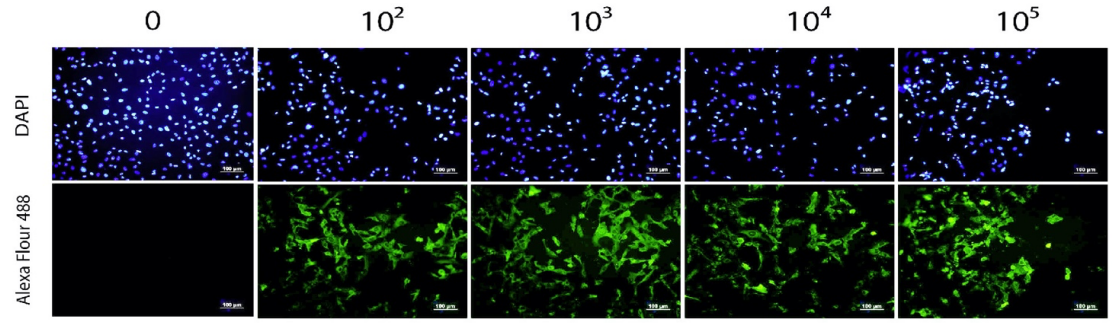
Başlangıçta 100 mm'lik petri kaplarında kültüre edilen 293A hücreleri pAd5Spike ekspresyon plazmidi ile transfekte edildi. Bu transfeksiyon sonucunda, hücrelerde adenoviral vektörlerin üretimi gerçekleştirildi. Elde edilen düşük hacimli adenoviral vektör stoğunu artırmak amacıyla, bu transfekte hücrelerden toplanan viral stok, 40 adet, 150 mm'lik büyük petri kaplarında kültüre edilmiş yeni 293A hücrelerini transdükte etmek için kullanıldı. Bu yöntemle, aşılamada kullanılacak yeterli miktar ve yüksek titrede adenoviral aşı vektörlerinin üretilmesi sağlandı. İnkübasyon sonrası viral vektörlerin saflaştırılması amacıyla hücreler toplandı ve viral partiküllerin yoğunluklarına göre ayrılmasını sağlamak için santrifüj edildi (Şekil 4.5-A). Elde edilen viral bantlar, gradientli tamponlar kullanılarak viral partiküllerin daha da saflaştırılmasını ve yoğun titrede elde edilmesini sağlamak üzere ultrasantrifüj işlemine tabi tutuldu (Şekil 4.5-B). Son olarak, viral bantlar toplandı, OD_{260} ölçümü yapılarak viral titre belirlendi ve gliserol ile karıştırılarak -80°C'de saklandı.



Şekil 4.5. Adenoviral aşı vektörlerinden ultrasantrifüj sonrası oluşan viral bantlar. A. İlk ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. B. İkinci ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar.

4.4. Ad5Spike Vektörlerinden Spike Protein Sentezinin Teyidi

293A hücrelerinin pAd5Spike ekspresyon plazmidleriyle transdükte edilmesinden üretilen ve saflaştırılan Ad5Spike adenoviral vektörlerinden SARS-CoV-2 Spike protein ekspresyonunun doğrulanması amacıyla immünofloresan (IF) boyama yöntemi uygulandı. Saflaştırılan adenoviral stoklar 10 mM Tris-Cl solüsyonu ile 1:20 ve 1:50 oranlarında dilüe edildi. OD_{260} ölçümleri yapılarak, her iki dilüsyonun ortalaması alındı ve üretilen Ad5Spike vektörünün titresi yaklaşık $1{,}65x10^{12}$ olarak hesaplandı (1 OD_{260}: $1{,}1x10^{12}$ partikül sayısı). Spike protein ekspresyonunu doğrulamak için HT1080 hücreleri Ad5Spike ile transdükte edildi. Transdüksiyondan 72 saat sonra Spike proteinine karşı immünofloresan boyama yapıldı. Sonuçlara bakıldığında, kontrol hücrelerde herhangi bir boyama gözlenmezken, Ad5Spike ile transdükte edilen hücrelerde artan transdüksiyon oranlarına bağlı olarak artan Spike boyaması gözlendi (Şekil 4.6). Bu bulgular, Spike kodlayan adenoviral vektörlerin başarıyla oluşturulduğunu ve taşıdığı transgenin hücrelerde etkili bir şekilde eksprese olduğunu göstermektedir.

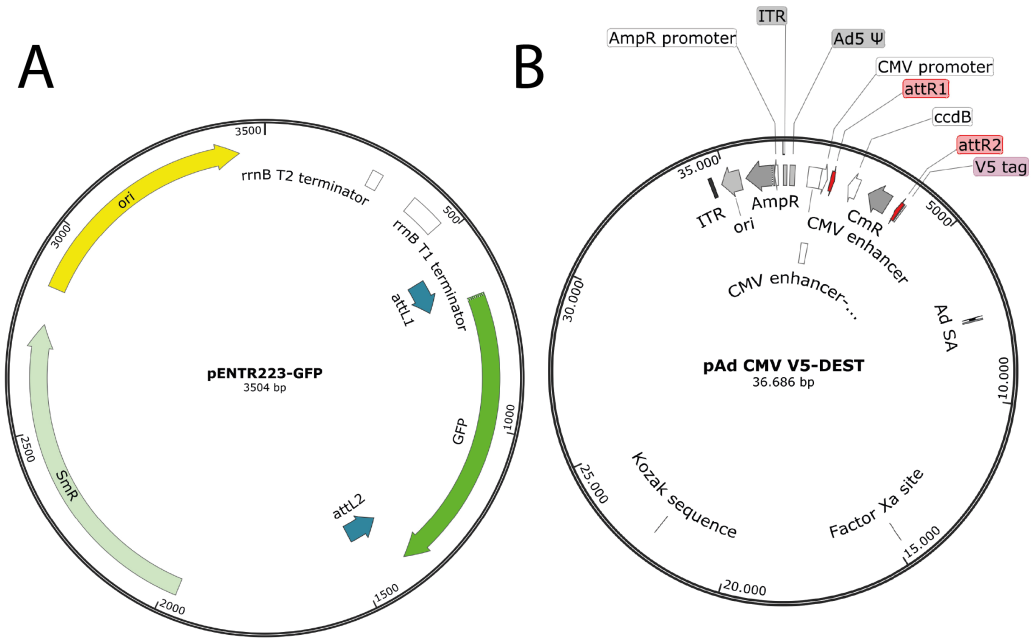


Şekil 4.6. HT1080 hücre hattında SARS-CoV-2 spike glikoprotein ekspresyonu. HT1080 hücreleri artan oranlarda viral titrelerde Ad5Spike vektörü ile transdükte edildi (10^2, 10^3, 10^4, 10^5 vp). Transdüksiyondan 72 saat sonra Anti-SARS-CoV-2 spike glikoprotein antikoru ile immünofloresan boyama gerçekleştirildi. Yeşil ışımalar spike proteini ekspresyonunu ifade etmektedir. Çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı (Büyütme oranı 20X).

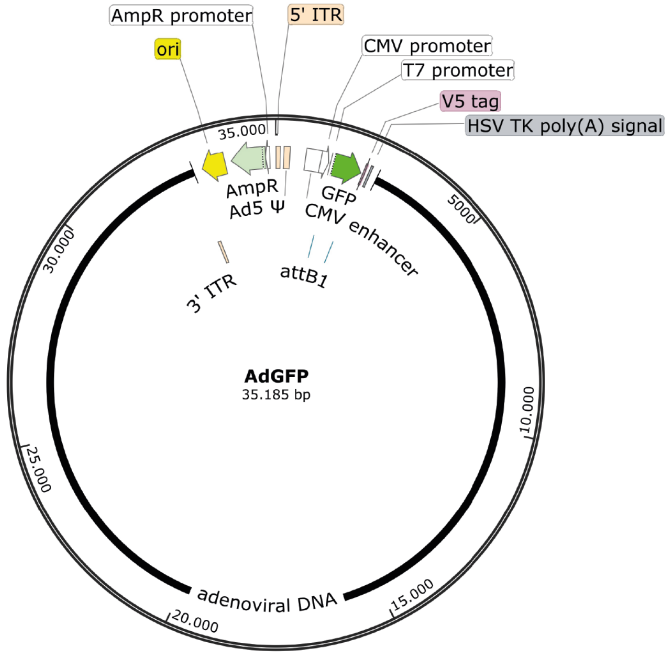
4.5. Yeşil Floresan Protein Kodlayan Adenoviral Kontrol Vektörlerinin (AdGFP) Yapılması

Yapılacak deneylerde kontrol vektörü olarak kullanılmak üzere Yeşil Floresan Protein (GFP) eksprese eden adenoviral vektörlerin (pAdGFP) oluşturulması ve çoğaltılması hedeflenmiştir. GFP, gen ifadesinin doğrulanması ve transfeksiyon etkinliğinin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan bir kontrol belirtecidir.

GFP kodlayan sekansı içeren giriş vektörlerinin izolasyonunun ardından, kit protokolüne uygun olarak Gateway LR Klonaz Enzim karışımı kullanılarak LR klonlama reaksiyonu gerçekleştirildi. LxR reaksiyonunun bilgisayar ortamındaki simülasyonu SnapGene® programında gerçekleştirildi. 730 bç GFP gen sekansı kodlayan pENTR223 GFP giriş vektörü, destinasyon vektörü olarak seçilen pAd/CMV/V5-DEST™ vektörü ile LR klonlamaya tabi tutuldu (Şekil 4.7). Giriş vektörü üzerindeki attL1-attL2 bölgeleri, destinasyon vektöründe yer alan attR1-attR2 bölgeleriyle çaprazlandı. Böylece giriş vektörü üzerinde yer alan GFP gen bölgesi reaksiyon sonucunda üzerinde adenoviral genleri taşıyan ekspresyon plazmidi üzerine taşındı ve GFP kodlayan adenoviral ekspresyon vektörü (pAdGFP) elde edildi (Şekil 4.8).

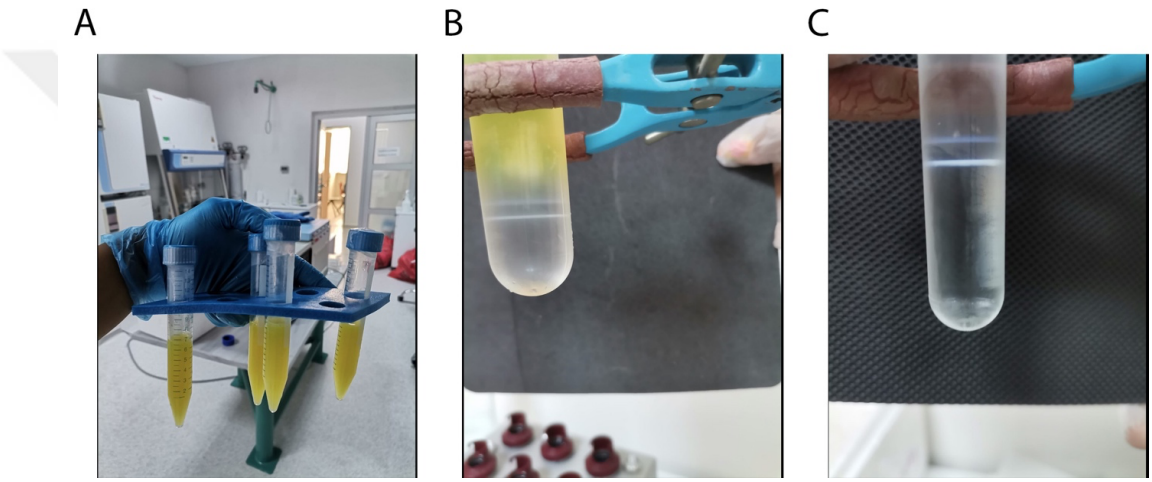


Şekil 4.7. LxR rekombinasyon reaksiyonu. Destinasyon vektörü üzerindeki (B) attR1/attR2 bölgeleri, LR klonaz enzim karışımı aracılığıyla, giriş plazmidindeki (A) attL1/attL2 bölgeleri ile yer değiştirir (SnapGene® ile oluşturuldu).



Şekil 4.8. Yeşil floresan proteini kodlayan adenoviral ekspresyon plazmidi haritası. Giriş vektörü ile destinasyon vektörünün LxR rekombinasyonu sonucu oluşan transfer vektörü üzerinde Spike geninin pozisyonu, adenoviral genlerle birlikte gösterilmiştir. Snapgene® (Version 4.3.6) kullanılarak oluşturulmuştur.

Elde edilen pAdGFP, 293A hücrelerine Lipofektamin 3000 kullanılarak transfekte edilerek viral stok oluşturuldu. Oluşturulan viral stok, viral titrenin arttırılması için 40 adet 150 mm'lik hücre kültür petrilerindeki 293A hücrelerine transdüksiyon için kullanıldı ve inkübasyon sonrası hücreler toplandı. Santrifüj işlemi ile viral bantlar elde edildi ve ardından gradientli tamponlar kullanılarak ultrasantrifüj işlemi tekrarlandı (Şekil 4.9). Sonuç olarak, viral bantlar toplandı, OD_{260} ölçümü yapılarak viral titre belirlendi ve gliserol ile stoklanarak -80°C'de saklandı.



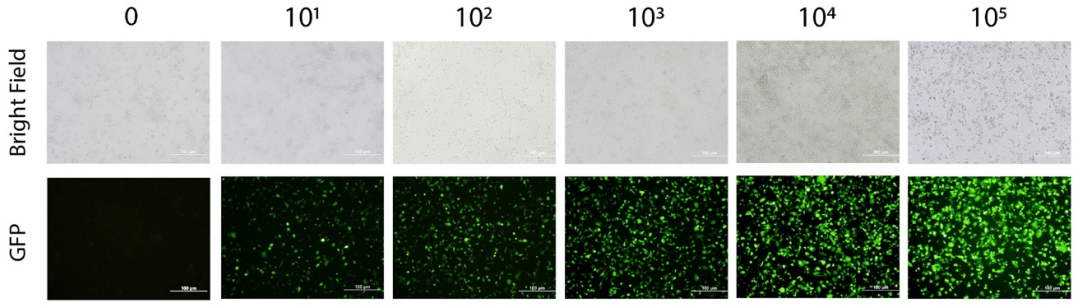
Şekil 4.9. Adenoviral kontrol vektörlerinin saflaştırma basamakları. A. Kontrol vektörleriyle transdüksiyondan 36 saat sonra hücre süpernatantları. B. İlk ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar. C. İkinci ultrasantrifüj sonrası oluşan ilk viral bantlar.

Sonuç olarak, GFP eksprese eden adenoviral vektörlerin (AdGFP) başarıyla oluşturuldu ve yüksek titreli viral stoklar elde edildi. Santrifüj ve ultrasantrifüj işlemleri sonucunda saf viral bantlar elde edildi ve stoklanarak uzun süreli saklama için hazırlandı.

4.6. AdGFP Kontrol Vektörlerinden Protein Ekspresyonunun Gösterilmesi

GFP kodlayan birinci nesil adenoviral vektörlerinden (AdGFP) protein ekspresyonunu doğrulamak amacıyla HT1080 hücrelerine transdüksiyon gerçekleştirilmiştir. GFP ekspresyonu, adenoviral kontrol vektörlerinin etkinliğini ve transfeksiyon verimliliğini göstermek için kullanılmıştır. HT1080 hücreleri, hücre başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 ve 10^5 virüs partikülü olacak şekilde AdGFP vektörleri ile transdükte edildi. Transdüksiyondan 72 saat sonra, hücrelerdeki GFP ekspresyonunu gözlemlemek amacıyla Olympus IX-81 floresan mikroskobunda immünofloresan ışımalar görüntülendi. Sonuçlar, GFP eksprese

eden kontrol vektörleri ile transdükte edilmiş hücrelerde artan oranlarda floresan ışımanın varlığını göstermektedir (Şekil 4.10). Bu bulgular, AdGFP vektörlerinin başarıyla hücrelere girdiğini ve GFP proteinini etkin bir şekilde eksprese ettiğini doğrulamaktadır.



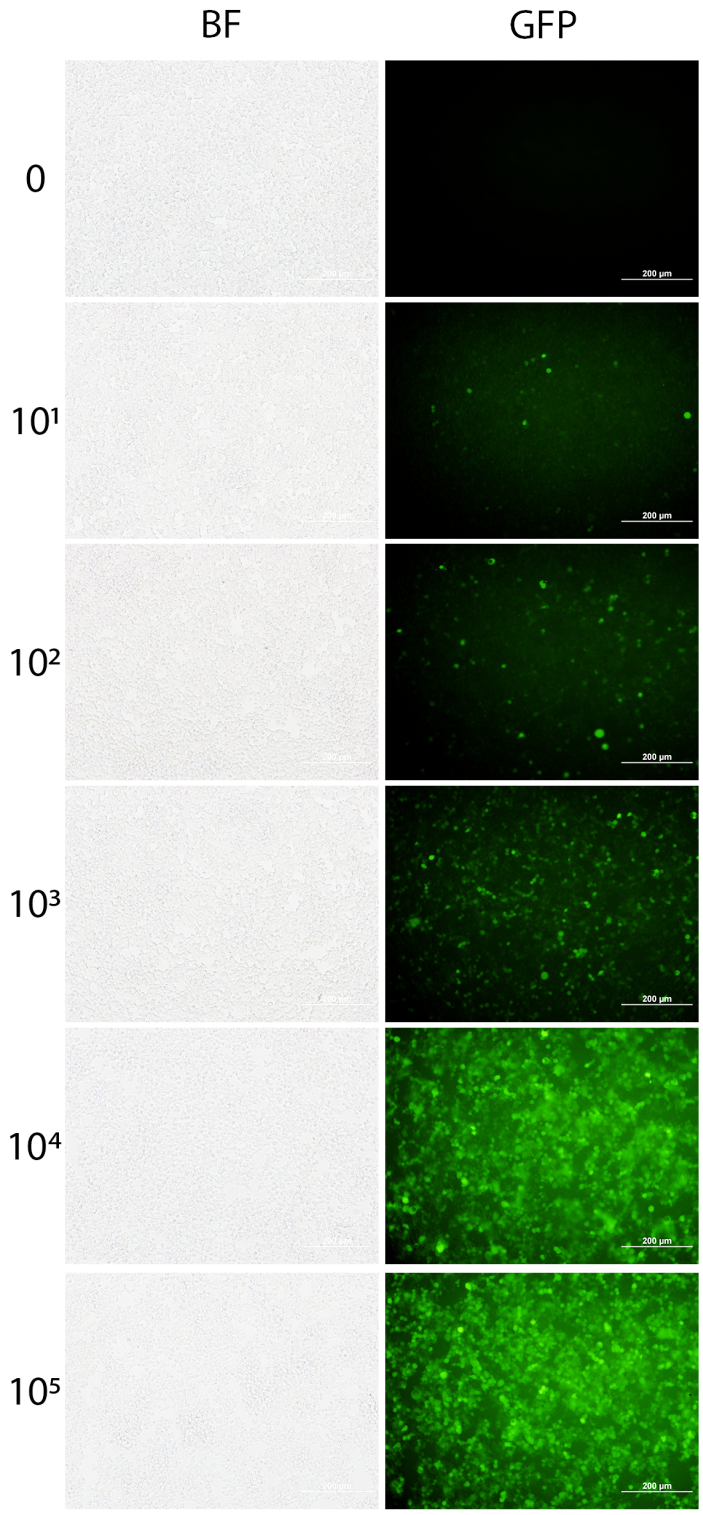
Şekil 4.10. HT1080 hücre hattında yeşil floresan proteini ekspresyonu. 0, negatif kontrol olarak virüs ile transdükte edilmemiş hücreleri temsil etmektedir. 10^1, 10^2, 10^3, 10^4 ve 10^5 viral partikül dozlarını ifade etmektedir. Yeşil ışımalar yeşil floresan proteini ekspresyonunu göstermektedir (Büyütme oranı 10X).

4.7. RAW264.7 ve Thp-1 Hücre Hatlarının Adenoviral Kontrol Vektörleriyle Transdükte Edilmesi

Bu deney, AdGFP kontrol vektörlerinin, makrofaj ve dendritik hücrelerini temsil eden RAW264.7 ve Thp-1 hücre hatlarını transdükte edilebildiğini göstermek için yapılmıştır. Bu, AdSpike vektörlerinin hedef hücrelerde etkili olup olmadığını anlamak için kritik bir adımdır.

4.7.1. AdGFP Kontrol Vektörlerinin RAW264.7 Makrofaj Hücre Hattını Transdükte Etme Yeteneği

RAW264.7 makrofaj hücreleri, %10 FBS içeren DMEM besiyerinde 24 kuyulu hücre kültür petrilerine ertesi gün %70-80 yoğunluğa ulaşacak şekilde ekildi ve uygun koşullarda inkübe edildi. Artan dozlarda adenoviral kontrol vektörleriyle FBS içermeyen ortamda transdükte edildi. Transdüksiyondan 3 gün sonra mikroskoptan alınan ışıma görüntüleri, RAW264.7 makrofaj hücrelerinin AdGFP vektörleriyle başarılı şekilde transdükte edildiğini gösterdi (Şekil 4.11).

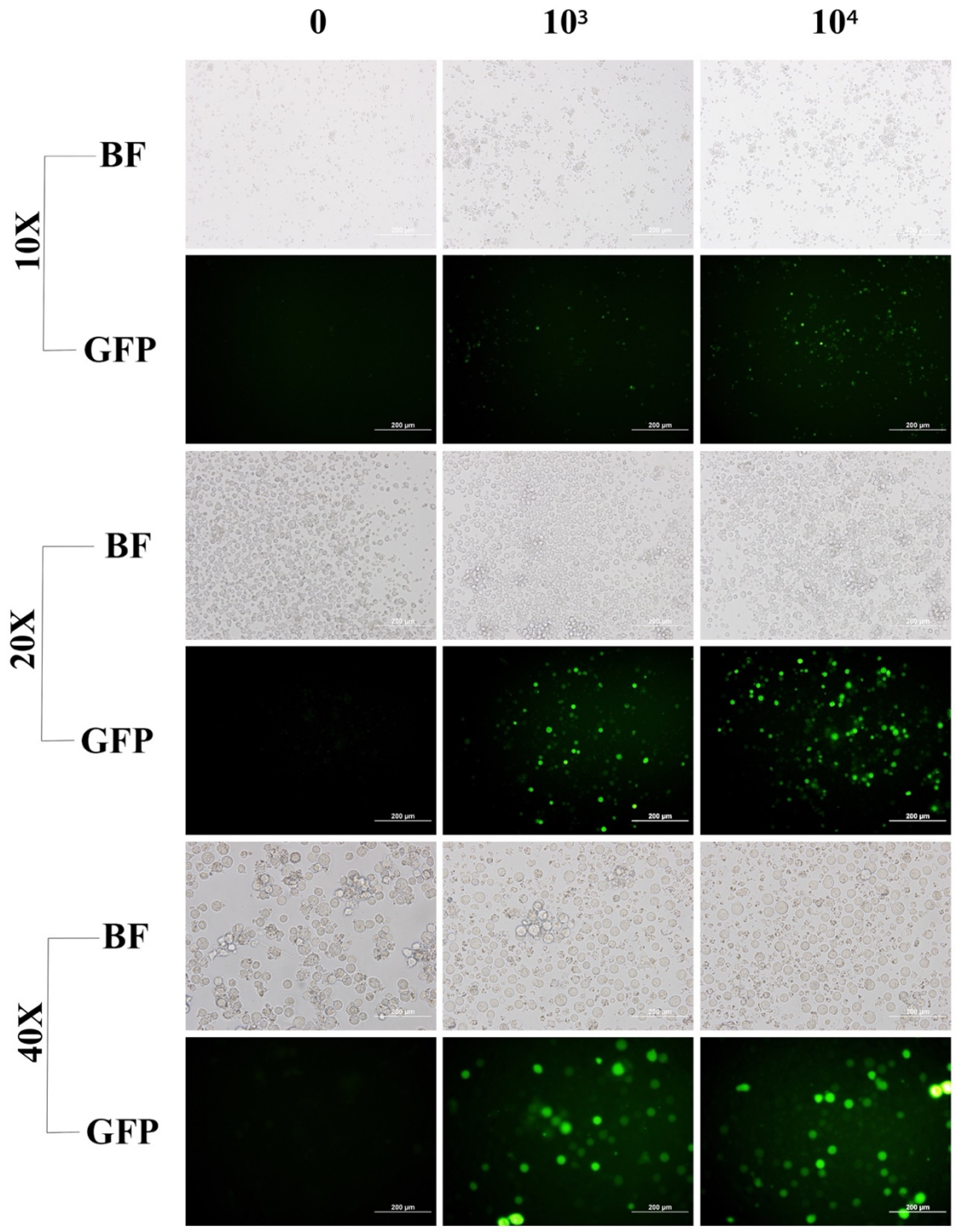


Şekil 4.11. RAW264.7 makrofaj hücrelerinin AdGFP ile transdüksiyonu. Objektif büyütmesi 20X. BF: Bright Field (Aydınlık alan), GFP: Yeşil Floresan Protein. 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 ve 10^6 ile belirtilen sayılar kuyu başına düşen virüs dozları olup birimi viral partiküldür. Yeşil ışımalar pozitif floresan protein varlığını temsil eder.

4.7.2. Thp-1 Monositik Hücre Hattının AdGFP Kontrol Vektörüyle Transdüksiyonu

Thp-1 insan monositik hücre hatları, %10 FBS içeren RPMI besiyerlerinde 24 kuyulu hücre kültür petrilerine ekildi. Ertesi gün, 10^6 hücre sayısına ulaşan Thp-1'ler, kuyu başına 10^3 ve 10^4 viral partikül doz AdGFP ile transdükte edildi. Kontrol kuyusuna, virüs ile aynı hacimde 10 mM Tris-Cl eklendi. Üç saat sonra kuyulara eşit hacimde %20 FBS içeren RPMI eklendi. Transdüksiyondan 72 saat sonra elde edilen mikroskop görüntüleri, Thp-1 hücrelerinin AdGFP vektörleriyle transdükte edildiğini gösterdi (Şekil 4.12).

Sonuçlar, hem RAW264.7 makrofaj hücrelerinin hem de Thp-1 monositik hücre hatlarının AdGFP vektörleriyle başarılı bir şekilde transdükte edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.12. Thp-1 insan monositik hücre hatlarının AdGFP ile transdüksiyonu. BF: Bright Field (Aydınlık alan), GFP: Yeşil Floresan Protein. Hücreler farklı objektif büyütmeleri kullanılarak görüntülenmiştir (10X, 20X, 40X). 10^3 ve 10^4 ile belirtilen sayılar kuyu başına eklenen virüs dozları olup birimi viral partiküldür. Yeşil ışımalar pozitif floresan protein varlığını temsil eder.

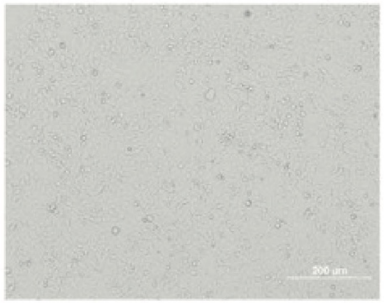
4.8. Adenoviral Vektörlerin Plak Testi ile Saflaştırılması

Adenoviral vektörlerin homojen bir popülasyonunu elde etmek ve yüksek enfektiviteye sahip virüs stokları üretmek üzere saflaştırılması ve titrelerinin belirlenmesi amacıyla plak testi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 293A hücreleri, kuyu başına 10^6 hücre olacak şekilde sayılarak 6-kuyucuklu hücre kültür petrilerine ekildi (Gün 0). Hücreler ertesi gün %100 yoğunluğa ulaştığında, Ad5Spike vektörlerinin 10-kat seri dilüsyonlarıyla transdükte edildi (Gün 1). Transdüksiyondan 72 saat sonra hücrelerde sitopatik etki oluşumunun başladığı gözlemlendi (Gün 4). 7. günde hücrelerin virüs ürettiği için hücre içi basıncının arttığı ve hücrelerin dış yüzeylerinin pürüzsüz, yuvarlak şekilde olduğu görüldü. 10. günde plaklar çıplak gözle görünebilmekteydi. Oluşan bağımsız plaklar seçilerek başka bir 6-kuyucuklu petrideki 293A hücrelerine transdükte edildi (Şekil 4.13). Bu şekilde elde edilen saf virüs stoğu daha önce açıklandığı şekilde çoğaltılarak hayvan gruplarını aşılamada kullanıldı.

Sonuçlar, 10. günde oluşan plakların çıplak gözle görülebilir hale geldiğini ve bağımsız plakların seçilerek 293A hücrelerine transdükte edilmesinin, adenoviral vektörlerin başarılı bir şekilde saflaştırılmasını sağladığını göstermektedir. Bu bulgular, virüslerin homojen bir popülasyonunu elde etmek ve yüksek enfektiviteye sahip virüs stokları üretmek için plak yönteminin kullanılabileceğini göstermektedir.

Gün 0

6 kuyulu hücre kültür petrilerine 10^6 293A hücreleri sayılarak ekildi.

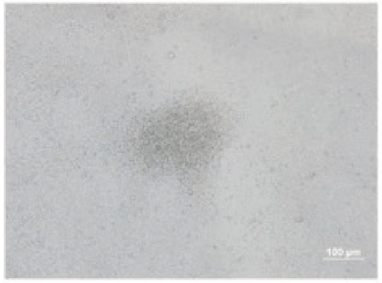


Gün 1

293A hücrelerinin yoğunluğu %90-100'e ulaştığında transdüksiyon gerçekleştirildi.

Gün 4

Sitopatik etki ilk kez transdüksiyondan 3 gün sonra gözlemlendi.



Gün 7

Hücre içi basıncın artmasıyla hücreler yuvarlak morfoloji aldı.

Gün 10

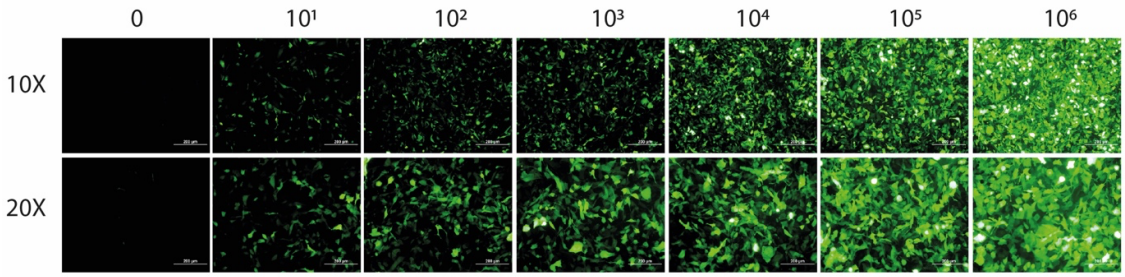
Plaklar gözle görünür büyüklüğe ulaştığında seçim yapıldı ve 293A hücrelerine aktarıldı.

Şekil 4.13. Günlere göre plak oluşum çizelgesi.

4.9. Plak Testi Sonrası Adenoviral Kontrol Vektörlerinin Titresinin Belirlenmesi ve Protein Sentezi Tayini

Plak testi sonrası titrasyonu belirlemek için absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Plak testi sonrası saflaştırılan adenoviral stoklar 10 mM Tris-Cl solüsyonu ile 1:20 ve 1:50 oranında dilüe edildi ve 260 nanometre dalga boyunda absorbans değerleri Thermo Multiscan Spektrofotometre cihazı kullanılarak okundu. Her iki dilüsyonun OD_{260} sonucunun ortalaması alınarak yapılan hesaplama ile plak testi sonrası AdGFP vektörünün titresi $3,4x10^{12}$ viral partikül/ml olarak bulundu (1 OD_{260}: $1,1x10^{12}$ partikül sayısı).

Plak testi sonrası çoğaltılıp saflaştırılan AdGFP vektöründen floresan proteini ekspresyonunun doğrulanması için ise HT1080 hücreleri AdGFP ile transdükte edildi. Transdüksiyondan 72 saat sonra hücreler uygun kanalda görüntülendi. Sonuçlara göre, kontrol hücrelerinde floresan ışımaya rastlanmazken, AdGFP ile transdükte edilen hücrelerde artan transdüksiyon oranlarında artan seviyelerde yeşil floresan ışıması gözlendi (Şekil 4.14). Bu bulgular, yeşil floresan proteini kodlayan adenoviral kontrol vektörlerin başarıyla saflaştırıldığını ve taşıdığı transgenin hücrelerde eksprese edilebildiğini göstermektedir.



Şekil 4.14. HT1080 hücre hattında yeşil floresan protein ekspresyonu. Hücreler, GFP kodlayan birinci nesil adenoviral vektörler ile kuyu başına 10^1, 10^2, 10^3, 10^4,10^5 ve 10^6 virüs partikülü olacak şekilde transdükte edildi. 0, deney kontrolü olarak virüs ile transdükte edilmemiş hücreleri temsil etmektedir. Yeşil ışımalar, yeşil floresan proteini ekspresyonunu ifade eder.

4.10. Sephadex G-50 Kolonları ile Adenoviral Aşı Vektörleri Sezyum Klorürden Arındırılması

Sezyum klorür (CsCl), viral vektörlerin saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılır, ancak toksik olduğu için canlı organizmalara uygulanmadan önce tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir. Adenoviral aşı vektörlerinin toksik CsCl içermeyen bir formda hayvanlara güvenle enjekte edilebilmesi amacıyla vektörler Sephadex G-50 kolonlarından geçirildi. Metot kısmında belirtildiği şekilde hazırlanan kolonlardan geçirilen virüsler, temiz tüplerde toplanarak CsCl'den arındırıldı ve enjeksiyona hazır hale getirildi. Elde edilen saf virüs stokları, kullanıma kadar -80°C'de saklandı.

4.11. Deney Hayvanlarının Aşılanması

Bu çalışmada, adenovirüs aracılı Spike aşısının etkinliğini değerlendirmek amacıyla 6 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Fareler, her grupta 5 hayvan olmak üzere beş farklı gruba ayrıldı:

1. Aşı Grupları:
    - Grup 1: 10^8 viral partikül dozunda Ad5Spike ile aşılandı.
    - Grup 2: 10^{10} viral partikül dozunda Ad5Spike ile aşılandı.
    - Grup 3: 10^{12} viral partikül dozunda Ad5Spike ile aşılandı.
2. Kontrol Grupları:
    - Grup 4: 10^{12} viral partikül dozunda AdGFP ile aşılandı (vektör kontrolü).
    - Grup 5: 1X PBS ile aşılandı (negatif kontrol).

Aşılar, intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle uygulandı. Aşılamadan sonra, farelerin bağışıklık yanıtları ve sitokin salınımı incelendi. 30 ve 90 gün sonra fareler sakrifiye edilerek kan serumları ve dalak hücreleri toplandı. Bu numuneler, ELISpot analizi ile IFN-γ, TNF-α ve IL-2 gibi önemli sitokinlerin salınımı açısından değerlendirildi. Bu

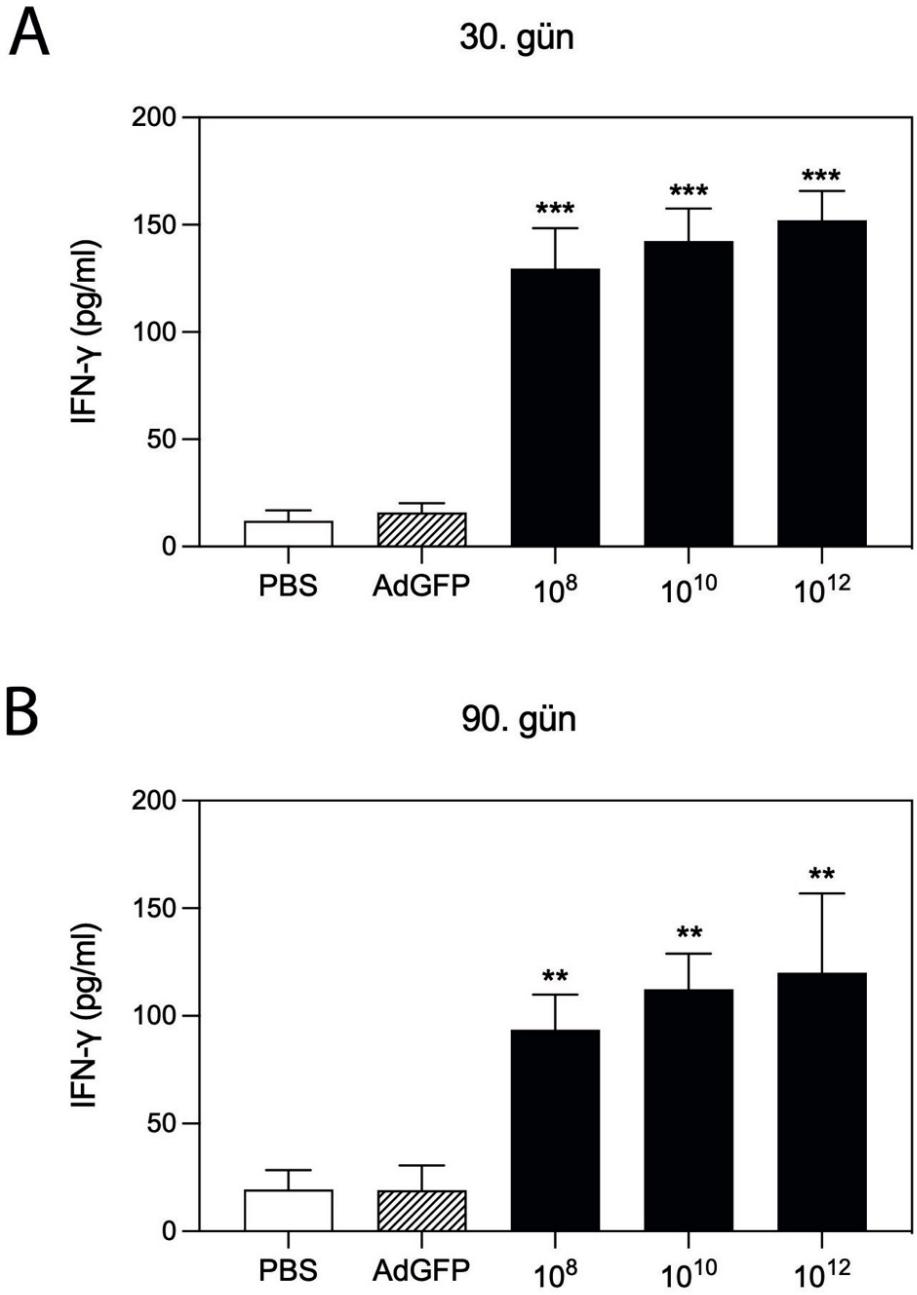
düzenleme, farklı dozlarda aşılanan farelerin ve kontrol gruplarının bağışıklık yanıtlarının kıyaslanabilmesini sağladı.

4.11.1. Efektör T Hücre Yanıtının ELISA Yöntemiyle Değerlendirilmesi

Aşılama sonucu gelişen koruyucu T hücre yanıtının değerlendirilmesi amacıyla, IFN-γ, TNF-α ve IL-2 sitokinlerinin salınımıyla karakterize Th1 sitokin profili taşıyan CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin aktivasyonu incelendi. Bu bağlamda, IFN-γ'nin önemli bir immün modülatör olması ve antijen spesifik immün yanıtların belirlenmesinde kritik bir gösterge olması nedeniyle, Ad5Spike adenoviral tabanlı COVID-19 aşısının etkinliğini değerlendirmek üzere farelerden alınan splenositlerin IFN-γ salınımı ölçüldü.

Aşılanan fareler sakrifiye edildikten sonra dalaklarından tek hücreli süspansiyon hazırlandı. Splenositler spike peptidi ile uyarıldı ve 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Süpernatant toplandı ve IFN-γ miktarı Mouse ELISA Kit kullanılarak analiz edildi (Şekil 4.15).

Ad5Spike adenoviral tabanlı COVID-19 aşısının etkinliği, aşılanan dişi BALB/c farelerden alınan splenositlerden IFN-γ salınımı ölçülerek değerlendirildi. Hem 30 hem de 90. günde, her üç dozda Ad5Spike ile aşılanan farelerden alınan splenositlerin süpernatantındaki IFN-γ seviyesinin kontrol gruplarındaki (1X PBS ve AdGFP ile aşılanan) IFN-γ seviyesinden bariz bir şekilde yüksek olduğu belirlendi. Dozlar arasında fark belirlenmedi. Bu sonuçlar, Ad5Spike aşısının IFN-γ üretimini anlamlı derecede artırdığını gösterdi ($p<0,01$).



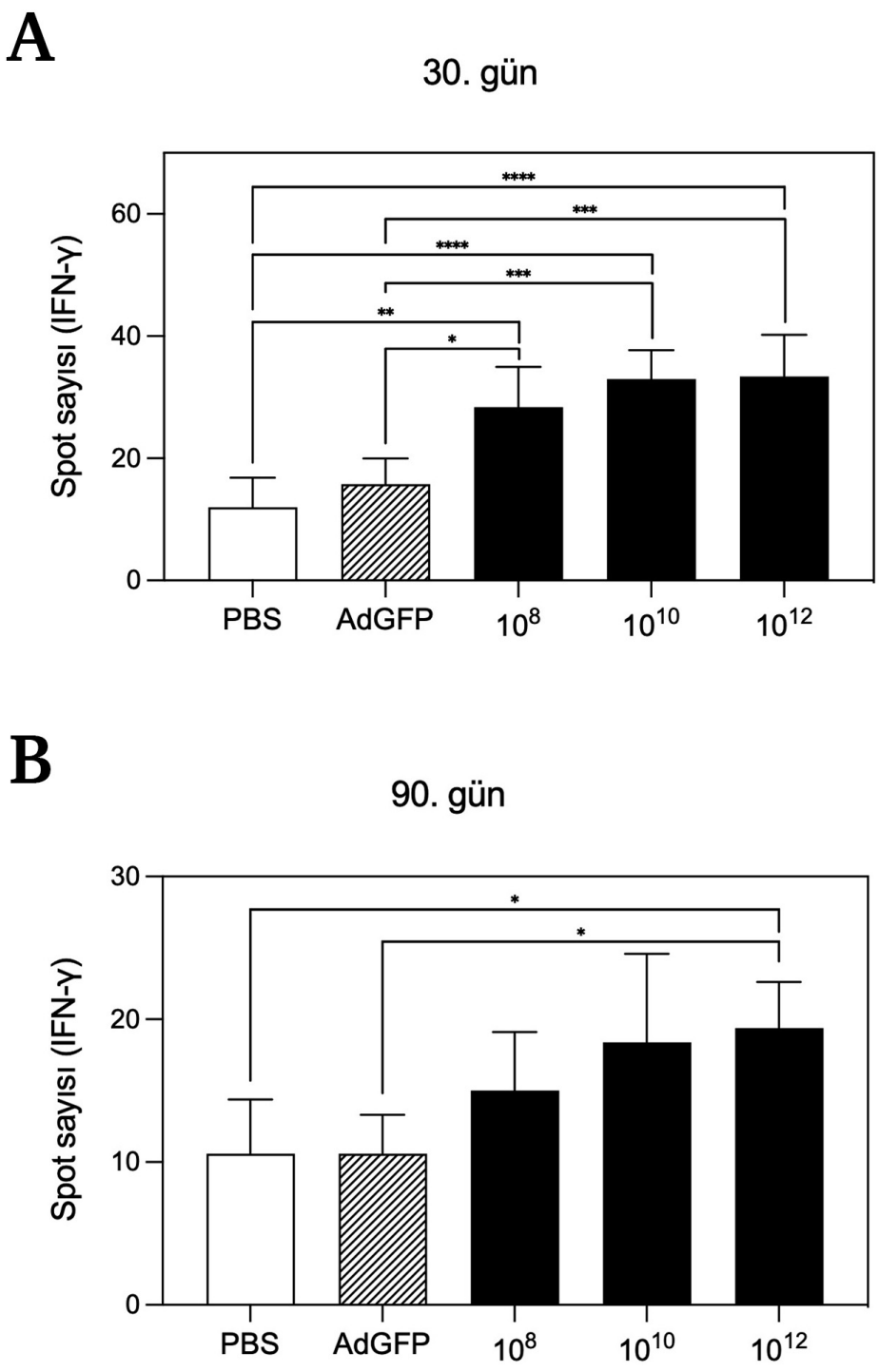
Şekil 4.15. Ad5Spike aşı vektörü ile intraperitoneal olarak aşılanmış farelerden alınan kan serumlarında gerçekleştirilen IFN-γ ELISA analizi. A. Enjeksiyondan 30 gün sonra gerçekleştirilen ELISA analizi. B. Enjeksiyondan 90 gün sonra gerçekleştirilen ELISA sonuçlarını temsil etmektedir. (Gruplar n=5; *p<0,01 One-way ANOVA)

4.11.2. Adenoviral Aşı Vektörünün IFN- γ Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Değerlendirilmesi

IFN-γ, güçlü bir antiviral yanıtın göstergesi olduğu için özellikle önemli bir sitokindir ve T hücrelerinin aktivasyonunu ve bağışıklık sisteminin virüslere karşı savunmasını değerlendirmek için kullanılır. Bu yüzden, aşılamadan 30 ve 90 gün sonra IFN-γ ELISpot analizi yapılarak, aşının T hücre yanıtını ne derece ve ne kadar süreyle sürdürebildiği incelendi.

Splenosit hücreleri, manyetik boncuklar kullanılarak T hücresi bakımından zenginleştirildi. Bu hücreler, sitokin salınımı açısından ELISpot analizi ile değerlendirildi. ELISpot bağışıklık hücrelerinin fonksiyonel kapasitesini değerlendiren hassas bir yöntemdir. Spotlar stereo mikroskobu altında sayıldı. Her bir spot, sitokin salgılayan bir hücreyi temsil eder (Şekil 4.16).

Aşılamadan 30 gün sonra, 10^{12} viral partikül/ml dozunda Ad5Spike ile aşılanmış farelerin splenositlerinden elde edilen süpernatantlarında IFN-γ salınımını yapan hücrelerin ortalaması, kontrol gruplarına kıyasla en yüksek seviyedeydi (Şekil 4.16-A). Benzer şekilde, 10^{8} ve 10^{10} dozlarında aşılanmış farelerde de IFN-γ salınımında belirgin bir artış gözlendi. Ancak, aşılamadan 90 gün sonra yapılan analizlerde, yalnızca en yüksek doz grubunda (10^{12} viral partikül/ml) koruyucu T hücre yanıtına rastlandı (Şekil 4.16-B). Dozlar arasında fark gözlemlenmedi. Bu bulgular, Ad5Spike aşısının özellikle yüksek dozlarının güçlü ve uzun süreli bir T hücre yanıtı oluşturduğunu göstermektedir.

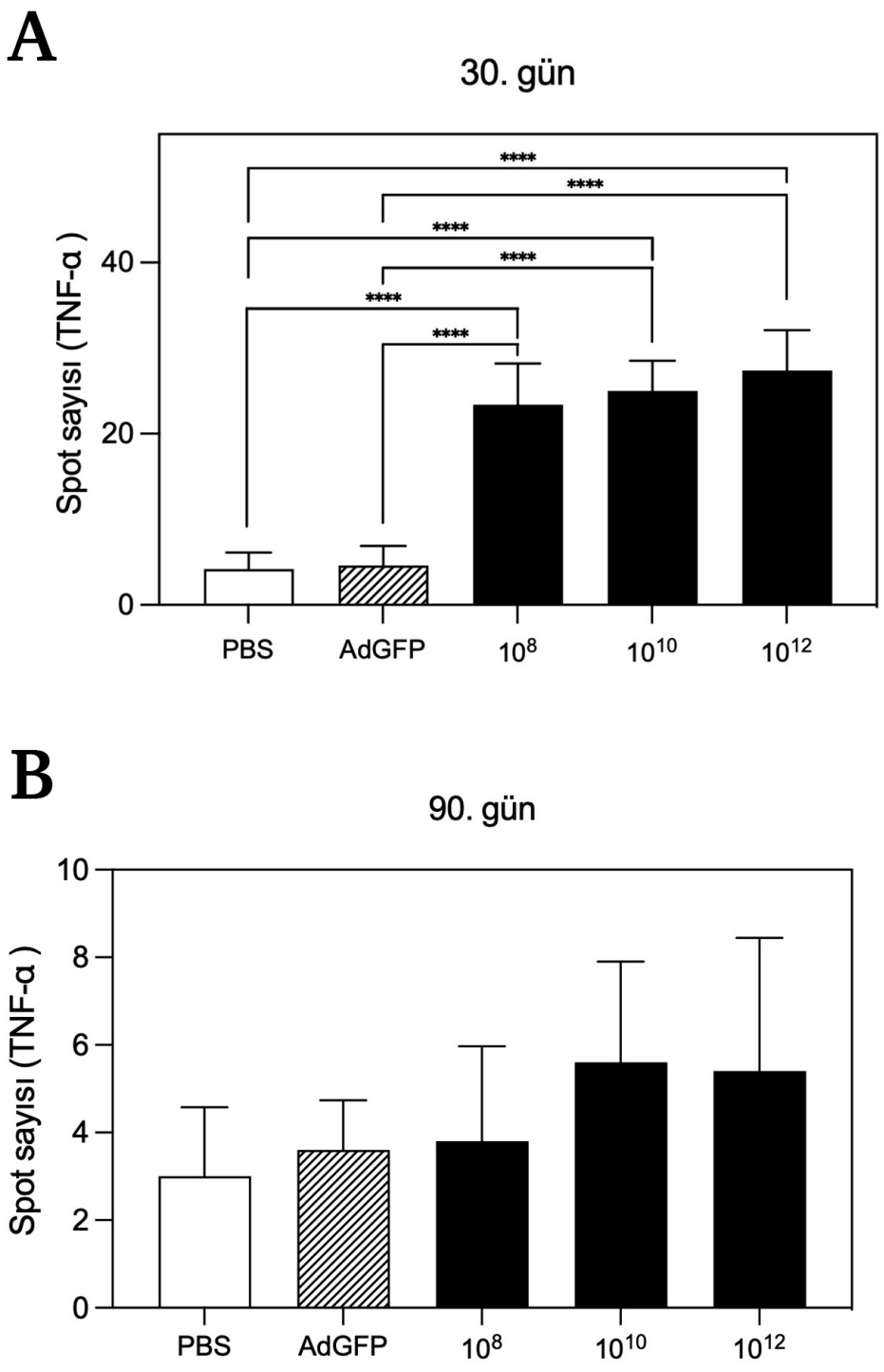


Şekil 4.16. Ad5Spike aşı vektörü ile intraperitoneal olarak aşılanmış farelerden alınan splenositlerde IFN-γ ELISpot analizi. A. Enjeksiyondan 30 gün sonra gerçekleştirilen ELISpot analizi. B. Enjeksiyondan 90 gün sonra gerçekleştirilen ELISpot sonuçlarını temsil etmektedir. (Gruplar *n*=5; *p<0,05, ***p=0,0001, ****p <0,0001Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi ve One-way ANOVA)

4.11.3. Adenoviral Aşı Vektörünün TNF-α Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Belirlenmesi

TNF-α, IFN-γ gibi, bağışıklık yanıtında kritik bir rol oynar, özellikle inflamasyon ve antiviral savunma mekanizmalarında etkilidir. Bu sitokinin aşılamadan sonraki salınım düzeyleri, aşının bağışıklık sistemini nasıl etkilediğini ve bu etkinin ne kadar sürdüğünü anlamak için önemlidir. Bunu anlamak için, adenovirüs aracılı Spike aşısı ile aşılamadan 30 ve 90 gün sonra farelerden toplanan splenositlerde ELISpot analizi gerçekleştirildi. Aşılanan dişi BALB/c farelerin splenosit hücreleri, T hücresi bakımından zenginleştirildi ve sitokin salınımı açısından ELISpot analizi ile değerlendirildi (Şekil 4.17).

Aşılanan farelerin splenositlerinden 30 gün sonra yapılan TNF-α ELISpot analizi sonuçlarına göre, adenovirüs tabanlı Spike gen nakli yapılan tüm doz gruplarında kontrol gruplarına göre (1X PBS ve AdGFP enjekte edilen gruplar) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek TNF-α salınımı sergiledi. Dozlar arasında fark görülmedi. Bu bulgu, aşılamanın erken dönemde güçlü bir inflamatuar yanıt oluşturduğunu göstermektedir. Ancak, 90 gün sonra yapılan analizlerde, Ad5Spike aşı grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel olarak bariz bir fark gözlenmedi (Şekil 4.17). Bu bulgular, Ad5Spike aşısının 30 günde güçlü bir TNF-α yanıtını tetiklediğini ancak bu etkinin zaman içinde azaldığını ortaya koymaktadır.

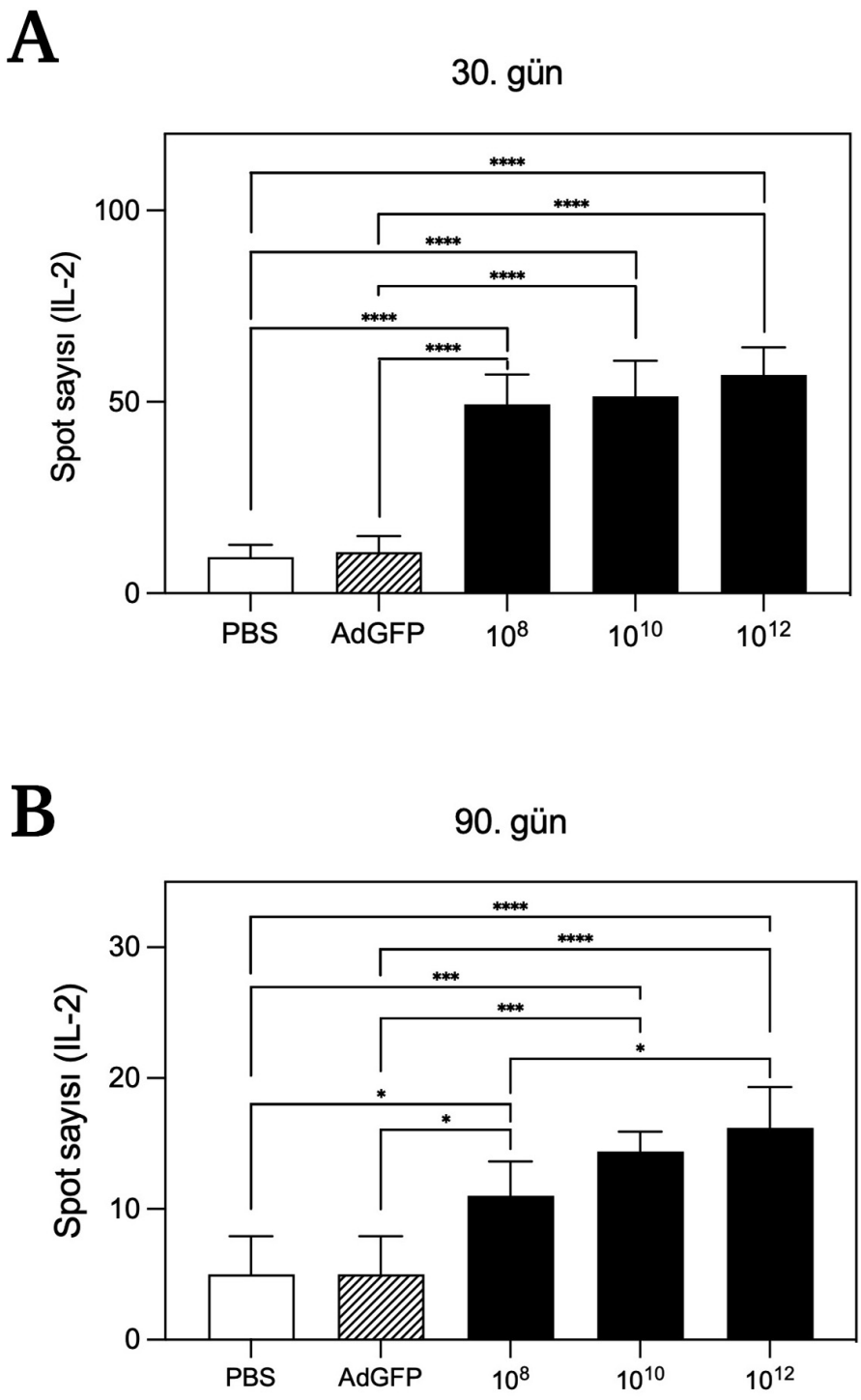


Şekil 4.17. Aşılanan farelerden alınan splenositlerden 30 gün (A) ve 90 gün (B) sonra gerçekleştirilen TNF-α ELISpot analizi. (Gruplar *n*=5; ****p<0,0001 One-way ANOVA ve Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi)

4.11.4. Adenoviral Aşı Vektörünün IL-2 Salınımına Etkisinin ELISpot Yöntemiyle Değerlendirilmesi

IL-2, T hücrelerinin büyümesi ve aktivasyonu için kritik bir sitokindir. Aşının IL-2 salınımını artırması, bağışıklık sisteminin aşıya karşı güçlü ve sürdürülebilir bir yanıt geliştirdiğinin göstergesidir. Bu nedenle, aşılamadan sonra IL-2 seviyelerinin izlenmesi, aşının etkinliğini ve koruyucu potansiyelini anlamak açısından önemlidir. Adenovirüs aracılı Spike aşısı ile aşılanan farelerde bağışıklık yanıtının kısa ve uzun vadeli etkinliğini değerlendirmek amacıyla IL-2 ELISpot analizi gerçekleştirildi. Aşılanan dişi BALB/c farelerin splenosit hücreleri, T hücresi bakımından zenginleştirildi ve sitokin salınımı açısından ELISpot analizi ile değerlendirildi. Her bir spot, IL-2 salgılayan bir hücreyi temsil eder. Spotlar diseksiyon mikroskobu altında sayılarak analiz edildi (Şekil 4.18).

Farklı dozlarda uygulanan adenoviral tabanlı aşı vektörleriyle aşılamadan 30 ve 90 gün sonra splenositlerle yapılan IL-2 sitokin salınım testine göre, her iki zaman diliminde de (30 ve 90 gün) tüm doz seviyelerinde (10^8, 10^{10} ve 10^{12}), kontrol gruplarına (1X PBS ve AdGFP) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek IL-2 salınımı gözlendi (Şekil 4.18). Bu bulgular, aşının güçlü bir T hücre yanıtı oluşturduğunu ve bu etkinin 90 gün sonrasında bile sürdüğünü göstermektedir.

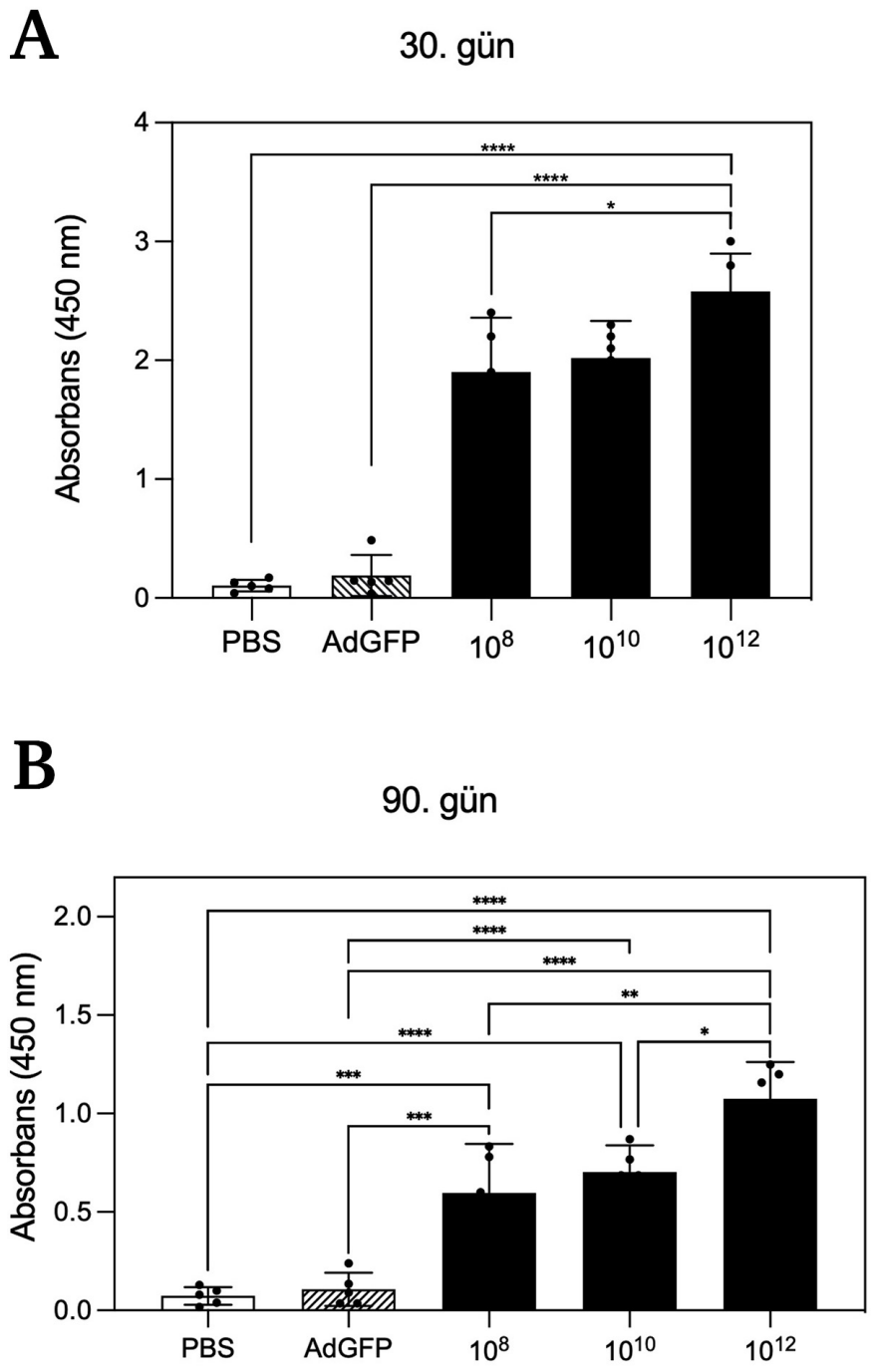


Şekil 4.18. Aşılanan farelerden alınan splenositlerden 30 gün (A) ve 90 gün (B) sonra IL-2 ELISpot analizi. (Gruplar *n*=5; *p<0,05 One-way ANOVA ve Tukey Çoklu Karşılaştırma)

4.12. Geliştirilen Ad5Spike Aşı Vektörünün Farelerde Spike Spesifik IgG Antikor Yanıtı Oluşumuna Etkisi

IgG antikorlarının varlığı, aşının hümoral bağışıklık sistemini uyarmadaki başarısını ve virüse karşı potansiyel koruma sağlayıp sağlamadığını gösterir. Geliştirilen Ad5Spike aşı vektörünün dişi BALB/c farelerde spesifik IgG antikor yanıtını indükleyip indüklemediğini ve aşı dozlarının bu yanıt üzerindeki etkilerini değerlendirmek amacıyla sakrifiye edilen hayvanların kan serumlarından IgG ELISA yapıldı. Aşılanan gruplar 30 ve 90. günlerde incelendi ve serumlarının absorbans değerleri kıyaslandı. Çalışmada, farklı dozlarda (10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül) aşılanan farelerin serumları analiz edilerek kontrol gruplarıyla karşılaştırıldı (Şekil 4.19).

30 ve 90. günlerde 10^{12} viral partiküllle aşılanan gruptaki kan serumlarının absorbans değerleri, diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Şekil 4.19). 90. günde, 10^{12} viral partikül aşı test grubunun IgG antikor OD_{450} değeri, diğer doz gruplarına göre önemli ölçüde daha yüksekti (Şekil 4.19-B). Bu sonuçlar, Ad5Spike ile intraperitoneal aşılamanın dişi BALB/c farelerde IgG antikor üretimini güçlü bir şekilde artırdığını ve aşının hümoral bağışıklık sistemini uyarmada başarılı olduğunu göstermektedir.

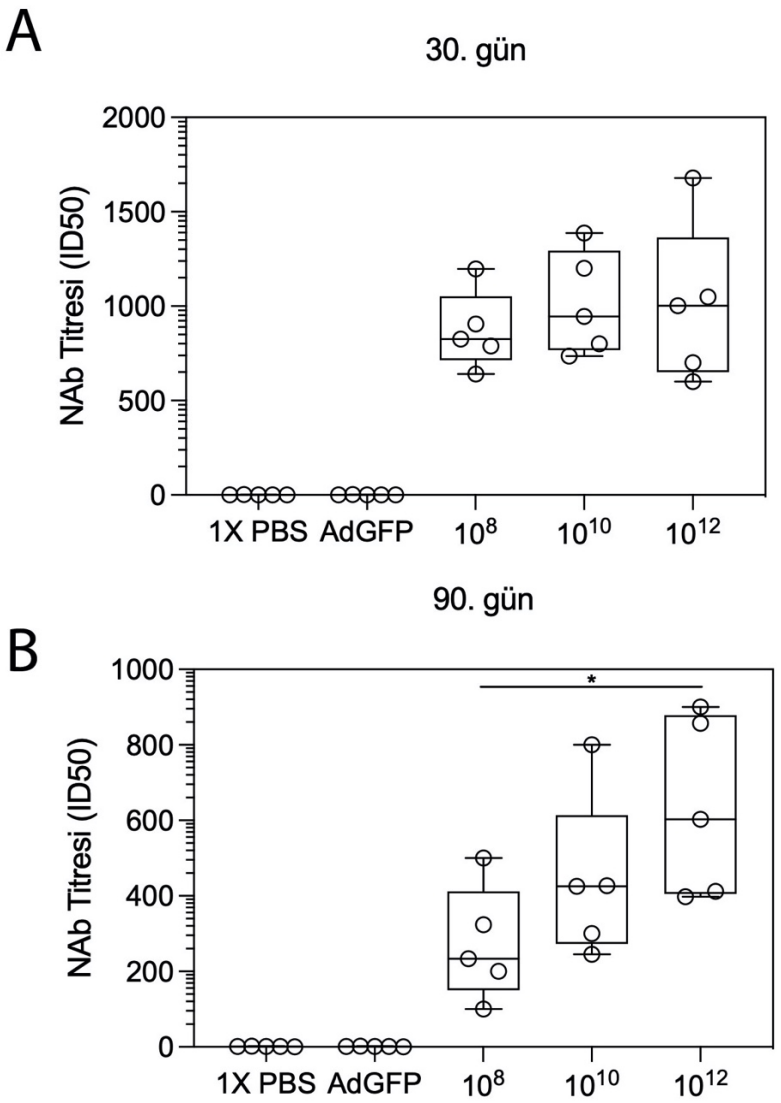


Şekil 4.19. Adenoviral aşı vektörleriyle aşılanan dişi BALB/c fare serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titresi. A. Aşılamadan 30 gün sonra 10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül ile aşılanan ve kontrol grubu farelerinin serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titreleri. B. Aşılamadan 90 gün sonra 10^8, 10^{10} ve 10^{12} viral partikül ile aşılanan ve kontrol grubu farelerinin serumlarındaki anti-spike protein IgG antikor titreleri (Deney grupları n=5; *p<0,05 Two Way ANOVA ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi)

4.13. Aşı Sonrası Nötralize Edici Antikor Düzeyinin Tespiti

Aşılama sonrası farelerde gelişen T ve B hücre yanıtlarının değerlendirilmesinin ardından, aşının olası bir bulaş karşısında koruyuculuğunu test etmek amacıyla kan serumlarındaki nötralize edici antikor düzeylerini ölçmek üzere nötralizasyon testi gerçekleştirildi. Canlı SARS-CoV-2 virüsü gibi yüksek riskli patojenlerle çalışmak tehlikelidir ve BSL-3 (Biyogüvenlik Seviyesi 3) laboratuvarları gerektirir. Bu nedenle, nötralizasyon testinde BSL-2 seviye laboratuvarda da çalışılabilecek olan SARS-CoV-2 spike proteini ile psödotiplendirilmiş lentivirüsler kullanıldı. Deneyde, RFP geni taşıyan transfer vektörü, gag-pol, rev ve virüs zarfı için SARS-CoV-2 Spike kodlayan plazmidlerle beraber 293T hücrelerine transfekte edilerek SARS-CoV-2 spike proteini ile psödotiplendirilmiş 3. jenerasyon lentivirüsler (LentiRFPSpike) kendi laboratuvarımızda başarılı bir şekilde oluşturuldu. 293T hücreleri artan oranlarda (0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 MOI) LentiRFPSpike ile transdükte edildi ve hücreleri %100'e yakın enfekte eden minimum doz 5 MOI olarak belirlendi. Ardından, aşılanmış farelerden elde edilen farklı dilüsyonlardaki serumlar, 5 MOI LentiRFPSpike ile 1 saat inkübe edildi. Daha sonra 293T hücrelerine verildi ve enfeksiyondan 72 saat sonra floresan mikroskopta RFP ışımalarına bakılarak transdüksiyonda bir azalma olup olmadığı belirlendi. Bunun için %50 inhibisyon dilüsyonu (ID50) hesaplandı (Şekil 4.20).

Aşılamadan 30 ve 90 gün sonra toplanan kan serumlarıyla gerçekleştirilen nötralizasyon analizinde farklı dozlarda (10^8, 10^{10} ve 10^{12}) Ad5Spike vektörü ile aşılanan grupların nötralize edici antikor seviyelerinin, kontrol gruplarına (1X PBS, AdGFP) göre oldukça yüksek düzeyde olduğu görüldü. Ancak 30. günde dozlar arasında (10^8, 10^{10} ve 10^{12}) istatistiksel olarak bir fark belirlenmese de 10^{12} dozunda görülen nötralize edici antikor yanıtı, 10^8 doz aşılanan gruba göre 2,3 kat, 10^{10} doz aşılanan gruba göre ise 1,4 kat daha yüksek olarak hesaplandı. Aşılamadan 90 gün sonra yapılan analizlerde ise 10^8 doz grubu ile 10^{10} doz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmezken, 10^{12} doz grubu diğer gruplardan yaklaşık 1,15 kat daha fazla nötralize edici antikor yanıtı göstermiştir. Bu sonuçlar, özellikle 10^{12} viral partikül Ad5Spike ile intraperitoneal aşılamanın dişi BALB/c farelerde nötralize edici antikor yanıtını indüklemede ve 90 gün sonra bile olası virüs bulaşına karşı korumada etkin olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.20. Aşılamanın ardından 30. (A) ve 90. (B) günlerinde Wuhan-1 varyantı Spike proteinine karşı pseudovirüslerin nötralizasyonunun değerlendirilmesi. ID50 değerleri, aşılanmış farelerin belirli zaman dilimlerinde Wuhan-1 varyantını nötralize etme yeteneklerini yansıtmaktadır. Hata barları ID50 titrelerinin %95 güven aralıklarını göstermektedir. (Deney grupları n=5; *p<0,05 One-way ANOVA)

5. TARTIŞMA

21. yüzyıldaki tüm koronavirüs salgınları (2002'de SARS, 2012'de MERS ve 2019'da COVID-19) dikkate alındığında, gelecekte de benzer salgınların ortaya çıkma ihtimalinin yüksek olduğu varsayılabilir (Aleebrahim-Dehkordi ve ark., 2021). Dolayısıyla, salgınların kontrol altına alınabilmesi için güvenli ve etkili bir aşının hızla geliştirilmesine ihtiyaç vardır. İdeal bir aşı, geniş koruma sağlamalı ve farklı popülasyonlarda güvenli ve etkili olmalıdır; bağışıklık hücrelerini hızlı bir şekilde uyarabilmeli ve minimum yan etki ile uzun süreli koruma sağlayacak güçlü bir bağışıklık yanıtı oluşturmalıdır. Ayrıca kolay üretilebilmeli, dağıtılabilmeli ve saklanabilmelidir (Carneiro ve ark., 2021).

Aşı başvuru sahiplerinin, FDA ve DSÖ tarafından belirlenen gerekliliklere uyum sağlamak için, en az üç aşamalı plasebo kontrollü klinik denemelerde aşılarının koruma ve etkinlik testlerinden geçmeleri gerekmektedir. Bu aşamaların tamamlanması zaman alabilir. Küresel ekonomik kısıtlamalar nedeniyle, bağışıklamanın hızla artırılması önemlidir. Bazı uzmanlar, kontrollü insan deneylerinin Faz 3 çalışmalarını hızlandırarak aşıların daha hızlı lisanslanabileceğini öne sürmektedir. Ancak, aşının uzun vadeli etkileri yine de geniş katılımcı grupları üzerinde test edilmelidir (Klemeš ve ark., 2021). Ayrıca, nadir gruplar, bebekler, hamile kadınlar ve bağışıklığı baskılanmış hastalar için koruma denemesi genişletilmeden önce bu gruplara yönelik aşılama yapılabilir. Güvenli ve etkili antikorlar, hayvan modelleri üzerinde test edilerek değerlendirilmektedir ve teşvik edilmektedir (Bao ve ark., 2020).

Geleneksel aşıların geliştirilmesi ve üretimi hakkında geniş bir bilgi birikimi ve deneyimi olduğundan piyasaya ilk sürülen aşılar olma eğilimindedir. Ancak, viral vektör aşıları, modern teknolojinin önemli bir bileşeni olarak kabul edilir ve geleneksel aşı yöntemlerine kıyasla çeşitli avantajlar sunar (Brisse ve ark., 2020). Bu aşılar, genellikle virüslerin genetik mühendisliği yoluyla değiştirilmesiyle üretilir ve hedeflenen antijenleri hücrelere aktararak vücut bağışıklık sistemini uyarmak suretiyle hastalıklara karşı koruma sağlar. Bu yaklaşım, güçlü ve uzun süreli bağışıklık yanıtlarının tetiklenmesini sağlayarak, hastalıkla mücadelede etkili bir savunma mekanizması olarak karşımıza çıkar (Poria ve ark., 2024).

Adenovirüsler, yüksek transdüksiyon etkinliği ve transgen taşıma kapasitesiyle gen tedavisi alanında kullanılan ilk vektörlerdendir. Ancak, immünojenik olmaları gen ifadesinin genellikle geçici olmasına neden olur ve bu da genetik hastalıkların tedavisindeki kullanımlarını kısıtlar (Doerschug ve ark., 2002; Raper ve ark., 2003). Diğer taraftan, kolay manipülasyonları, yüksek titrede elde edilebilmeleri ve CD8+ T hücrelerini etkin bir şekilde aktive etme yetenekleri sayesinde aşı geliştirme ve kanser gen terapisi gibi uygulamalarda adenoviral vektörler sıklıkla tercih edilmektedir (Sanlioglu ve ark., 2006; Lee ve ark., 2017). Oxford-AstraZeneca'nın ChAdOx1-S (Meo ve ark., 2023), Johnson & Johnson'ın Ad26.COV2.S (Lewis ve ark., 2022) ve Rusya'nın Sputnik V (rAd26 ve rAd5) aşıları (Shkoda ve ark., 2022), adenoviral tabanlı aşılara örnek verilebilir. Bu aşılardan genel bilgilerde detaylıca bahsedilmiştir.

Bu tez projesi kapsamında ise Gateway® klonlama teknolojisinden faydalanılarak Wuhan-1 orijinal spike genini ifade eden insan adenovirüs serotip 5 aşı (Ad5Spike) geliştirilmesi amaçlandı. Daha sonra aşının COVID-19'a karşı etkinliğini ve uzun süreli koruyuculuğunu değerlendirmek için 6-8 haftalık BALB/c dişi fareler, farklı konsantrasyonlarda (10^8, 10^{10}, 10^{12}) tek doz Ad5Spike ile intraperitoneal olarak aşılandı. İmmünizasyondan 30 ve 90 gün sonra hücresel ve hümoral immün yanıtları ELISA ve ELISpot analizleriyle değerlendirildi. Aşı sonrası üretilen nötralize edici antikor miktarını ölçmek için ise psödovirüs nötralizasyon testi yapıldı.

Hümoral bağışıklıkla ilgili olarak, aşılanmış farelerin serumlarında yüksek seviyelerde spike spesifik IgG gözlendi. Dahası, aşılanan farelerin T hücrelerinden salınan IL-2, TNF-α ve IFN-γ sitokinlerinin seviyelerinde kontrol gruplarına kıyasla belirgin artışlar tespit edildi. Üçüncü jenerasyon lentiviral tabanlı bir psödovirüs kullanılarak gerçekleştirilen nötralizasyon testleri ile aşılanmış farelerin, özellikle yüksek doz gruplarında, SARS-CoV-2'ye karşı güçlü nötralize edici antikor yanıtı sergilediği belirlendi. Sonuçlar, Ad5Spike COVID-19 aşısının hücresel ve hümoral immüniteyi aktive etme yeteneğinin SARS-CoV-2'ye karşı etkili koruyucu bağışıklık sağlama potansiyelini destekler niteliktedir.

Proje kapsamında geliştirilen Ad5Spike aşısının mevcut adenoviral aşılara kıyasla çeşitli avantajlar sunma potansiyeli vardır. Tek doz uygulama, lojistik ve dağıtım açısından önemli bir avantaj sağlar. Özellikle aşı kampanyalarının hızlandırılması ve zor erişilen bölgelerde uygulanmasını kolaylaştırır. Ad5Spike aşısı, buzdolabı sıcaklığında (2-8°C) saklanabilir. Bu, aşıların dağıtımını ve depolanmasını kolaylaştırır, özellikle düşük ve orta gelirli ülkeler için büyük bir avantaj olabilir.Ad5Spike aşısı, güçlü bir hücresel bağışıklık yanıtı oluşturabilir. Bu, uzun süreli koruma sağlayabilir ve varyantlara karşı daha geniş bir koruma potansiyeli sunabilir.

Diğer taraftan Adenovirüs Serotip 5 kullanımı, birçok insanda bu serotipe karşı önceden mevcut bağışıklık olabileceğinden, aşının etkinliğini azaltabilir. İnsanlarda yaygın olan Ad5'e karşı var olan bağışıklık, vektörün etkinliğini düşürebilir ve yeterli bağışıklık yanıtı oluşmasını engelleyebilir. Yan etki sergileyebilir. Diğer adenoviral aşılar gibi geniş çaplı kullanım verileri ve uzun dönem takip çalışmaları Ad5Spike aşısının etkinliği ve güvenliğinin belirlenmesi için gereklidir.

Adenoviral vektör tabanlı COVID-19 aşıları, güçlü bağışıklık yanıtlarını uyarmak suretiyle hastalığa karşı etkili bir koruma sağlayabilir (Chavda ve ark., 2023). Ancak, bu aşıların kullanımında bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Özellikle, daha önce adenovirüslerle temas etmiş bireylerde bu virüslere karşı gelişen antikorlar, adenovirüs vektörlü aşıların etkinliğini azaltabilir veya engelleyebilir. Ayrıca, bazı kişilerin bağışıklık sistemi, aşının içeriğinde bulunan adenovirüs vektörüne karşı daha güçlü bir tepki verebilir. Böyle bir aşırı immün yanıt, istenmeyen yan etkilerin artmasına ve hatta kişinin aşıyı tolere edememesine yol açabilir.

Bu tür zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli stratejilerden yararlanılabilir (Thacker ve ark., 2009). Örneğin, insanlardan (Ad serotipleri-26 ve 5) ve şempanzelerden (insanlarda düşük seviyede antikor bulunduğu için, şempanze adenovirüsü ChAd serotipi Y25) izole edilerek oluşturulan farklı adenovirüs tipleri veya orijinleri tercih edilebilir (Coughlan, 2020). Vektör modifikasyonu da önemli bir stratejidir. Örneğin, vektörün dış kılıfını oluşturan kapsid proteinlerinin modifiye edilmesi veya genetik materyaline ek genler eklenmesiyle vektörün immün hücrelerden kaçışı sağlanabilir. Promotor bölgelerinin

değiştirilmesi veya optimize edilmesi, vektör tarafından taşınan genlerin hücrelerde daha etkili bir şekilde ifade edilmesini sağlayabilir. Adenovirüsün protein zincirlerinde yapılan değişiklikler, vektörün hücrelere bağlanma veya enfekte etme yeteneği iyileştirilebilir. Benzer şekilde, doz ayarlamaları ve uygulama stratejilerinin değerlendirilmesi, adenovirüs vektörlerinin aşı etkinliğini arttırabilir. Ayrıca, adenovirüs vektörlerinin güvenliği ve etkinliği üzerinde olumlu etkiler sağlayabilecek nanoteknoloji ve gen düzenleme teknikleri gibi yenilikçi biyoteknolojilerin kullanımı da önemlidir. Bu stratejiler, adenovirüs vektörlerinin kullanım potansiyelini artırarak, aşı geliştirme ve gen terapisi alanlarında daha etkili ve güvenli çözümler sunabilir (Bisgin ve ark., 2021).

Diğer taraftan, projede geliştirilen Ad5Spike aşısının hem hücresel hem de hümoral immün yanıtları uyardığı gösterilmiş olsa da bu yanıtların dengeli bir şekilde nasıl oluştuğu ve aşının uzun vadeli koruma sağlama potansiyeli üzerindeki etkisi daha fazla araştırma gerektirmektedir. Çalışmada farklı dozlarda aşılamanın immün yanıtlar üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Ancak, yüksek dozların uzun vadeli yan etkileri hakkında daha fazla bilgi edinmek önemlidir. Ayrıca, aşılanan farelerde gözlenen immün yanıtların, COVID-19'a karşı gerçek dünya koşullarında nasıl bir koruyucu etki sağlayabileceğini belirlemek için insan denemeleri ve epidemiyolojik verilere dayalı çalışmalar gereklidir. Benzer şekilde, aşının uzun vadeli bağışıklık yanıtlarını 90 gün boyunca izlenmiş olsa da aşının etkisinin ne kadar süreyle devam ettiğini değerlendirmek için daha uzun süreli izleme ve takip çalışmaları yapılması gerekmektedir. Aşının farklı virüs suşlarına karşı etkinliği ve tek dozun yeterli olup olmadığı gibi konular da dikkat edilmesi gereken diğer noktalardır. Bu tartışma noktaları, aşıların daha güvenli ve etkili hale gelmesine katkı sağlayabilir ve gelecekteki pandemik tehditlere karşı daha iyi hazırlanmamıza yardımcı olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak projemizde Wuhan-1 orijinal SARS-CoV-2 Spike proteinini kodlayan 1. nesil tip 5 adenoviral vektörler (Ad5Spike) oluşturuldu.

BALB/c farelerin Ad5Spike vektörü ile aşılanması IFN-gama sitokin salınımını ve sitokin salınımı yapan immün hücre sayısını hem 30. günde hem de 90. günde arttırdı.

Ad5Spike vektörü ile aşılanan farelerin, aşılamadan 30 gün sonra TNF-alfa sitokin salınımı yapan immün hücrelerin sayısını artırdı ancak bu yanıt 90 gün boyunca sürdürülemedi.

Ad5Spike ile aşılama BALB/c farelerde, özellikle yüksek doz grubunda, immün hücrelerden IL-2 sitokin salınımı önemli ölçüde arttırdı.

Ad5Spike adenoviral aşı vektörü ile aşılanma, her üç doz grubunda da yüksek düzeyde Spike spesifik IgG yanıtı oluşturdu.

Bunlara ek olarak, Spike psödotiplendirilmiş lentivirüs tabanlı virüs-benzeri partiküllerle gerçekleştirilen nötralizasyon analizleriyle, geliştirilen Ad5Spike aşısının olası virüs bulaşlarına karşı koruyucu olabileceğini gösterildi.

Bu tez çalışması, SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen Adenovirüs Serotip 5 vektörlü aşının etkinliğini deneysel olarak değerlendirmektedir. Wuhan-1 orijinal SARS-CoV-2 spike protein dizisi kullanılarak yapılan aşı, farelerde güçlü hümoral ve hücresel bağışıklık yanıtlarını tetiklemiştir. Bu sonuçlar, adenovirüs vektörlerinin potansiyelini ve enfeksiyonları önlemedeki rolünü vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, SARS-CoV-2'ye karşı etkili aşı geliştirme çabalarını desteklemekte ve gelecekteki diğer bulaşıcı hastalıklara karşı da aşı stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutmaktadır.

KAYNAKLAR

Adney DR, Wang L, van Doremalen N, Shi W, Zhang Y, Kong WP , ve ark. Efficacy of an adjuvanted middle east respiratory syndrome coronavirus spike protein vaccine in dromedary camels and alpacas. Viruses. 2019; 11.

Aleebrahim-Dehkordi E, Soveyzi F, Deravi N, Rabbani Z, Saghazadeh A, Rezaei N. Human coronaviruses sars-cov, mers-cov, and sars-cov-2 in children. J Pediatr Nurs. 2021; 56: 70-79.

Alsaadi EAJ, Neuman BW, Jones IM. A fusion peptide in the spike protein of mers coronavirus. Viruses. 2019; 11.

Andreas Greinacher TT, Theodore E. Warkentin et al. . A prothrombotic thrombocytopenic disorder resembling heparin-induced thrombocytopenia following coronavirus-19 vaccination. 07 April 2021.

Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R , ve ark. Efficacy and safety of the mrna-1273 sars-cov-2 vaccine. N Engl J Med. 2020.

Balakrishnan VS. The arrival of sputnik v. Lancet Infect Dis. 2020; 20: 1128.

Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L , ve ark. The pathogenicity of sars-cov-2 in hace2 transgenic mice. Nature. 2020; 583: 830-833.

Barteling SJ. Development and performance of inactivated vaccines against foot and mouth disease. Rev Sci Tech. 2002; 21: 577-588.

Bisgin A, Sanlioglu AD, Eksi YE, Griffith TS, Sanlioglu S. Current update on severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 vaccine development with a special emphasis on gene therapy viral vector design and construction for vaccination. Hum Gene Ther. 2021; 32: 541-562.

Brisse M, Vrba SM, Kirk N, Liang Y, Ly H. Emerging concepts and technologies in vaccine development. Front Immunol. 2020; 11: 583077.

Brunetti-Pierri N, Ng T, Iannitti D, Cioffi W, Stapleton G, Law M , ve ark. Transgene expression up to 7 years in nonhuman primates following hepatic transduction with helper-dependent adenoviral vectors. Hum Gene Ther. 2013; 24: 761-765.

Buchholz UJ, Bukreyev A, Yang L, Lamirande EW, Murphy BR, Subbarao K, Collins PL. Contributions of the structural proteins of severe acute respiratory syndrome

coronavirus to protective immunity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 9804-9809.

Cai Z, Kalkeri R, Zhu M, Cloney-Clark S, Haner B, Wang M , ve ark. A pseudovirus-based neutralization assay for sars-cov-2 variants: A rapid, cost-effective, bsl-2–based high-throughput assay useful for vaccine immunogenicity evaluation. Microorganisms. 2024; 12: 501.

Carneiro DC, Sousa JD, Monteiro-Cunha JP. The covid-19 vaccine development: A pandemic paradigm. Virus Res. 2021; 301: 198454.

Chavda VP, Bezbaruah R, Valu D, Patel B, Kumar A, Prasad S , ve ark. Adenoviral vector-based vaccine platform for covid-19: Current status. Vaccines (Basel). 2023; 11.

Chavda VP, Ghali E, Balar PC, Chauhan SC, Tiwari N, Shukla S , ve ark. Protein subunit vaccines: Promising frontiers against covid-19. J Control Release. 2024; 366: 761-782.

Chen Y, Lu S, Jia H, Deng Y, Zhou J, Huang B , ve ark. A novel neutralizing monoclonal antibody targeting the n-terminal domain of the mers-cov spike protein. Emerg Microbes Infect. 2017; 6: e60.

Coleman CM, Liu YV, Mu H, Taylor JK, Massare M, Flyer DC , ve ark. Purified coronavirus spike protein nanoparticles induce coronavirus neutralizing antibodies in mice. Vaccine. 2014; 32: 3169-3174.

Collisson EW, Pei J, Dzielawa J, Seo SH. Cytotoxic t lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. Dev Comp Immunol. 2000; 24: 187-200.

Coughlan L. Factors which contribute to the immunogenicity of non-replicating adenoviral vectored vaccines. Front Immunol. 2020; 11: 909.

Covid-19 protein subunit vaccine (novavax). In Mother to baby | fact sheets. Brentwood (TN): Organization of Teratology Information Specialists (OTIS)

Copyright by OTIS, May 2023.; 1994.

Croyle MA, Patel A, Tran KN, Gray M, Zhang Y, Strong JE , ve ark. Nasal delivery of an adenovirus-based vaccine bypasses pre-existing immunity to the vaccine carrier and improves the immune response in mice. PLoS One. 2008; 3: e3548.

Crystal RG. Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector. Hum Gene Ther. 2014; 25: 3-11.

Dirice E, Sanlioglu AD, Kahraman S, Ozturk S, Balci MK, Omer A , ve ark. Adenovirus-mediated trail gene (ad5htrail) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. Hum Gene Ther. 2009; 20: 1177-1189.

Doerschug K, Sanlioglu S, Flaherty DM, Wilson RL, Yarovinsky T, Monick MM , ve ark. First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. J Immunol. 2002; 169: 6539-6545.

Du L, He Y, Zhou Y, Liu S, Zheng BJ, Jiang S. The spike protein of sars-cov--a target for vaccine and therapeutic development. Nat Rev Microbiol. 2009; 7: 226-236.

Ehrhardt A, Xu H, Kay MA. Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. J Virol. 2003; 77: 7689-7695.

Ehrke-Schulz E, Zhang W, Schiwon M, Bergmann T, Solanki M, Liu J , ve ark. Cloning and large-scale production of high-capacity adenoviral vectors based on the human adenovirus type 5. J Vis Exp. 2016: e52894.

Escalera A, García-Sastre A, Aydillo T. Protocol to isolate and assess spike protein cleavage in sars-cov-2 variants obtained from clinical covid-19 samples. STAR Protoc. 2022; 3: 101502.

Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S , ve ark. Safety and immunogenicity of the chadox1 ncov-19 vaccine against sars-cov-2: A preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. Lancet. 2020; 396: 467-478.

Gordeychuk IV, Kozlovskaya LI, Siniugina AA, Yagovkina NV, Kuzubov VI, Zakharov KA , ve ark. Safety and immunogenicity of inactivated whole virion covid-19 vaccine covivac in clinical trials in 18-60 and 60+ age cohorts. Viruses. 2023; 15.

Greinacher A, Thiele T, Warkentin TE, Weisser K, Kyrle PA, Eichinger S. Thrombotic thrombocytopenia after chadox1 ncov-19 vaccination. N Engl J Med. 2021; 384: 2092-2101.

Guebre-Xabier M, Patel N, Tian JH, Zhou B, Maciejewski S, Lam K , ve ark. Nvx-cov2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against sars-cov-2 challenge. Vaccine. 2020; 38: 7892-7896.

Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ , ve ark. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (covid-19) outbreak - an update on the status. Mil Med Res. 2020; 7: 11.

Guzmán-Martínez O, Guardado K, de Guevara EL, Navarro S, Hernández C, Zenteno-Cuevas R, Montero H. Igg antibodies generation and side effects caused by ad5-ncov vaccine (cansino biologics) and bnt162b2 vaccine (pfizer/biontech) among mexican population. Vaccines (Basel). 2021; 9.

Halperin SA, Ye L, MacKinnon-Cameron D, Smith B, Cahn PE, Ruiz-Palacios GM , ve ark. Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: An international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet. 2022; 399: 237-248.

Hardt K, Vandebosch A, Sadoff J, Le Gars M, Truyers C, Lowson D , ve ark. Efficacy, safety, and immunogenicity of a booster regimen of ad26.Cov2.S vaccine against covid-19 (ensemble2): Results of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Infect Dis. 2022; 22: 1703-1715.

He Y, Zhou Y, Liu S, Kou Z, Li W, Farzan M, Jiang S. Receptor-binding domain of sars-cov spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: Implication for developing subunit vaccine. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 324: 773-781.

Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F , ve ark. Safety and efficacy of nvx-cov2373 covid-19 vaccine. N Engl J Med. 2021; 385: 1172-1183.

Hernández AF, Calina D, Poulas K, Docea AO, Tsatsakis AM. Safety of covid-19 vaccines administered in the eu: Should we be concerned? Toxicol Rep. 2021; 8: 871-879.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Kruger N, Herrler T, Erichsen S , ve ark. Sars-cov-2 cell entry depends on ace2 and tmprss2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell. 2020; 181: 271-280 e278.

https://data.who.int. (Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023). Retrieved from https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c

https://extranet.who.int/. (Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023). Retrieved from https://extranet.who.int/pqweb/vaccines/vaccinescovid-19-vaccine-eul-issued

https://link.springer.com. (Erişim Tarihi: 4 Mart 2024). Retrieved from https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-80356-7_8

https://www.aa.com.tr/. (Erişim Tarihi: 7 Eylül 2023). Retrieved from https://www.aa.com.tr/en/latest-on-coronavirus-outbreak/turkeys-domestic-covid-19-vaccine-turkovac-approved-for-emergency-use/2454638

https://www.thermofisher.com/. (Erişim Tarihi: 2 Haziran 2024). Retrieved from https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FDynabeadsUntouchedHumanCD4_TCells_man.pdf

Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y , ve ark. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in wuhan, china. Lancet. 2020; 395: 497-506.

Jackson LA, Anderson EJ, Rouphael NG, Roberts PC, Makhene M, Coler RN , ve ark. An mrna vaccine against sars-cov-2 - preliminary report. N Engl J Med. 2020; 383: 1920-1931.

Jahanafrooz Z, Baradaran B, Mosafer J, Hashemzaei M, Rezaei T, Mokhtarzadeh A, Hamblin MR. Comparison of DNA and mrna vaccines against cancer. Drug Discov Today. 2020; 25: 552-560.

Jiaming L, Yanfeng Y, Yao D, Yawei H, Linlin B, Baoying H , ve ark. The recombinant n-terminal domain of spike proteins is a potential vaccine against middle east respiratory syndrome coronavirus (mers-cov) infection. Vaccine. 2017; 35: 10-18.

Jin L, Li Z, Zhang X, Li J, Zhu F. Coronavac: A review of efficacy, safety, and immunogenicity of the inactivated vaccine against sars-cov-2. Hum Vaccin Immunother. 2022; 18: 2096970.

Kariko K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D. Incorporation of pseudouridine into mrna yields superior nonimmunogenic vector

with increased translational capacity and biological stability. Mol Ther. 2008; 16: 1833-1840.

Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG. Materials for non-viral intracellular delivery of messenger rna therapeutics. J Control Release. 2016; 240: 227-234.

Khalid K, Poh CL. The development of DNA vaccines against sars-cov-2. Adv Med Sci. 2023; 68: 213-226.

Kim TW, Lee JH, Hung CF, Peng S, Roden R, Wang MC , ve ark. Generation and characterization of DNA vaccines targeting the nucleocapsid protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Virol. 2004; 78: 4638-4645.

Klemeš JJ, Ullah S, Al-sehemı AG, Saqıb S, Gondal SMA, Saqıb S , ve ark. A review of the progress of covid-19 vaccine development. [COVID-19 Aşısı Geliştirme Süreci Üzerine Bir Değerlendirme]. Duzce Medical Journal. 2021; 23: 1-23.

Krammer F. Sars-cov-2 vaccines in development. Nature. 2020; 586: 516-527.

Krause A, Worgall S. Delivery of antigens by viral vectors for vaccination. Ther Deliv. 2011; 2: 51-70.

Krempl C, Schultze B, Laude H, Herrler G. Point mutations in the s protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. J Virol. 1997; 71: 3285-3287.

Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S , ve ark. Structure of the sars-cov-2 spike receptor-binding domain bound to the ace2 receptor. Nature. 2020.

Lan J, Yao Y, Deng Y, Chen H, Lu G, Wang W , ve ark. Recombinant receptor binding domain protein induces partial protective immunity in rhesus macaques against middle east respiratory syndrome coronavirus challenge. EBioMedicine. 2015; 2: 1438-1446.

Lee CS, Bishop ES, Zhang R, Yu X, Farina EM, Yan S , ve ark. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. Genes Dis. 2017; 4: 43-63.

Leung DT, Tam FC, Ma CH, Chan PK, Cheung JL, Niu H , ve ark. Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (sars) targets the viral nucleocapsid. J Infect Dis. 2004; 190: 379-386.

Lewis NM, Self WH, Gaglani M, Ginde AA, Douin DJ, Keipp Talbot H , ve ark. Effectiveness of the ad26.Cov2.S (johnson & johnson) coronavirus disease 2019 (covid-19) vaccine for preventing covid-19 hospitalizations and progression to high disease severity in the united states. Clin Infect Dis. 2022; 75: S159-s166.

Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. Annu Rev Virol. 2016; 3: 237-261.

Li J, Ulitzky L, Silberstein E, Taylor DR, Viscidi R. Immunogenicity and protection efficacy of monomeric and trimeric recombinant sars coronavirus spike protein subunit vaccine candidates. Viral Immunol. 2013; 26: 126-132.

Liang JG, Su D, Song TZ, Zeng Y, Huang W, Wu J , ve ark. S-trimer, a covid-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates. Nat Commun. 2021; 12: 1346.

Liu J, Sun Y, Qi J, Chu F, Wu H, Gao F , ve ark. The membrane protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus acts as a dominant immunogen revealed by a clustering region of novel functionally and structurally defined cytotoxic t-lymphocyte epitopes. J Infect Dis. 2010; 202: 1171-1180.

Liu L, Wei Q, Lin Q, Fang J, Wang H, Kwok H , ve ark. Anti-spike igg causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute sars-cov infection. JCI Insight. 2019; 4.

Liu MA. A comparison of plasmid DNA and mrna as vaccine technologies. Vaccines (Basel). 2019; 7.

Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS , ve ark. Safety and efficacy of an rad26 and rad5 vector-based heterologous prime-boost covid-19 vaccine: An interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in russia. Lancet. 2021; 397: 671-681.

Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS , ve ark. Safety and immunogenicity of an rad26 and rad5 vector-based heterologous prime-boost covid-19 vaccine in two formulations: Two open, non-randomised phase 1/2 studies from russia. Lancet. 2020; 396: 887-897.

Luo F, Liao FL, Wang H, Tang HB, Yang ZQ, Hou W. Evaluation of antibody-dependent enhancement of sars-cov infection in rhesus macaques immunized with an inactivated sars-cov vaccine. Virol Sin. 2018; 33: 201-204.

Mandal H. Achievements of the covid-19 turkey platform in vaccine and drug development with an approach of "co-creation and succeeding together". Turk J Med Sci. 2021; 51: 3139-3149.

McBride R, van Zyl M, Fielding BC. The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. Viruses. 2014; 6: 2991-3018.

McCann N, O'Connor D, Lambe T, Pollard AJ. Viral vector vaccines. Curr Opin Immunol. 2022; 77: 102210.

McCoy K, Tatsis N, Korioth-Schmitz B, Lasaro MO, Hensley SE, Lin SW , ve ark. Effect of preexisting immunity to adenovirus human serotype 5 antigens on the immune responses of nonhuman primates to vaccine regimens based on human- or chimpanzee-derived adenovirus vectors. J Virol. 2007; 81: 6594-6604.

Meo SA, Aftab S, Bayoumy NM, Meo AS. Efficacy of oxford-astrazeneca (chadox1 cov-19) vaccine against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (sars-cov-2) cases, hospital admissions, type of variants, and deaths. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2023; 27: 10133-10143.

Mercado NB, Zahn R, Wegmann F, Loos C, Chandrashekar A, Yu J , ve ark. Single-shot ad26 vaccine protects against sars-cov-2 in rhesus macaques. Nature. 2020; 586: 583-588.

Minor PD. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. Virology. 2015; 479-480: 379-392.

Moss B, Smith GL, Gerin JL, Purcell RH. Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis b. Nature. 1984; 311: 67-69.

Muthumani K, Falzarano D, Reuschel EL, Tingey C, Flingai S, Villarreal DO , ve ark. A synthetic consensus anti-spike protein DNA vaccine induces protective immunity against middle east respiratory syndrome coronavirus in nonhuman primates. Sci Transl Med. 2015; 7: 301ra132.

MUTLU E. Renal transplant hastalarinda bkv spesifi immü yanitin elispot yöntemi il ölçülmesi. Akdeniz University, 2014,

Neuman BW, Kiss G, Kunding AH, Bhella D, Baksh MF, Connelly S , ve ark. A structural analysis of m protein in coronavirus assembly and morphology. J Struct Biol. 2011; 174: 11-22.

Nieto-Torres JL, DeDiego ML, Verdia-Baguena C, Jimenez-Guardeno JM, Regla-Nava JA, Fernandez-Delgado R , ve ark. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel activity promotes virus fitness and pathogenesis. PLoS Pathog. 2014; 10: e1004077.

Nyon MP, Du L, Tseng CK, Seid CA, Pollet J, Naceanceno KS , ve ark. Engineering a stable cho cell line for the expression of a mers-coronavirus vaccine antigen. Vaccine. 2018; 36: 1853-1862.

Ozdarendeli A, Sezer Z, Pavel STI, Inal A, Yetiskin H, Kaplan B , ve ark. Safety and immunogenicity of an inactivated whole virion sars-cov-2 vaccine, turkovac, in healthy adults: Interim results from randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 and 2 trials. Vaccine. 2023; 41: 380-390.

Pallesen J, Wang N, Corbett KS, Wrapp D, Kirchdoerfer RN, Turner HL , ve ark. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion mers-cov spike antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017; 114: E7348-E7357.

Pang H, Liu Y, Han X, Xu Y, Jiang F, Wu D , ve ark. Protective humoral responses to severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus: Implications for the design of an effective protein-based vaccine. J Gen Virol. 2004; 85: 3109-3113.

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D. Mrna vaccines - a new era in vaccinology. Nat Rev Drug Discov. 2018; 17: 261-279.

Pavel STI, Yetiskin H, Uygut MA, Aslan AF, Aydın G, İnan Ö , ve ark. Development of an inactivated vaccine against sars cov-2. Vaccines (Basel). 2021; 9.

Phan T. Novel coronavirus: From discovery to clinical diagnostics. Infect Genet Evol. 2020; 79: 104211.

Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S , ve ark. Safety and efficacy of the bnt162b2 mrna covid-19 vaccine. N Engl J Med. 2020; 383: 2603-2615.

Poria R, Kala D, Nagraik R, Dhir Y, Dhir S, Singh B , ve ark. Vaccine development: Current trends and technologies. Life Sciences. 2024; 336: 122331.

Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP , ve ark. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab. 2003; 80: 148-158.

Remy V, Largeron N, Quilici S, Carroll S. The economic value of vaccination: Why prevention is wealth. Value Health. 2014; 17: A450.

Ricobaraza A, Gonzalez-Aparicio M, Mora-Jimenez L, Lumbreras S, Hernandez-Alcoceba R. High-capacity adenoviral vectors: Expanding the scope of gene therapy. Int J Mol Sci. 2020; 21.

Sadoff J, Gray G, Vandebosch A, Cárdenas V, Shukarev G, Grinsztejn B , ve ark. Safety and efficacy of single-dose ad26.Cov2.S vaccine against covid-19. N Engl J Med. 2021; 384: 2187-2201.

Sanlioglu AD, Koksal IT, Karacay B, Baykara M, Luleci G, Sanlioglu S. Adenovirus-mediated ikkbetaka expression sensitizes prostate carcinoma cells to trail-induced apoptosis. Cancer Gene Ther. 2006; 13: 21-31.

Sasso E, D'Alise AM, Zambrano N, Scarselli E, Folgori A, Nicosia A. New viral vectors for infectious diseases and cancer. Seminars in Immunology. 2020; 50: 101430.

Seo SH, Pei J, Briles WE, Dzielawa J, Collisson EW. Adoptive transfer of infectious bronchitis virus primed alphabeta t cells bearing cd8 antigen protects chicks from acute infection. Virology. 2000; 269: 183-189.

Sharma A, Krause A, Worgall S. Recent developments for pseudomonas vaccines. Hum Vaccin. 2011; 7: 999-1011.

Sharma R, Tiwari S, Dixit A. Covaxin: An overview of its immunogenicity and safety trials in india. Bioinformation. 2021; 17: 840-845.

Sharon D, Kamen A. Advancements in the design and scalable production of viral gene transfer vectors. Biotechnol Bioeng. 2018; 115: 25-40.

Shkoda AS, Gushchin VA, Ogarkova DA, Stavitskaya SV, Orlova OE, Kuznetsova NA , ve ark. Sputnik v effectiveness against hospitalization with covid-19 during omicron dominance. Vaccines (Basel). 2022; 10.

Singh S, Vedi S, Samrat SK, Li W, Kumar R, Agrawal B. Heterologous immunity between adenoviruses and hepatitis c virus: A new paradigm in hcv immunity and vaccines. PLoS One. 2016; 11: e0146404.

Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis b virus surface antigen. Nature. 1983; 302: 490-495.

Tan WG, Jin HT, West EE, Penaloza-MacMaster P, Wieland A, Zilliox MJ , ve ark. Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory cd8+ t cells induced by different adenovirus vectors. J Virol. 2013; 87: 1359-1372.

Tang X, Wu C, Li X, Song Y, Yao X, Wu X , ve ark. On the origin and continuing evolution of sars-cov-2. National Science Review. 2020.

Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. Mol Ther. 2004; 10: 616-629.

Teo SP. Review of covid-19 mrna vaccines: Bnt162b2 and mrna-1273. J Pharm Pract. 2022; 35: 947-951.

Thacker EE, Timares L, Matthews QL. Strategies to overcome host immunity to adenovirus vectors in vaccine development. Expert Rev Vaccines. 2009; 8: 761-777.

Tian JH, Patel N, Haupt R, Zhou H, Weston S, Hammond H , ve ark. Sars-cov-2 spike glycoprotein vaccine candidate nvx-cov2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. Nat Commun. 2021; 12: 372.

Van Doremalen N, Lambe T, Spencer A, Belij-Rammerstorfer S, Purushotham JN, Port JR , ve ark. Chadox1 ncov-19 vaccine prevents sars-cov-2 pneumonia in rhesus macaques. Nature. 2020; 586: 578-582.

Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK , ve ark. Safety and efficacy of the chadox1 ncov-19 vaccine (azd1222) against sars-cov-2: An interim analysis of four randomised controlled trials in brazil, south africa, and the uk. Lancet. 2020.

Voysey M, Costa Clemens SA, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK , ve ark. Single-dose administration and the influence of the timing of the booster dose on immunogenicity and efficacy of chadox1 ncov-19 (azd1222) vaccine: A pooled analysis of four randomised trials. Lancet. 2021; 397: 881-891.

Wang F, Wang Z, Tian H, Qi M, Zhai Z, Li S , ve ark. Biodistribution and safety assessment of bladder cancer specific recombinant oncolytic adenovirus in

subcutaneous xenografts tumor model in nude mice. Curr Gene Ther. 2012; 12: 67-76.

Wang Q, Zhang L, Kuwahara K, Li L, Liu Z, Li T , ve ark. Immunodominant sars coronavirus epitopes in humans elicited both enhancing and neutralizing effects on infection in non-human primates. ACS Infect Dis. 2016; 2: 361-376.

Wang SY, Liu WQ, Li YQ, Li JX, Zhu FC. A china-developed adenovirus vector-based covid-19 vaccine: Review of the development and application of ad5-ncov. Expert Rev Vaccines. 2023; 22: 704-713.

Wang Y, Tai W, Yang J, Zhao G, Sun S, Tseng CK , ve ark. Receptor-binding domain of mers-cov with optimal immunogen dosage and immunization interval protects human transgenic mice from mers-cov infection. Hum Vaccin Immunother. 2017; 13: 1615-1624.

Watanabe Y, Mendonça L, Allen ER, Howe A, Lee M, Allen JD , ve ark. Native-like sars-cov-2 spike glycoprotein expressed by chadox1 ncov-19/azd1222 vaccine. ACS Cent Sci. 2021; 7: 594-602.

Wei Q, Fan J, Liao J, Zou Y, Song D, Liu J , ve ark. Engineering the rapid adenovirus production and amplification (rapa) cell line to expedite the generation of recombinant adenoviruses. Cell Physiol Biochem. 2017; 41: 2383-2398.

Wen S, Schneider DB, Driscoll RM, Vassalli G, Sassani AB, Dichek DA. Second-generation adenoviral vectors do not prevent rapid loss of transgene expression and vector DNA from the arterial wall. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 1452-1458.

Woo PC, Lau SK, Tsoi HW, Chen ZW, Wong BH, Zhang L , ve ark. Sars coronavirus spike polypeptide DNA vaccine priming with recombinant spike polypeptide from escherichia coli as booster induces high titer of neutralizing antibody against sars coronavirus. Vaccine. 2005; 23: 4959-4968.

Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O , ve ark. Cryo-em structure of the 2019-ncov spike in the prefusion conformation. Science. 2020; 367: 1260-1263.

Xu Y, Yuen PW, Lam JK. Intranasal DNA vaccine for protection against respiratory infectious diseases: The delivery perspectives. Pharmaceutics. 2014; 6: 378-415.

Zakhartchouk AN, Sharon C, Satkunarajah M, Auperin T, Viswanathan S, Mutwiri G , ve ark. Immunogenicity of a receptor-binding domain of sars coronavirus spike protein in mice: Implications for a subunit vaccine. Vaccine. 2007; 25: 136-143.

Zhang J, Zeng H, Gu J, Li H, Zheng L, Zou Q. Progress and prospects on vaccine development against sars-cov-2. Vaccines (Basel). 2020a; 8.

Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K , ve ark. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated sars-cov-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. Lancet Infect Dis. 2020b.

Zhou Y, Jiang S, Du L. Prospects for a mers-cov spike vaccine. Expert Rev Vaccines. 2018; 17: 677-686.

Zhu FC, Li YH, Guan XH, Hou LH, Wang WJ, Li JX , ve ark. Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored covid-19 vaccine: A dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. Lancet. 2020; 395: 1845-1854.

Zhu X, Liu Q, Du L, Lu L, Jiang S. Receptor-binding domain as a target for developing sars vaccines. J Thorac Dis. 2013; 5 Suppl 2: S142-148.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fulya		
Soyadı	Erendor Cihan		

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lise	Mersin Hacı Sabancı Anadolu Lisesi	2011
Lisans	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2019
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2024

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (yıl-yıl)**
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi	2019-2024

Yabancı Dilleri	**Sınav türü**	**Puanı**
İngilizce	YÖKDİL (Sağlık)	82

Proje Deneyimi

Proje Adı	**Destekleyen kurum**	**Süre (Yıl-Yıl)**
Pankreasa Yönlendirilmiş Lentiviral Vektörlerle Insülin Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Belirlenmesi	TÜBİTAK	2016-2019

Tip 1 Diyabetik Deneklerde Lentivirus Aracılı Vazoaktif İntestinal Peptit Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi	BAP-AKDENİZ	2018-2021
Vazoaktif İntestinal Peptidin Amyotrofik Lateral Skleroz Mutasyonlu IPS Hücrelerinden Elde Edilen Motor Nöronlar Üzerindeki Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması	BAP-AKDENİZ	2018-2021
Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın Yeri ve Önemi	BAP-AKDENİZ	2019-2020
Lentivirus Aracılı Vazoaktif İntestinal Peptid Gen Naklinin Retinal Dejeneratif Hastalık Modelindeki Potansiyel Terapötik Etkinliği	TÜBİTAK	2019-2021
Doğal adjuvant etkili replikasyon özürlü adenovirus tabanlı SARS-CoV-2 Spike proteini kodlayan COVİD-19 aşısının geliştirilmesi	KOSGEB	2021-2023
Doğal adjuvant etkili 1. Jenerasyon insan Adenoviral vektör aracılı SARS COV-2 Spike gen naklinin pandemik koronavirüs hastalığına karşı (COVID19) gelişen hücresel ve hümoral bağışıklık yanıtının belirlenmesi	BAP-AKDENİZ	2021-2024
Tip 2 Diyabet ve Yeni Doğan Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Lentivirüs Aracılı GLP-1 Gen Naklinin Hücre Farklılaşması Üzerindeki Etki Mekanizmalarının Aydınlatılması	TÜSEB	2023-Devam ediyor

Burslar-Ödüller:

Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma Birincilik Ödülü, Lentivirus Mediated Pancreatic Beta-Cell-Specific Insulin Gene Therapy for STZ-Induced Diabetes, XVII. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi

Prof. Dr. Nazmi Özer Üçüncülük Bilim Ödülü 2022, Fulya Erendor, Tıbbi Biyokimya Derneği, Lentivirus Mediated Pancreatic Beta-Cell- Specific Insulin Gene Therapy for STZ-Induced Diabetes, 33. Ulusal Biyokimya Kongresi

Yayınlar:

Goksu A. Y., Kocanci F. G., Akinci E., Dora D. D., **Erendor F.**, Sanlioglu S., Uysal H., "Microglia Cells Treated with Synthetic Vasoactive Intestinal Peptide or Transduced with LentiVIP Protects Neuronal Cells Against Degeneration", European Journal of Neuroscience, 2023

Erendor F., Sahin E.O., Sanlioglu A. D., Balci M. K., Griffith T. S., Sanlioglu S., "Lentiviral gene therapy vectors encoding VIP suppressed diabetes- related inflammation and augmented pancreatic beta-cell proliferation", GENE THERAPY, cilt.28, sa.3-4, ss.130-141, 2021

Erendor F., Eksi Y. E., Sahin E. O., Balci M. K., Griffith T. S., Sanlioglu S., "Combined Efficacy of Insulin and Anti-Inflammatory Gene Therapiesfor Type 1 Diabetes Mellitus", Molecular Therapy, cilt.29, sa.4, ss.239-240, 2021

Erendor F., Emre Y., Ozgecan E., Blaci M. K., Griffith T. S., Sanlioglu S., "Lentivirus Mediated Pancreatic Beta-Cell-Specific Insulin Gene Therapy for STZ-Induced Diabetes", Molecular Therapy, cilt.29, sa.1, ss.149-161, 2021

Erendor F., Ekşi Y. E., Şanlıoğlu S., "İnsülin Gen Naklinin Geçmiş ve Geleceği", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, cilt.2021, sa. Gen ve Hücre Tedavisinde Güncel Gelişmeler, ss.33-44, 2021

Bildiriler:

Eksi Y. E., **Erendor F.**, Sahin E. O., Balci M. K., Sanlioglu S., "Lentivirus mediated insulin promoter directed insulin gene expression is effective in suppressing postprandial glucose excursions in Type 1 diabetes", ESGCT 27th Annual Congress in collaboration with SETGyc Meeting, Barcelona, İspanya, 22 - 25 Ekim 2019

Erendor F., Sahin E. O., Balci M. K., Sanlioglu S., "LentiVIP delivery suppresses systemic inflammation which results in beneficial outcome in Type 1 Diabetes", ESGCT 27thAnnual Congress incollaboration with SETGyc Meeting, Barcelona, İspanya, 22 - 25 Ekim 2019

Sahin E. O., **Erendor F.**, Bilgin A. B., Ceylaner S., Sanlioglu S., "New gene therapy modalities targeting oxidative stress and microglial activation are needed for effective treatment of retinitis pigmentosa", ESGCT 27th Annual Congress in collaboration with SETGyc Meeting, Barcelona, İspanya, 22 - 25 Ekim 2019

Erendor F., Şahin E. Ö., Balcı M. K., Şanlioglu S., "LentiVİP Gen Nakli Tip 1 Diyabetik Deneklerde Sistemik Enflamasyonu Baskılayarak Kan Şekerini Düşürdü", 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 27 - 30 Ekim 2019

Şahin E. Ö., **Erendor F.**, Bişgin A., Ceylaner S., Şanlıoğlu S., "Retinitis Pigmentoza Gen Tedavi Çalışmalarında KullanılmakÜzere Lentiviral Vektörlerin Geliştirilmesi ve Testi", 16. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 27 - 30 Ekim 2019

Erendor F., Sahin E. O., Balci M. K., Sanlioglu S., "LentiVIP delivery suppresses systemic inflammation which results in beneficial outcome in Type 1 Diabetes", ESGCT 27th Annual Congressin collaboration with SETGyc, Barcelona, İspanya, 22 - 25 Ekim 2019

Erendor F., Sahin E. O., Balci M. K., Sanlioglu S., "Intraperitoneal delivery of LentiINS vector lowered fasting plasma glucose and improved glucose tolerance of type 1 diabetic Wistar rats", Conference on Changing the Face of Modern Medicine - Stem Cell and Gene Therapy, Lausanne, İsviçre, 16 - 19 Ekim 2018

Sahin E. O., **Erendor F.**, Balci M. K., Sanlioglu S., "Generation of a Novel Gene Therapy Vector Encoding Beta-Cell-Specific Insulin for Diabetes Treatment", 78th Scientific Sessions of the American-Diabetes-Association, Florida, Amerika Birleşik Devletleri, 22 - 26 Haziran 2018

Şahin E. Ö., **Erendor F.**, Balcı M. K., Şanlıoğlu S., "Antidiyabetik gen nakil çalışmalarında kullanılmak üzere çoklu düşük doz Streptozotosin uygulamasıyla otoimmunitenin indüklendiği Wistar sıçan modelinin geliştirilmesi", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26 Ekim- 29 Kasım 2017

Erendor F., Şahin E. Ö., Balcı M. K., Şanlıoğlu S., "Tip 1 diyabet için vazoaktif intestinal peptidi kodlayan lentiviral vektörün geliştirilmesi", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26 - 29 Ekim 2017

Erendor F., Şahin E. Ö., Balcı M. K., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı kullanılmak üzere beta hücre spesifik gen tedavi vektörünün oluşturulması", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Muğla, Türkiye, 26 - 29 Ekim 2017

Erendor F., Sahin E. O., Balci M. K., Sanlioglu S., "Generation of a lentiviral vector encoding vasoactive intestinal peptide for type 1 diabetes", European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) XXV Anniversary Congress, Berlin, Almanya, 17 - 20 Ekim 2017

Sahin E. Ö., **Erendor F.**, Balci M. K., Sanlioglu S., "Generation of a beta cell specific insulin gene therapy vector for diabetes", European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) XXV Anniversary Congress, Berlin, Almanya, 17 – 20 Ekim 2017

Sahin E. O., **Erendor F.**, Balci M. K., Sanlioglu S., "Multiple low-dose streptozotocin injections induced diabetes in Wistar rats characterised by insulitis and hyperglycaemia useful for gene transfer studies", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, Almanya, 17 - 21 Ekim 2017

Taşyürek M. H., Ekşi Y. E., **Erendor F.**, Altunbaş H. A., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı geliştirilen gen tedavi stratejilerinde kullanılmak üzere Tip 1 Diyabet hayvan modelinin oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, Kıbrıs (KKTC, 19 - 23 Nisan 2017