

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SARS-CoV-2 NÖTRALİZASYON ANTİKOR TESTLERİNDE KULLANILMAK
ÜZERE PSEUDOVİRÜSLERİN ÜRETİMİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZEHRA KÖSEOĞLU**

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

ŞUBAT 2023

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SARS-CoV-2 NÖTRALİZASYON ANTİKOR TESTLERİNDE KULLANILMAK
ÜZERE PSEUDOVİRÜSLERİN ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Zehra KÖSEOĞLU
(36193611024)

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

ŞUBAT 2023

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ

Bu çalışmanın fikir, çalışma ve sonuç aşamalarının tümünde yardımını esirgemeyen her zaman destek olan ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM'a,

Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Muhittin YÜREKLİ'ye,

Tez konusunun belirlenmesinde yardımcı olan Eş Danışmanım Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Üyesi Doç. Dr. Nadir KOÇAK'a,

TUBİTAK MAM' da çalışmalarımı yürütebilmek için laboratuvar imkanları sunan ve yardımını esirgemeyen Dicle Üniversitesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. İbrahim Halil YILDIRIM'a,

TUBİTAK MAM'da yürüttüğüm deneysel süreçte bana destek olan ve yıllar sonra hatırladığımızda bile yüzümüzde tebessüm ettirecek anılar biriktirdiğim kıymetli dostum Yüksek Lisans Öğrencisi Nazife MERCAN'a,

Tez hazırlık aşaması ve yazım sürecinde desteğini esirmeyen çocukluğumdan kalan kıymetli hediyem, yol arkadaşım, can kardeşim Tuğba YILDIRIM'a,

Hayatım boyunca aldığım kararlarda sevgi ve emekle yanımda duran beni destekleyen, yüreklendiren canım abim Burhanettin KÖSEOĞLU'na, doğduğundan beri hayatımızda neşe kaynağı olan, kokusunu ciğerlerimde hissettiğim, en iyi arkadaşım canım yeğenim Hamza KÖSEOĞLU'na, yaşamım boyunca benden desteğini ve sevgisini esirgemeyen anne yarım canım teyzem Remziye GÜZEL'e, tez yazım aşamasında hayatımızdan ayrılan duaları ve içten sevgisini esirgemeyen canım Anneanneme,

Sabri, emeği, pes etmemeyi, tutkuyla yaşamayı ve çalışmayı bana miras bırakan, hayatım boyunca verdiğim tüm kararlarımda arkamda duran, beni destekleyen, gözlerimdeki ışıltının kaynağı olan, sevgilerini ve varlıklarını tüm ruhumla bana hissettiren, canım Annem ve ebedi hayatına uğurladığımız canım Babama sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “SARS-CoV-2 Nötralizasyon Antikor Deneylerinde Kullanılmak Üzere Pseudovirüs Üretimi “ başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Zehra KÖSEOĞLU



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR VE ÖNSÖZ	i
ONUR SÖZÜ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
SEMBOL VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 SARS-CoV-2 ve COVID-19 Pandemisi.....	2
1.1.1 SARS-COV-2 pandemisinin mevcut durumu	2
1.1.2 COVID-19'un epidemiyolojik özellikleri.....	3
1.1.3 COVID-19'un klinik özellikleri ve patogenezi	5
1.1.4 SARS-COV-2'nin sınıflandırması	7
1.1.5 İnsanları enfekte eden koronavirüslerin kökeni	8
1.1.6 SARS-CoV-2'nin yapısı	10
1.1.7 SARS-CoV-2'nin genom organizasyonu.....	12
1.1.8 SARS-COV-2'nin yaşam döngüsü ve koronavirüslerin hücre girişi	16
1.2 COVID-19 Önleme: Aşı Geliştirme	18
1.2.1 Nükleik asit aşıları.....	19
1.2.2 Protein alt birim aşıları.....	21
1.2.3 Canlı-zayıflatılmış ve tam olarak inaktive edilmiş virüsler	21
1.2.4 Rekombinant viral vektörler.....	22
1.3 Pseudovirüsler ve Nötralizan Antikor Testleri	23
1.3.1 Lentivirüsler	23
1.3.1.1 Lentivirüslerin yaşam döngüsü.....	24
1.3.1.2 Ters transkripsiyon	25
1.3.1.3 Entegrasyon	25
1.3.1.4 Transkripsiyon ve viral protein sentezi	26
1.3.1.5 Virion montajı ve serbest bırakılması.....	26
1.3.2 Lentiviruslerin geleneksel ekspresyon sistemlerinden farkı	26
1.4 Vektörler	26
1.4.1 Lentiviral vektörler.....	27
1.4.2 Lentivirüslerin genetik organizasyonu	29
1.4.3 Laboratuvarlarda lentivirüs plazmit bileşenlerinin oluşturulması.....	31
1.4.4 Lentivirüs oluşturma: çoklu plazmid kullanımı	31
1.4.5 Lentiviral vektörlerin kullanımını çevreleyen güvenlik endişeleri	32
1.4.6 Güvenlik ve lentiviral vektörler	32
1.5 Pseudovirüs Üretiminde Kullanılan Paketleme Sistemleri	33
1.5.1 İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV-1) bazlı lentiviral paketleme sistemi	33
1.5.2 Murin lösemi virüsü (MLV) bazlı paketleme sistemi	34
1.5.3 VSV Paketleme sistemi.....	35
1.5.4 Diğer paketleme sistemleri.....	36
2. KAYNAK ÖZETLERİ	37
2.1 Vektör Üretimi İçin Kullanılan Hücresel Hatlar.....	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	41
3.1 Kimyasal Malzemeler	41

3.2 Tampon Çözeltiler	41
3.3 Cihazlar	41
3.4 Plazmidlerin Seçimi	41
3.5 Transformasyon Öncesi Hazırlıklar	45
3.6 Kompetent Bakteri Eldesi	46
3.7 Stab Plazmid Kültürlerin Canlandırılması ve DNA izolasyonu	47
3.8 Plazmidlerin Kompetent Hücrelere Transformasyonu ve Çoğaltılması	48
3.9 Transforme Edilen Plazmid Kültürlerinden DNA İzolasyonu.....	49
3.10 Agaro Jel Hazırlama ve Jele Örneklerin Yüklenmesi	49
3.11 Mini Kültür Hazırlanması	50
3.12 Pseudovirus Üretiminde Kullanılmak Üzere Plazmidlerin İzolasyonu	50
3.13 Hücre Kültürünün Hazırlanması	50
3.14 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Stoklanması	51
3.15 Hücre Hattının Açılması	51
3.16 Hücre Hattının Pasajlanması.....	51
3.17 Hücre Sayımı	52
3.18 Plazmidlerin Hücre Kültürüne Transfeksiyonu	52
3.18.1 Plazmid DNA örneklerin konsantrasyonlarının ayarlanması.....	52
3.18.2 Lipid bazlı transfeksiyon karışımının hazırlanması	53
3.18.3 Plazmid DNA/ lipid karışımının hazırlanması	53
3.18.4 HEK293T hücre hattına transfeksiyonun yapılması	53
3.19 Transfekte Edilmiş Hücrelerin Görüntülenmesi	54
3.20 Pseudotip Parçacıkların Toplanması.....	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	56
4.1 Pseudovirüs Üretiminin Genel Sonuçları.....	56
4.2 Stab Plazmid Kültürlerin Canlandırılması, Transformasyonu ve DNA İzolasyonu Sonuçları	57
4.3 pDNA'sı Konsantrasyonu ve Saflığının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları.....	58
4.4 Saflaştırılmış Plazmid DNA'sının Elektroforetik Analiz Sonuçları.....	60
4.5 Hücre Kültüründeki Pseudovirüsler Varlığının GFP Işımasıyla Gösterilmesi	62
5. SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: COVID-19'un klinik semptomları ve üç farklı seviyesi.....	6
Çizelge 1.2: Farklı tipte COVID-19 aşılarının geliştirilmesi	19
Çizelge 3.1: LB Miller agar besiyerinin içeriği.	46
Çizelge 3.2: LB Miller broth besiyerinin içeriği.	46
Çizelge 3.3: Pseudovirüs üretimi için hücre kültürü ortamına ilave edilen plazmid ve serum içermeyen OPTIMEM besiyeri miktarları.....	52
Çizelge 3.4: Pseudovirüs üretimi için HEK293T hücrelerinin transfekte edilmesi için gereken transfeksiyon reaktifi ve serum içermeyen OPTIMEM besiyeri miktarları.	53
Çizelge 4.1: Plazmid miniprep kiti ile plazmid DNA izolasyonu sonucunda elde edilen pDNA'ların konsantrasyonu ve saflığının spektrofotometrik ölçüm sonuçları	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Bilinen yedi HCoV için taksonomik (a) sınıflandırması ve konumları, ve (b) Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 yazılımı kullanılarak S genine dayalı olarak oluşturulan CoV'lerin filogenetik ağaç analizi	8
Şekil 1.2: HCoV iletiminin şematik gösterimi. Ara konaklar yoluyla yarasalardan insanlara SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 bulaşması.....	10
Şekil 1.3: Coronavirusun şematik çizimi	11
Şekil 1.4: SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 genomundaki (a) genom organizasyonunun ve (b) fonksiyonel alanların şematik gösterimi	13
Şekil 1.5: SARS-CoV-2'nin yaşam döngüsü.....	16
Şekil 1.6: SARS-CoV-2 ana hücreye giriş modeli.....	17
Şekil 1.7: Plazmid vektörü.	27
Şekil 1.8: Üçüncü nesil lentiviral vektör.....	28
Şekil 1.9: Vektör üretimi.....	29
Şekil 1.10: 2. Nesil lentiviral plazmitlerin şematik gösterimi.....	30
Şekil 1.11: 3. Nesil lentiviral plazmitlerin şematik gösterimi.....	30
Şekil 1.12: Viral üretim şeması.....	31
Şekil 1.13: Kimerik 5' LTR'lerin kullanımı	32
Şekil 1.14: Kendiliğinden inaktive olan (SIN) plazmidler.....	33
Şekil 1.15: Farklı paketlenme sistemlerine dayalı SARS-CoV-2 pseudovirüslerin üretim şeması	34
Şekil 3.1: Plazmid #141184 (pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP) şematik gösterimi.....	42
Şekil 3.2: Plazmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen) şematik gösterimi	43
Şekil 3.3: Plazmid #12263 (pCMV-delta R8.2) şematik gösterimi	44
Şekil 3.4: Plazmid #149543 (pGBW-m4137384) şematik gösterimi.	45
Şekil 3.5: Nanodrop spektrofotometre cihazının görüntüsü.	48
Şekil 3.6: Plazmidlerin kompetent hücrelere transformasyonu sonrası LB agar plaklara drigalski öze ile yayılmasının görüntüsü.....	49
Şekil 3.7: HEK293T hücrelerinin 6 kuyucuklu plakaya ekiminin görüntüsü.	53
Şekil 3.8: İnverted floresan mikroskopunun görünümü.....	54
Şekil 3.9: Pseudotip virüslerin hücre kültüründen toplanması.	55
Şekil 4.1: Lentiviral pseudotipleme için genel yaklaşım	57
Şekil 4.2: pHIV-Luc-ZsGreen plazmidi içeren transforme bakterinin görüntüsü.	58
Şekil 4.3: Plazmid #14953 izolasyon sonrası spektral analizi.	58
Şekil 4.4: Plazmid #39196 izolasyon sonrası spektral analizi.	59
Şekil 4.5: Plazmid #12263 izolasyon sonrası spektral analizi.	59
Şekil 4.6: Agaroz jel üzerinde MN Plazmid kiti kullanılarak izole edilen pDNA'ların görüntüsü.....	61
Şekil 4.7: Üçlü plazmid transfeksiyonunun 48. saatinde HEK293T hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. Büyütme 20X	62
Şekil 4.8: Üçlü plazmid transfeksiyonunun 48. saatinde kontrol grubu HEK293T hücrelerinin mikroskopik görüntüleri.	63
Şekil 4.9: HEK293T hücrelerinin Sars-CoV-2 S proteini ile pseudotiplenmiş lentiviral vektörle transfeksiyonu (A-D).	64

SEMBOL VE KISALTMALAR

AAV	: Adeno-İlişkili Virüs
ACE2	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
Ad5	: Adenovirüs Tip 5
AlphaCoV	: Alfakoronavirüsler
ARDS	: Akut solunum Sıkıntısı Sendromu
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
BetaCoV	: Betakoronavirüsler
bp	: Baz Çifti
BSL	: Biyogvenlik Seviye Laboratuvarları
BSL-2	: Biyogvenlik Seviyesi 2 Laboratuvarları
BSL-3	: Biyogvenlik Seviyesi 3 Laboratuvarları
CA	: Kapsid
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
cDNA	: Komplementer DNA
CFR	: Vaka-Ölüm Oranı
CMV	: Sitomegalovirüs
CTD	: C-terminal Alanı
DeltaCoV	: Deltakoronavirüsler
E	: Zarf Proteini
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
ERGIC	: ER-Golgi Ara Bölmesi
FBS	: Fetal Sığır Serum
FP	: Füzyon Peptidi
GammaCoV	: Gamakoronavirüsler
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GMP	: İyi Üretim Uygulamaları
HCoV	: İnsan Koronavirüsü
HEK293	: İnsan Embriyonik Böbrek 293 Hücreleri (Human Embryonic Kidney 293 Cells)
HIV-1	: İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
HR	: Peptid Tekrarı
ICTV	: Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi
IgM	: İmmünoglobulin G
IL-8	: İnterlökin-8
IN	: İntegraz
IRES	: İnternal (iç) Ribozom Giriş Bölgesi
IRES	: İnternal (iç) Ribozom Giriş Bölgesi
IU	: Uluslararası Ünite
Kb	: Kilobayt
kDa	: Kilodalton
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LNP	: Lipid Nanopartiküller
LTR	: Uzun Terminal Tekrarı
M	: Zar Proteini
MA	: Matris
MERS	: Orta Doğu Solunum Sendromu
MHC I	: Majör Histokompatibilite Kompleksi

mL	: Mililitre
MLV	: Murin lösemi virüsü
MPER	: zar proksimal dış bölgesi
NC	: Nükleokapsid
Nef	: Negatif Faktör
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
Nsp	: Yapısal Olmayan Protein
NTD	: N-Terminal Alanını
OD	: Optik Yoğunluk Değeri
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
PBNA	: Pseudovirüs Tabanlı Nötrleştirme Deneyleri
PBS	: Fosfat Tamponlu Salın
PEG	: Polietilen Glikol
PR	: Proteaz
RBD	: Reseptör Bağlama Alanı
RCR	: Replikasyon Yetkin Retrovirüs
RdRp	: RNA'ya Bağımlı RNA Polimeraz
Rev	: Düzenleyici Viral Protein
RNP	: Ribonükleoprotein
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RSV	: Solunum Sinsityal Virüsü
RT	: Ters Transkriptaz
S	: Spike Proteini
SARS-CoV-2	: Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüs 2
sgRNA	: Subgenomik RNA
SIN	: Kendi Kendini Etkisiz Hale Getiren
SU	: Yüzey
TAE	: Tris-AsetikAsit-EDTA
Tat	: Transkripsiyon Faktörü
TM	: Transmembran Alanı
TMPRSS2	: Transmembrane Protease, Serine 2
TRS	: Transkripsiyon Düzenleyici Diziler
UTR	: Çevrilmemiş Bölge
Vif	: Viral Bulaşıcılık Faktörü
Vpr	: Viral protein R
Vpu	: Viral Protein U
VSV	: Veziküler Stomatit Virüsü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Yüksek Lisans

SARS-CoV-2 NÖTRALİZASYON ANTİKOR TESTLERİNDE KULLANILMAK ÜZERE PSEUDOVİRÜSLERİN ÜRETİMİ

Zehra KÖSEOĞLU

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

82 + X sayfa

2023

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Seval CİNG YILDIRIM

SARS-CoV-2, nötralize edici antikorların ana hedefi olan Spike proteinini kullanarak hücrelere girmektedir. Bu nedenle, antikorların ve serumların Spike aracılı viral enfeksiyonu nasıl etkilediğini ölçen analizler, bağışıklığı incelemek için önemlidir.

SARS-CoV-2, biyogüvenlik düzeyi 3 olan bir virüs olduğundan, bu tür testleri güvenli bir şekilde yapmanın yolu, biyogüvenlik düzeyi 2 olan viral partikülleri Spike ile pseudotiplendirmektir. Bu tür pseudotipler artık tek döngülü lentiviral, retroviral ve VSV partikülleri için tanımlanmıştır. Ancak bu işlemlerde kullanılan reaktifler ve protokoller geliştirilmelidir.

Bu çalışmada nötralizan antikor testlerinde kullanılmak üzere, BSL-2 laboratuvarlarında gerçekleştirilen, HEK293T hücre hattının transfeksiyon prosedürü kullanılarak, insan bağışıklık yetmezliği virüsü çekirdeği (HIV-1), GFP proteini raportörlü ve SARS-CoV-2'nin spike (S) proteinini içeren pseudovirüsler üretilmiştir. Stab plazmid kültürlerinden plazmidlerden izolasyonu, kompetent bakteri hücrelere transformasyonu ve izole edilen pDNA'ların transfeksiyon için özelleştirilmiş hücre hattı olan HEK293T'ye transfeksiyonu ile pseudovirüsler oluşturulmuştur. Üçlü plazmid transfeksiyonunda, Plazmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen), plazmid #12263 (pCMV-delta R8.2) ve plazmid #149543 (pGBW-m4137384) kullanılmıştır.

Pseudotiplenin başarısı, pHIV-Luc-ZsGreen plazmidinin GFP için gen kodlamasını entegre ettiğinden, GFP ışınması ile değerlendirilmiştir. Transfeksiyonun 48. Saatinde GFP ışınmaları hücre hattında tespit edilmiştir. Aşı uygulamalarından sonra yapılan nötralizan antikor testlerinde kullanılmak üzere güvenli ve kolay elde edilebilir bir yöntemle pseudovirüsler üretilmiştir.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, SARS-CoV-2, pseudovirüs, başak proteini, nötralize edici antikorlar.

ABSTRACT

Master Thesis

PRODUCTION OF PSEUDOVIRUS FOR USE IN SARS-CoV-2 NEUTRALIZATION ANTIBODY TESTS

Zehra Köseoğlu

Inonu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

82+ X pages

2023

Supervisor: Asst. Prof. Seval CİNG YILDIRIM

SARS-CoV-2 enters cells using the Spike protein, which is the target of neutralizing antibodies. Therefore, the assays that measure how antibodies affects Spike-mediated viral infection are important for studying immunity. Since SARS-CoV-2 is a biosafety level 3 virus, the safe way to perform such tests is to Spike pseudotyping biosafety level 2 viral particles. Such pseudo-typing has now been defined for single-cycle lentiviral, retroviral, and VSV particles. However, the reagents and protocols used in these procedures must be developed.

In this study, pseudoviruses containing human immunodeficiency virus core (HIV-1), GFP protein reporter and spike (S) protein of SARS-CoV-2; using the transfection procedure of the HEK293T cell line, were produced in BSL-2 laboratories for use in neutralizing antibody tests. Pseudoviruses were generated by isolation of plasmids from stable plasmid cultures, transformation into competent bacterial cells, and transfection of isolated pDNAs into HEK293T, a specialized cell line for transfection. Plasmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen), plasmid #12263 (pCMV-delta R8.2) and plasmid #149543 (pGBW-m4137384) were used in triple plasmid transfection.

The success of pseudotyping was assessed by GFP irradiation, as the pHIV-Luc-ZsGreen plasmid integrates the gene coding for GFP. GFP irradiation was detected in the cell line at 48 hours of transfection. Pseudoviruses could be produced with a safe and easily obtainable method to be used in neutralizing antibody tests performed after vaccine administration.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, pseudovirus, spike protein, neutralizing antibodies.

1. GİRİŞ

SARS-CoV-2, Coronaviridae ailesinin Betacoronavirus cinsine ait zarflı, pozitif duyarlı, tek sarmallı bir RNA virüsüdür. Wuhan kentinde deniz ürünleri ve canlı vahşi hayvanların satıldığı bir pazarın virüsün kaynağı olduğu düşünülmektedir (**Decaro ve Lorusso, 2020**). Uluslararası Virüs Sınıflandırma Komitesi, virüsü genom analizleri sonucuna göre Şiddetli Akut Solunum Sendromu Coronavirüs-2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırdı. Bu virüsün yol açtığı hastalık da DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından “Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)” olarak ilan edilmiştir (**Pal vd., 2020**). Virüs, sağlık, çalışma, eğitim ve sosyal yaşam dinamiklerini kökten etkilemiş ve kısa sürede tüm dünyayı etkisi altına almıştır. Virüsün yayılmasını önlemek ve tedavi edici ilaçlar geliştirmek için virüsün hücreye girişini anlamak gerekmektedir. SARS-CoV-2'nin yüzeyindeki başak (Spike, S) proteininin, insan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 reseptörüne bağlanarak konak hücre tanıma yoluyla viral tropizmden sorumlu olduğu tespit edilmiştir (**Xiang vd., 2022**). S proteini, reseptör bağlanma alanı (Receptor Binding Domain-RBD) yoluyla ACE2 ile etkileşime girerek hücreye girer ve onu enfekte eder. İyileşen COVID-19 hastaları, spike glikoproteine karşı yüksek antijenitelerini gösteren nötralize edici antikorlar (Neutralizing antibody-nAb'ler) geliştirebilmektedir. Nötralizasyon, in vivo ve in vitro sistemlerde homolog olan antikorlar tarafından enfeksiyona neden olma yeteneğine sahip bir virüsün bulaşıcılığının bloke edilmesidir (**Klasse, 2014**). Gerçek patojenik SARS-CoV-2 ile deneyler, yüksek düzeyde biyogüvenliğe (BSL3) sahip laboratuvar koşulları gerektirir. Fakat biyogüvenlik düzeyi daha düşük olan BSL-2 laboratuvarlarında, SARS-CoV-2 nin GFP (Green fluorescent protein) ve Spike proteini (SARS-CoV-2) taşıyan pseudotiplenmiş lentivirüsler güvenli bir şekilde çalışmalar yapabilmektedir. Pseudovirüsler, yüksek patojenite ve enfektiviteye sahip canlı virüsler kadar verimli olup, hücre girişine aracılık eden heterolog bir zarf proteini ile kaplanmış virüs parçacıklarıdır. Pseudovirüsler otonom replikasyon yeteneğine sahip değildir ve yalnızca tek bir döngü için konakçı hücreleri enfekte edebilir. Lentivirüslerin omurgası, pseudovirüs oluşturmak için kullanılmaktadır. Pseudovirüslerin in vivo transfeksiyonlarının oluşumu, pseudovirüsler tarafından taşınan GFP raportörlerinin ışması ile revers flüoresans mikroskobu ile görüntülenerek

belirlenebilmektedir. Bu nedenle, pseudovirüsler, viral enfeksiyonların çalışılmasında, monoklonal antikorların ve antiviral ilaçların taranması ve değerlendirilmesinde ve aşılama sonrası serumda nötralize edici antikor titrelerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (**Xiang vd.**, 2022).

Lentivirüsler, Retroviridae ailesindeki yedi cinsten biri olarak sınıflandırılır. Lentivirüslerin çapı yaklaşık 80-120 nm'dir ve iki pozitif yüklü tek sarmallı RNA içeren bir genoma sahiptir. Aynı zamanda çift lipidli bir zarla kaplı bir protein kapsidi vardır. Lentivirüs genomu yaklaşık 9-10 kb boyutundadır. Lentivirüsler, virüs replikasyonu, entegrasyonu ve ilgili genlerin ekspresyonu için gerekli olan 600-900 nükleotit uzunluğundaki homolog bölgelere (long terminal repeat, LTR) sahiptir. Bu homolog bölgeler, U3, R ve U5 bölümlerine ayrılmıştır. Tüm retrovirüslerde ortak olan gag, pol ve env genlerine ek olarak, düzenleyici ve yardımcı proteinleri kodlayan bazı diziler de içerir. Lentivirüsler bölünmeyen ve bölünen hücre tiplerini enfekte edebilirler (**Milone ve O'Doherty**, 2018).

Bu çalışmanın amacı, BSL-2 laboratuvarlarında gerçekleştirilecek nötralizan antikor testlerinde kullanılmak üzere, HEK293T hücre hattının transfeksiyon prosedürünü kullanarak insan bağışıklık yetmezliği virüsü çekirdeği (HIV-1) ve GFP proteini raportörlü, SARS-CoV-2'nin spike (S) proteinini içeren pseudovirüslerin oluşturulmasıdır.

1.1 SARS-CoV-2 ve COVID-19 Pandemisi

1.1.1 SARS-COV-2 pandemisinin mevcut durumu

Aralık 2019'un sonlarında, Çin'in Hubei eyaletindeki Wuhan'daki birkaç sağlık tesisi, nedeni bilinmeyen pnömonili hastaları bildirildi (**Zhu vd.**, 2020). Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) bu hastalıkların etmeni olan yeni bir virüse, yeni 2019 koronavirüs (2019-nCoV) adını verdi. Ayrıca DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü), COVID-19 salgınını, 30 Ocak 2020'de uluslararası bir halk sağlığı acil durumu olarak ilan etti. DSÖ, 11 Şubat 2020'de, 2019-nCoV'nin neden olduğu yüksek bulaşıcılığa sahip bu yeni koronavirüs hastalığını resmi olarak Coronavirus Hastalığı-2019 (COVID -19) olarak adlandırdı. Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) ise 2019-nCoV'u Şiddetli Akut Solunum Sendromu Koronavirüsü olarak sınıflandırdı (**Wang vd.**, 2020a).

1.1.2 COVID-19'un epidemiyolojik özellikleri

Öncelikle salgının kaynağı olan Çin'in Wuhan kentindeki SARS-CoV-2 vakalarını tanımlamak ve hastalık etmeni olan virüsü karakterize etmek için beş hastadan alınan virion örnekleri alınmıştır. 2002-2003'te SARS-CoV, Çin'de şiddetli akut solunum yolu hastalıkları salgınına neden olduğu tespit edilmiştir; MERS-CoV ise, 2012'de Orta Doğu'da bulunmuş ve Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) pandemisine neden olduğu belirtilmiştir. (**Otter vd.**, 2016; **Gao vd.**, 2016). SARS-CoV-2 genomu, koronavirüslerde ortak olan 6 ana ORF'den oluşur ve SARS-CoV-2 dizisi, SARS-CoV ile neredeyse %70 ve MERS-CoV ile yaklaşık %40 benzerliğe sahiptir (**Zhou vd.**, 2020 ; **Chen vd.**, 2020; **Victor vd.**, 2020; **Eurosurveillance Editorial Team**, 2020). SARS-CoV-2, daha önce tanımlanan BatCoV RaTG13 ile %96,2 genetik dizi benzerliğine sahiptir, bu da yarasaların büyük olasılıkla SARS-CoV-2'nin konakçısı olduğunu düşündürmektedir (**Paules vd.**, 2020; **Lu vd.**, 2020; **Ji vd.**, 2020; **Lau vd.**, 2019). Bu benzerlik, yarasa CoV'nin insanlara bulaşmasının, CoV'ler için bir rezervuar görevi görebilen bir ara konakçının varlığıyla kolaylaştırılmış olabileceği fikrini akıllara getirmiştir. Pangolinler, SARS-CoV-2 için bir köprü konakçı görevi görebilecek birincil şüpheli olarak kabul edilmiştir (**Mallapaty**, 2020). Pangolin-CoV, genom analizi sonucunda, SARS-CoV-2 ile % 91.02 oranında benzerlik göstermiştir. Bu durum , onu genetik benzerlik açısından BatCoV RaTG13'ten sonra insan SARS-CoV-2 ile en yakından ilişkili ikinci canlı yapmaktadır (**Boni vd.**, 2020). Ayrıca insanlardaki SARS-CoV-2'nin genetik olarak Pangolin-CoV'a diğer SARS-CoV'lerden daha yakın olduğu tespit edilmiştir (**Pamukçu**, 2021). Bulgular, pangolinlerin ara konak olarak hareket ettiği hipotezini desteklemektedir. Köpekler, ördekler, domuzlar ve tavuklar enfeksiyon oluşmasına izin vermeyen insanlara yakın olan hayvanlardır (**Pamukçu**, 2021). İnsanlarda olduğu gibi, kediler ve yaban gelinciği de SARS-CoV-2 virüsü için ideal konaklardır (**Shi vd.**, 2020). SARS-CoV-2'nin, enfekte ve enfekte olmayan kişilere yakın ve korunmasız temasla, sporlar ve damlacıklar aracılığıyla bulaştığı görülmüştür (**Jayaweera vd.**, 2020). Enfeksiyonun birincil kaynağı semptomatik ve asemptomatik bireylerdir. Dolaylı dokunma yoluyla bulaşma, virüsün yayılmasının başka bir yoludur. Eller, virüs içeren damlacıklarla kontamine olduktan sonra kişiler ellerini burun, göz ve ağızdaki mukoza zarlarıyla temas ederek enfekte olmuşlardır (**Pamukçu**, 2021). Ayrıca SARS-CoV-2'nin aerosol olarak iletimi çeşitli araştırmalarda belirtilmiştir (**Morawska vd.**, 2020). COVID-19 salgını sırasında yürütülen bir araştırmaya göre, SARS-CoV-2 aerosoller yoluyla yayılabilmektedir. Bu nedenle, hava yoluyla bulaşma,

COVID-19 bulaşmasının birincil yoludur (**Meselson, 2020; Chan, Yuan vd., 2020**). SARS-CoV-2, son araştırmalara göre insan bağırsak organoidlerini ve epitel hücrelerini enfekte etme yeteneğine de sahiptir. Sonuç olarak, SARS-CoV-2 sindirim sistemi yoluyla da yayılabilmektedir (**Lamers vd., 2020**). COVID-19 hastalarında çok sayıda organda viral RNA tespit edilmiştir. SARS-CoV-2, yalnızca solunum örneklerinden değil, aynı zamanda bazı COVID-19 hastalarının idrarından da izole edilmiştir (**Sun vd., 2020**). SARS-CoV-2 ile enfekte olan dokuz hamile kadın üzerinde yapılan bir çalışmada, virüsün hamilelik sırasında bebeğe bulaşabileceğine dair kanıt bulunamamıştır. Bununla birlikte, çeşitli araştırmalar, enfeksiyonun gebeliğin üçüncü trimesterinde meydana gelmesi durumunda SARS-CoV-2'nin bulaşabileceğini de göstermiştir (**Chen vd., 2020**).

Hamileliğin son üç ayındaki SARS-CoV-2 teşhisi konan bir hastanın bebeğine SARS-CoV-2 bulaştığı ve bebekte nörolojik bozulmalara neden olduğu saptanmıştır. Başka bir örnekte, yeni doğan bebeklerin sitokin ve anti-SARS-CoV-2 IgM antikorlar seviyeleri, fiziksel temas olmamasına rağmen yükselmiştir ve bu da transplasental geçişi göstermektedir (**Dong vd., 2020**). Perinatal SARS-CoV-2 bulaşma olasılığı minimumdur. Güncel raporlar perinatal bulaşmanın mümkün olduğunu, ancak nadir olduğunu belirtmektedir (**Egloff vd., 2020**).

SARS-CoV-2 klinik semptomları yaşa göre değişmektedir. Herkes risk altında kabul edilir ve mevcut epidemiyolojik verilere göre riskli yaş medyanı yaklaşık 50'dir (**Guan vd., 2020**). 60 yaşın üzerindeki hastalarda solunum yetmezliği ve uzun süreli hastalık seyri riski daha yüksektir. 60 yaşın altındaki bireylerde hastalık daha az şiddetlidir (**Liu vd., 2020**). Bir araştırmaya göre, Çin'deki 72.314 hastanın çoğu (% 87) 30 ile 79 yaşları arasındadır. Dokuz yaşın altındaki çocuklar arasında ölüm olmamıştır. Ancak 70-79 yaş grubunda vaka ölüm oranı (CFR) % 8.0, 80 yaş ve üzeri grupta ise CFR %14.8'dir (**Pamukçu, 2021**). Diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık, kronik akciğer hastalığı ve kanser gibi çeşitli eşlik eden hastalıkları olan bireyler için CFR sırasıyla %10.5, 7.3, 6.3, 6.0 ve 5.6'dır. Bu bulgulara göre, COVID-19 hastalarının komorbid bozukluklardan ölme olasılığı, olmayanlara göre daha fazladır (**Wu ve McGoogan, 2020**). Altı yaşın altındaki 1000'den fazla enfekte olan çocuklarda, medyan yaş 6.7'dir ve çocukların çoğunluğu daha az şiddetli semptomlar göstermiştir (**Lu vd., 2020**). COVID-19 olan 65 yaş üstü hastalar ise, özellikle akut solunum sıkıntısı sendromu (Acute respiratory distress syndrome, ARDS) ve komorbiditesi olanlardan daha yüksek ölüm riski altındadır (**Du vd., 2020**).

1.1.3 COVID-19'un klinik özellikleri ve patogenezi

DSÖ-Çin Ortak Misyonu araştırmasına göre, enfeksiyonların % 80'i zatürre ve zatürre dışı vakalar dahil olmak üzere hafif ila orta şiddette, % 13.2'i ağır hastalık geliştiriyor ve % 6.8'i yoğun bakım gerektiren kritik derecede tehlikeli hastalığa sebep olmaktadır (Rapor of the World DSÖ-Çin Koronavirüs Hastalığı Ortak Misyonu 2019 (COVID-19), n.d.). Ateş, öksürük ve bitkinlik, COVID-19'un yaygın semptomlarıdır, ancak daha az yaygın ve anormal semptomlar da bildirilmiştir. Semptomların şiddetine göre COVID-19 üç seviyeye ayrılır: hafif, şiddetli ve kritik. Bireylerin çoğu ise şiddeti olmayan semptomlar gösterdikten sonra iyileşmektedir (**Hu vd.**, 2020). Ayrıca asemptomatik enfeksiyon vakaları da kaydedilmiştir (**Huang vd.**, 2020). Çizelge 1'de, COVID-19'un semptomları ve COVID-19'un üç farklı şiddet seviyesi özetlenmektedir (**Wang vd.**, 2020).

Şiddetli COVID-19, takipne (hiperventilasyon, dakikada 30'dan az nefes), istirahatte oksijen saturasyonu <93 olarak tanımlanır. Buna karşılık kritik hastalık, mekanik ventilasyon gerektiren solunum yetmezliği, septik şok veya diğer organ işlev bozukluğu veya yoğun bakım desteği gerektiren yetmezlik olarak tanımlanır (**Adil vd.**, 2021). Yaşlılar (60 yaş üstü) ve diyabet, hipertansiyon, obezite, kanser, kronik solunum hastalığı, kardiyovasküler hastalık ve karaciğer hastalığından muzdarip olanlar ciddi ve kritik hastalık açısından en yüksek risk altındadır (**Guan vd.**, 2020). Bir araştırmaya göre, her yaştan çocuk enfekte olabilir. Çocuklardaki enfeksiyonların çoğu asemptomatik veya orta derecede iken, küçük çocuklarda, özellikle yeni doğanlarda, sonuçlar % 7-10 oranında ciddi ve kritik hastalık sıklığıyla şiddetli olabilir (**Dong vd.**, 2020). Şiddetli ve kritik COVID-19'un patogenezi karmaşıktır ve birkaç hipotez öne sürülmüştür. En yaygın açıklama, SARS-CoV-2'nin akciğerlerdeki anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörleri aracılığıyla hücreleri enfekte etmesi, hücre patlayana kadar hücre içi viral replikasyonu tetiklemesi ve diğer hücreleri enfekte eden çok sayıda virüs partikülü salmasıdır (**Pamukçu**, 2021). Bu aynı zamanda doğuştan gelen ve adaptif bağışıklığı aktive ederek potansiyel olarak bir sitokin fırtınasını tetikler ve hem lokal hem de sistemik olarak doku hasarına neden olur.

Çizelge 1.1: COVID-19'un klinik semptomları ve üç farklı seviyesi.

Klinik Belirtileri	Pnömoni semptomları arasında kas ağrısı, baş ağrısı, ateş, nefes darlığı, kuru öksürük, konfüzyon, boğaz ağrısı, burun akıntısı, göğüs ağrısı, ishal, kusma, titreme, balgam üretimi, hemoptizi, nefes darlığı, bilateral pnömoni anoreksi ve göğüs ağrısı yer alır. Yoğun bakım hastalarında daha yüksek seviyelerde plazma sitokinleri (IL2, IL7, IL10, GSCF, IP10, MCP1, MIP1A ve TNFα) görülür.	
Üç farklı COVID-19 Seviyesi	Hafif	Ateş, yorgunluk, öksürük, pnömoni dışı ve hafif pnömoni
	Şiddetli	Dispne, kan oksijen doygunluğu %93'ün altında, solunum sıklığı <30/dak, arteriyel oksijenin solunan oksijen fraksiyonuna oranının kısmi basıncı <300 ve/veya 24 ila 48 saat içinde akciğer infiltratlarının >%50'sinin tümü potansiyel olarak bir yoğun bakıma ihtiyacı olan hasta.
	Kritik	ARDS, solunum yetmezliği, çoklu organ fonksiyon bozukluğu veya yetmezliği, septik şok, pıhtılaşma fonksiyon bozukluğu

Şiddetli COVID-19'lu hastalarda, önemli ölçüde daha düşük CD4+T hücreleri, CD8+T hücreleri, B hücreleri, doğal öldürücü hücreler, monositler, eozinofiller ve bazofillerin yanı sıra daha yüksek bir nötrofil sayısı tespit edilmiştir (Cao, 2020). Akciğerlerde masif nötrofil ve makrofaj infiltrasyonu meydana gelir ki bu da hiyalin membran birikmesine ve yaygın alveoler yıkımına neden olarak solunum yetmezliğine ve ARDS'ye yol açar (Pamukçu, 2021). Sistemik inflamatuvar yanıt, kalp, karaciğer ve böbrekte pan-sistemik hasara neden olarak çoklu organ işlev bozukluğuna ve immün aracılı hasara neden olmaktadır. Yaşlılarda daha kötü sonuçlar olmasına rağmen, hiç kimse herhangi bir yaşta ciddi hastalıklara karşı bağışık değildir (Dong vd., 2020). Ayrıca, 60 yaşın altındaki hastalar arasında obezite, hastaneye yatış için en önemli risk faktörüdür (Lighter vd., 2020). Şiddetli ve hayati COVID-19'un patofizyolojisi için alternatif teoriler literatürde sunulmuştur. Fakat bunların daha fazla çalışma ile doğrulanması gerekmektedir. Bir araştırmaya göre, ACE2 reseptörü kalpte yüksek seviyelerde ifade edilir ve bu da göğüste sıkışma ve çarpıntı gibi semptomlara sebep olmaktadır (Zheng vd., 2020). Önceden mevcut kardiyak kronik rahatsızlıkları olmayan ve sonunda ölen hastaların % 11.8'inde hastaneye yatış sırasında kardiyak spesifik troponinlerdeki artışın, aşırı miyokardiyal hasar, miyokardit ile kanıtlandığı gibi, ciddi COVID-19 hastalığında olası bir ölüm nedeni olduğu gösterilmiştir (Zheng vd., 2020). Başka bir çalışmada, kritik düzeydeki hasta bireylerde SARS-CoV-2 viremisine bağlı olarak trombotik olaylar, yaygın intravasküler pıhtılaşma ve anti-fosfolipid antikorlarının geçici artışları gözlenmiştir (Zheng vd., 2020). Ciddi solunum yetmezliği, SARS-CoV-2'nin periferik sinir terminallerini enfekte etme

yeteneğinden kaynaklanabilir ve bu da daha sonra sinaps bağlantılı bir yoldan beyin sapına girmesine yol açabilmektedir. Bu nöroinvaziv potansiyelin şiddetli COVID-19 hastalarında solunum yetmezliğinde rol oynadığı öne sürülmüştür (**Li vd.**, 2020). SARS-CoV-2'nin hemoglobinin 1-beta zincirini hedeflediğini ve porfirini yakalayarak insan hem metabolizmasını inhibe ettiği iddia edilmektedir (**Ghareeb vd.**, 2021).

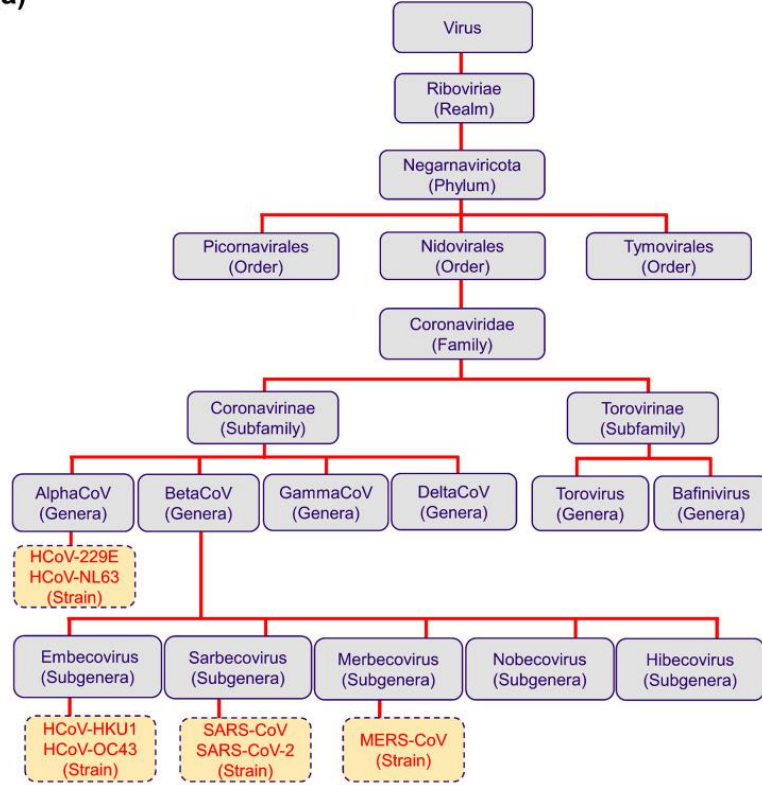
1.1.4 SARS-COV-2'nin sınıflandırması

İnsan CoV'ları (HCoV'ler), omurgalıları enfekte eden tek sarmallı, segmentsiz, pozitif RNA genomuna sahip zarflı virüslerdir (**Masters**, 2006). Mevcut sınıflandırmaya göre Corona viridae ailesi içinde 27 alt cins, beş cins ve iki alt ailede toplam 39 CoV türünü bulunmaktadır (**Siddell vd.**, 2019). Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi (ICTV), HCoV'leri dört ana cinse ayırmıştır: AlphaCoV (alfakoronavirüsler), BetaCoV (betakoronavirüsler), GammaCoV (Gamakoronavirüsler) ve DeltaCoV (deltakoronavirüsler). Ayrıca bunları genotipik ve serolojik değerlendirmeye göre Coronaviridae ailesinin Coronavirinae alt ailesi altına yerleştirmiştir (**Wu vd.**, 2020).

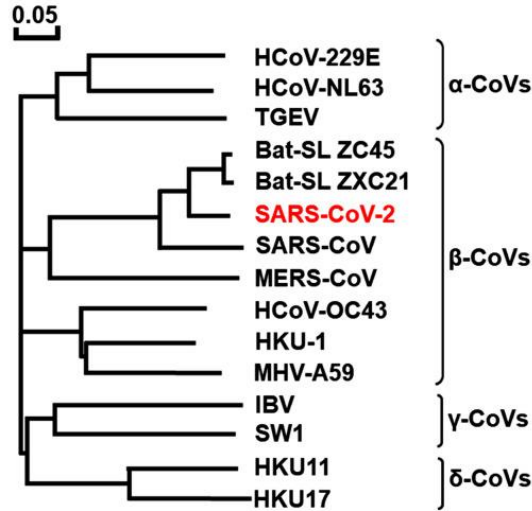
AlphaCoV ve BetaCoV sadece memelilere bulaşmaktadır. GammaCoV ve DeltaCoV ise kuşları enfekte eder. Ancak nadiren memelileri de enfekte edebilirler (**Woo vd.**, 2012). İnsanlarda solunum yolu hastalıklarına genellikle alfa ve betakoronavirüsler yol açmaktadır (**Pamukçu**, 2021). İki yüksek patojenik virüs olan SARS-CoV ve MERS-CoV, insanlarda ciddi solunum sendromuna neden olurken, diğer dört insan koronavirüsü, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 ve HKU1, üst solunum yollarında daha hafif enfeksiyonlara neden olmaktadır (**Su vd.**, 2016).

Taksonomik bir grup olarak, HCoV-229E ve HCoV-NL63 AlphaCoV olarak sınıflandırılırken, HCoV-HKU1, HCoV-OC43, SARS- ve MERS-Cov BetaCov olarak tanımlanır. SARS-CoV ve MERS-CoV, Sarbecovirus ve Merbecovirus alt türlerinin alt gruplarıdır (**Van Boheemen vd.**, 2012). Özellikle yeni ortaya çıkan SARS-CoV-2, SARS-CoV ve MERS-CoV'dan farklıdır, bu nedenle SARS-CoV-2'nin Sarbeco virüsü alt türü altındaki taksonomik sınıflandırması geçicidir ve ek kanıtlara bağlı olarak değişim gösterebilecektir (**Gorbalenya vd.**, 2020) (Şekil 1.1a,b) (**H. Lu**, 2020).

(a)



(b)



Şekil 1.1: Bilinen yedi HCoV için taksonomik (a) sınıflandırması ve konumları, ve (b) Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 yazılımı kullanılarak S genine dayalı olarak oluşturulan CoV'lerin filogenetik ağaç analizi (Biswas vd., 2020).

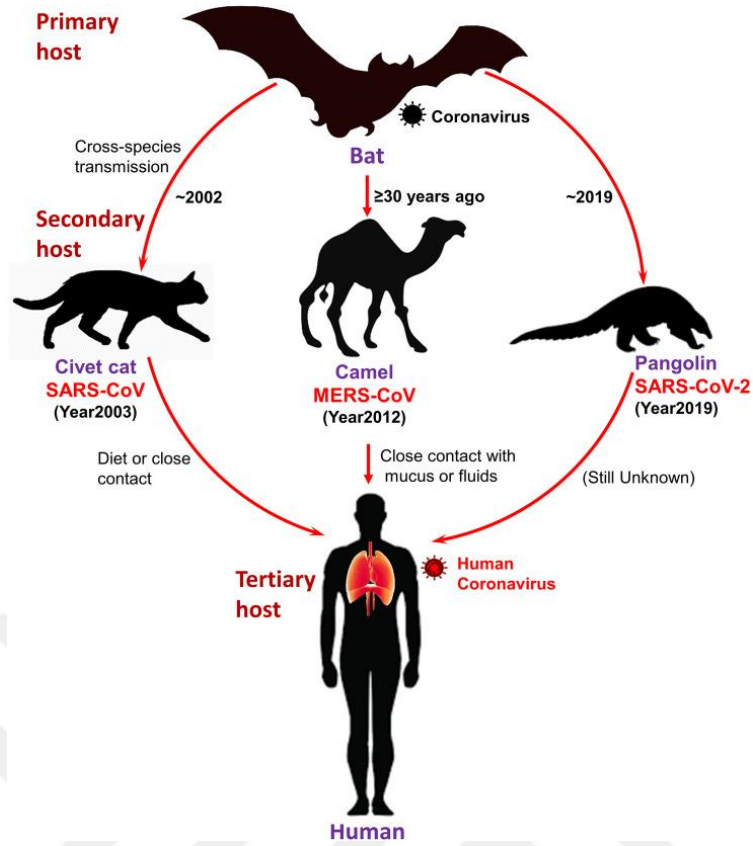
1.1.5 İnsanları enfekte eden koronavirüslerin kökeni

Son araştırmalar, HCoV'lerin gelişimini hızlandırılmış kentleşme ve hayvan çiftçiliği ile ilişkilendirmiştir. Çünkü bu faaliyetler sık tür alışverişi ve basitleştirilmiş tür bariyeri geçişinin yanı sıra bu virüslerde genomik rekombinasyona olanak tanımaktadır (Jones vd.,

2013). Yarasalar, çeşitli CoV'lerin ev sahibi olarak biliniyordu. CoV'lerin yarasalardan insanlara doğrudan geçişi kesin olarak belirlenmemiş olsa da, aracı konaklar aracılığıyla doğrudan temas yoluyla insanlara geçişi, olası bir bulaşma mekanizması olarak kapsamlı bir şekilde varsayılmıştır (**Banerjee vd.**, 2019).

Çin'in Foshan kentinde kaydedilen ilk SARS-CoV vakası Kasım 2002'de bildirildi (**Ge vd.**, 2015). Bu vaka, 28 ülkeye yayılarak 8.090 vaka ve 772 ölümle sonuçlandı (**Ge vd.**, 2015). SARS-CoV'nin kökenine dair ilk kanıt, maskeli palmiye misk kedilerinde ve rakun köpeklerinde tespit edilmiştir. Shenzhen'deki bir hayvan pazarında Çinli yaban gelinciği porsuklarında SARS-CoV'ye özgü antikorların tespiti, araştırmacıların bu hayvanın insan bulaşma kaynağı olduğunu düşünmelerine yol açmıştır (**Drexler vd.**, 2014). Bununla birlikte, daha ileri araştırmalar, vahşi veya yapay üreme tesislerinde bulunabilen hurma misk kedileri arasında SARS-CoV benzeri virüslerin yayılmasını destekleyen kanıtların yokluğu bu hayvanların yalnızca tesadüfi konakçılar olduğunu göstermiştir (Şekil 1.2) (**Wang vd.**, 2006). Diğer benzer araştırmalar, SARS-CoV ile ilişkili genetik olarak farklı CoV'lerin Çin at nalı yarasalarında da tespit edildiğini ortaya koydu ve bu türlerin bu eşsiz HCoV için bir rezervuar görevi görebileceğini gösterdi (**Lau vd.**, 2005). Afrika uçan tilkilerindeki (*Pteropus spp.*) Ebola virüsüne ilişkin bir açıklama ile birlikte, bu keşifler, yeni viral enfeksiyonlara ev sahipliği yapan yarasalara dikkat çekmiştir (**Leroy vd.**, 2005).

Benzer şekilde, Haziran 2012'de Suudi Arabistan'ın Cidde kentinde ilk MERS-CoV vakası tespit edildi (**Ge vd.**, 2015). Kasım 2019'a kadar 28 ülkede 859 ölümle sonuçlanan 2.492 kayıtlı MERS-CoV vakası saptanmıştır. Ata virüsünün yarasalardan tek hörgüçlü develere geçeceği 30 yıldan fazla bir süre önce tahmin edilmişti ve bu tahmin o zamandan beri serolojik verilerle doğrulandı. Tek hörgüçlü develer, MERS-CoV için önemli bir rezervuardır (**Müller vd.**, 2014). (Şekil 1.2).



Şekil 1.2: HCoV iletiminin şematik gösterimi. Ara konaklar yoluyla yarasalardan insanlara SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 bulaşması (**Kirtipal vd.**, 2020'den alınmıştır).

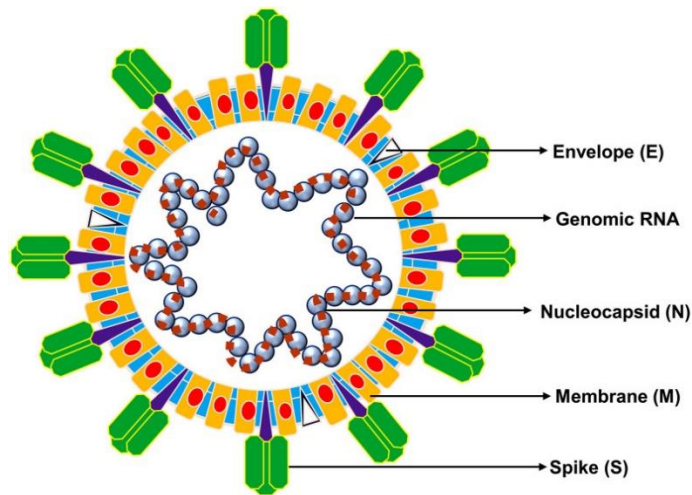
Son SARS-CoV-2 pandemisi, ölümcül virüslerin keşfedilmemiş vahşi zoonotik rezervuarının varlığını ortaya koydu (**Malik vd.**, 2020). Çin'in Wuhan kentindeki bir canlı hayvan pazarı, 2019'daki SARS-CoV-2 salgınıyla ilgiliydi. Bat-SL-CoVZXC45 ve bat-SL-CoVZXC2 genomlarının % 96'sını SARS CoV-2 ile paylaşan iki SARS benzeri CoV, yarasaların SARS-CoV-2'nin doğal konakçıları olduğu gösterildi (**Xu vd.**, 2020). Bununla birlikte, aracı konak ve virüsün insanlara bulaşma yolu bilinmiyordu. SARS-CoV-2'nin yarasalardan insanlara bulaşması ilk olarak S proteini içinde homolog rekombinasyon ile meydana gelir (**Ji vd.**, 2020). Pangolinler (Manis spp.), pangolin CoV'lere %99 genetik benzerlikleri nedeniyle daha sonra SARS-CoV-2 için olası bir ara konak olarak tanımlandı (Şekil 1.2).

1.1.6 SARS-CoV-2'nin yapısı

SARS-CoV-2 küreseldir, zarflıdır, yaklaşık 80-120 nm çapındadır. Elektron mikroskobu altında, zarf, güneşin koronasına benzeyen 20 nm boyutunda taç benzeri sivri uçlara sahiptir, bu nedenle adı koronavirüstür (Şekil 1.3) (**Park**, 2020). Spesifik olarak, SARS-

CoV-2 parçacıklarının, 9-12 nm sivri uçlar ile 60-140 nm çapında küresel şekilli olduğu gösterilmiştir (**Zhu vd.**, 2020a). Virionun lipid çift katmanlı zarfı içinde, +ssRNA ve kapsid proteinlerinden oluşan bir kompleks içeren sarmal simetrik nükleokapsidler bulunur. SARS-CoV-2'nin ana yapısı dört ana yapısal protein tarafından inşa edilmiştir: Başak (S), zar (M), nükleokapsid (N) ve zarf (E). Bu yapısal proteinlerin dördü de SARS-CoV-2 genomunun 3' ucunda kodlanmıştır (**Pamukçu**, 2021). 150 kDa moleküler ağırlığa sahip transmembran S glikoproteini, virüsün yüzeyinden uzanır. S protein homotrimeri, hedef hücre membranındaki ACE2 reseptörüne bağlanmaktan sorumludur. Bir konakçı hücre proteazı bu glikoproteini S1 ve S2 olmak üzere iki alt birime böler. Konak viral aralığı ve hücre tropizm, reseptör bağlama alanını (RBD) ve N-terminal alanını (NTD) içeren C-terminal alanı (CTD) ile karakterize edilen S1 alt birimi tarafından belirlenir. Membran füzyonuna, bir dahili membran füzyon peptidi (FP), iki 7-peptid tekrarı (HR), bir zar proksimal dış bölgesi (MPER) ve bir transmembran alanı (TM) içeren S2 alt birimi aracılık etmektedir (**Guo vd.**, 2020; **Li**, 2016).

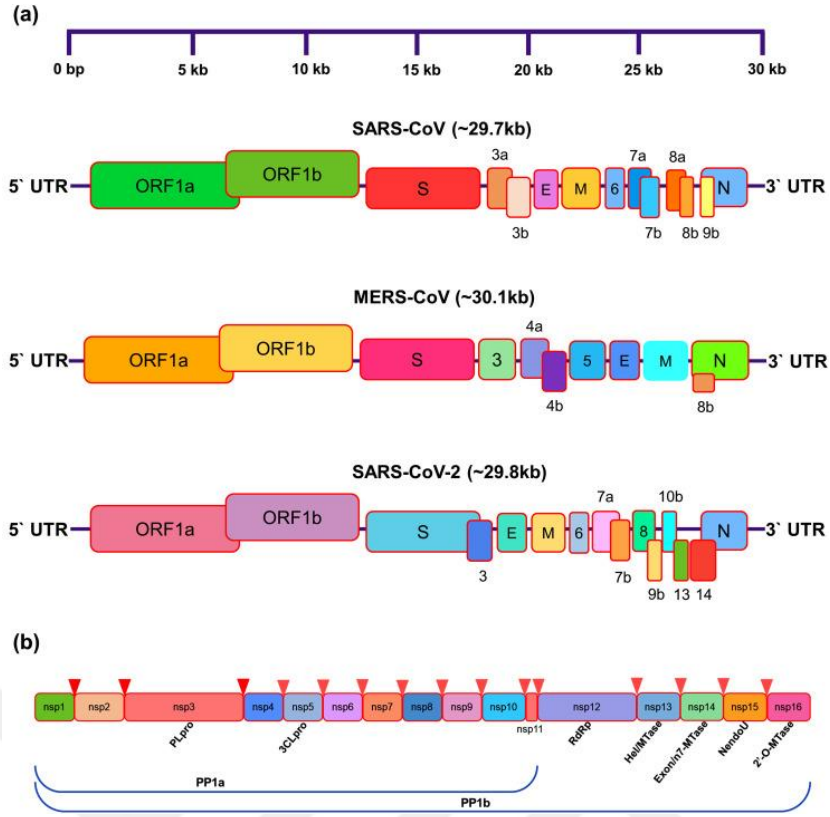
Yüzey yapısal proteini olan M glikoproteininin moleküler ağırlığı, viral birleşmede önemli bir role sahiptir (**Neuman vd.**, 2011). SARS-E proteini viral oluşum ve olgunlaşmada rol oynar. Virüsün nükleik asidi N proteinine bağlanmaktadır. Bu da N proteinin viral genom ve replikasyon döngüsüne dahil olduğu anlamına gelir (**Schoeman ve Fielding**, 2019). Spike, zarf, zar ve nükleokapsid genlerini içeren dört yapısal genin yanı sıra, pp1ab ve pp1a proteinlerini, 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b, 9b yardımcı proteinleri ve ORF10 bölgesini sentezleyen gen bölgeleri de mevcuttur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3: Coronavirusun şematik çizimi (**Kirtipal vd.**, 2020).

1.1.7 SARS-CoV-2'nin genom organizasyonu

SARS-CoV-2 genomunun nükleotid uzunluğu 26.0 kb ile 32.0 kb arasında değişmektedir, değişken sayıda açık okuma çerçevesine (ORF) sahiptir ve genomik organizasyonu bilinen diğer HCoV'lere oldukça benzerdir (**Song vd.**, 2019 ; **Qin**, 2019). Bugüne kadar karakterize edilen koronavirüsler, çok sayıda yüzeye yansıtılan çivi benzeri sivri uçlara sahip zarflı, segmentsiz, tek sarmallı (ss) virüslerdir ve 5'-başlık ve 3'-poli(A) ile pozitif sens RNA genomuna sahiptirler. kuyruk, replikaz poliproteinlerinin translasyonel sentezi için fonksiyonel mRNA olarak hareket etmesine izin verir (**Wang vd.**, 2020). On altı yapısal olmayan protein (nsps), genomun yaklaşık % 67'sini oluşturan ilk ORF tarafından kodlanırken, yapısal ve yardımcı proteinler kalan ORF'ler tarafından kodlanır. 5' ve 3' konumlarında iki çevrilmemiş bölgeye (UTR) sahiptir (**Chan vd.**, 2020; **Wu vd.**, 2020). SARS genomu CoV-2'ler, ORF1a ve ORF1b bölgesinden iki poliproteini on altı nsps'ye (nsp1-16) çevirerek viral genom replikasyonu ve transkripsiyonunu başlatır. Ek olarak, SARS-CoV-2 genomu dört yapısal ve altı adede kadar yardımcı protein içerir (3a, 6, 7a, 7b, 8, 9b ve 10), ancak bu proteinlerin translasyonu için subgenomik RNA'lar (sgRNA'lar) gereklidir (Şekil 1.4). Virüsün pozitif sens RNA yapısı nedeniyle proteinlere çevrilmeye hazır olan viral genom, konak hücreye girdikten sonra salınır (**Naqvi vd.**, 2020).



(Genom, çevrilmemiş iki bölümle (UTR'ler) çevrili tek bir uzun açık okuma çerçevesi içerir. Genom, 5' UTRs-orf1a-orfS-orf3a-orfE-orfM-orf6-orf7a-orf7b-orf8-orf9b-orfN-3'UTR şeklinde sıralanır. ORF1ab, pp1a ve pp1ab olmak üzere iki büyük polipeptidin üretilmesinden sorumludur. Bu iki polipeptin, ribozomal çerçeve kayması ile ifade edilir. Genom dört yapısal proteinden oluşur: spike proteini (S), zarf proteini (E), zar proteini (M) ve nükleokapsid proteini (N) ve ayrıca altı yardımcı protein: 3a, 6, 7a, 7b, 8, 9b ve 10. Dört yapısal proteinin birincil alanları gösterilmektedir).

Şekil 1.4: SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2 genomundaki (a) genom organizasyonunun ve (b) fonksiyonel alanların şematik gösterimi (Shereen vd., 2020)

ORF1ab

Yapısal Olmayan Poliproteinler (nsps)

ORF1ab çevrildiğinde, iki büyük yapısal olmayan polipeptin üretir. Bu polipeptinler, 16 farklı nsp üretmek için işlenir (Pamukçu, 2021). Polipeptin bölünmesinde iki proteaz yer alır: Birincisi, nsp3 tarafından kodlanan papain benzeri proteazdır (PLpro). İkincisi, nsp5 tarafından kodlanan ana proteaz olan serin tipi Mpro (3CLpro)'dur (Tu vd., 2020).

ORF 2-10

Dört yapısal ve altı yardımcı proteini kodlayan dizilere sahiptir. Golgi aygıtında bu proteinlerin bazıları glikozillenir (Sakr vd., 2021).

Yapısal Proteinler

S Proteini

S proteini, 1273 amino asitten oluşur ve 150- 200 kDa kütleyle sahiptir. Viral yüzeyde bulunur ve koronayı oluşturur. Bir homotrimer olarak işlev görür ve 20 asparajin bağlı glikan sinyal dizisi içerir (**Fehr ve Perlman**, 2015). Protein, reseptör bağlanmasından (S1) ve membran füzyonundan (S2) sorumlu iki ana alt birim içerir. S1 alt birimi, reseptör bağlama alanı (RBD) içerir (**Heald-Sargent ve Gallagher**, 2012). S1 alt biriminin RBD'sinin reseptör bağlama motifi ile ACE2 reseptörü arasındaki etkileşim, konakçı hücrelere girişi sağlamaktadır. Tüm CoV'lerde konakçı-virüs entegrasyonu sırasında, konakçı proteazlar ve katepsinler gibi lizozomal proteazlar S proteinlerini parçalar (**Shang vd.**, 2020). Bu proteaz, konakçı hücreye viral girişte çok kritik bir rol oynamaktadır. S proteini, anti-virüs nötralize edici antikorlar için çok önemli bir hedeftir ve içindeki önemli mutasyon, patogeneizde önemli değişikliklere yol açabilir.

M Protein

Virüs yüzeyinde yapısal proteinler arasında en bol bulunan proteindir ve virüs şekli için ana yapı iskelesi sağlar (**Arndt vd.**, 2010). M proteini 230 amino aside ve 25-35 kDa kütleyle sahiptir. Bu yapısal proteinlerin en küçüğüdür (**Arndt vd.**, 2010). Bu protein, konakçı hücreye girişte ve virüs olgunlaşmasında rol oynar (**Thomas**, 2020). Viral enfektivitenin, M proteininin viral S proteinine ve membran füzyonunu kolaylaştıracak olan konakçının yüzey reseptörlerine bağlanma yeteneği ile bağlantılı olduğu öne sürülmüştür (**Pamukçu**, 2021). Koronavirüs virion birleşimi ve morfogenezindeki önemi nedeniyle M proteini, viral replikasyon kontrolünde ve genomik RNA'nın viral partikül paketlenmesinde önemli bir rol oynayabilir (**Hu vd.**, 2003).

N Protein

43-50 kD'luk bir moleküler ağırlığa sahip olan bu protein, RNA'ya bağlanabilir ve arginin ve lizin aminoasit dizileri aracılığıyla onunla etkileşime girebilir (**Chang vd.**, 2006). N proteini, RNA genomuna bağlanan tek proteindir (**de Haan vd.**, 2005). N proteini, bir N-terminal alanı (NTD) ve bir C-terminal alanı (CTD) olmak üzere iki ayrı alandan oluşur. Optimal RNA bağlanması için bu iki alanın da katkısının gerektirdiği ileri sürülmüştür (**Chang vd.**, 2006). Bu proteinin, viral olmayan ve viral RNA arasında ayırım yapma yeteneği gibi işlevleri etkileyebilecek ve virüs olgunlaşmasını ve toplanmasını etkileyebilecek şekilde birden fazla pozisyonda fosforile olduğu bilinmektedir (**Chen vd.**,

2019). Fosforilasyon için temel mekanizma ise belirsizliğini korumaktadır. N proteini ayrıca viral transkripsiyon kontrolüne ve genomik RNA replikasyonuna da dahil olabilir (Cong vd., 2020). Moleküler düzeyde, N'nin birincil rolü, virüs genomu RNA'sını uzun sarmal RNP'lere paketlemek ve viral genom ve membran proteini M ile etkileşimler yoluyla virion düzeneğine katılmaktır (Pamukçu, 2021). Tanısal ve immünojenik bir antijen olarak, N proteini ayrıca konakçı immün yanıtında immünodominant bir antijendir (Bai vd., 2021).

E Protein

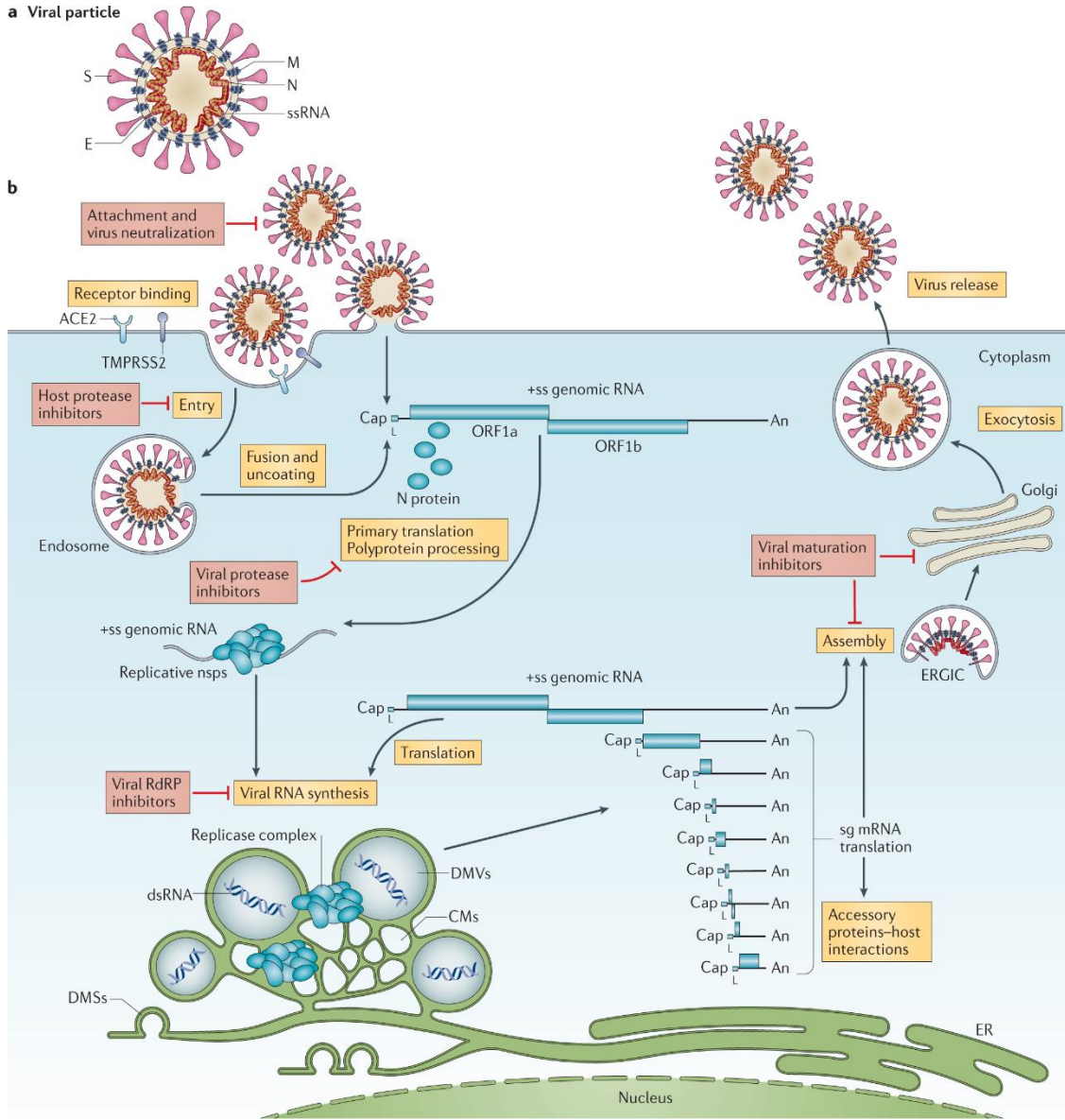
~74–109 amino asit uzunluğunda ve 8.4–12 kDa moleküler ağırlığa sahip küçük bir hidrofobik proteindir (Pamukçu, 2021). E proteini, ana yapısal proteinlerin en küçüğü ve en az bilinenidir. Tomurcuklanan virüslerde iyon kanalı fonksiyonu, viroporin aktivitesi ve viral montaj için gereklidir (Schoeman ve Fielding, 2019). E ve M proteinlerinin birlikte ekspresyonu, S proteininin konakçı hücrelerde ER-Golgi ara bölgesine veya Golgi bölgesine hareket etmesine neden olur. Apoptoz, E protein genindeki bir mutasyon tarafından indüklenir (Schoeman ve Fielding, 2019). E proteini içermeyen içermeyen rekombinant CoV'lerin önemli ölçüde azalmış viral titreler sergilediği, viral olgunlaşmayı engellediği veya yetersiz soy ürettiği gösterilmiştir. Bu nedenle virüs üretimi ve olgunlaşmasında E proteini önemli bir göreve sahiptir (DeDiego vd., 2007; Ortego vd., 2002)

Aksesuar Proteinler

ORF 3a, 3a yardımcı proteini kodlar ve 828 nükleotid uzunluğundadır (Wang vd., 2020). Protein 3b'nin SARS-CoV-2 üzerine yapılan yeni araştırmalarda keşfedilmiştir (Wu vd., 2020). ORF 6, 61 amino asitli Orf6 aksesuar proteinini kodlayan 186 nükleotidli bir gendir (Wang vd., 2020). ORF 7a ve ORF 7b sırasıyla 366 ve 132 nükleotid içerir (Wang vd., 2020). Protein 7a'nın, apoptozu indükleyerek ve enfekte hücrelerde hücre döngüsünü durdurarak ve proinflamatuvar sitokinlerin üretimini uyararak viral patogeneizde rolü aldığı düşünülmektedir (Schoeman ve Fielding, 2019). ORF8, 366 nükleotid protein kodlayan bir gendir. İnflamasyonları aktive ettiği ve hücre içi stres yollarını başlattığı gösterilmiştir (Shi vd., 2019). Bir enfeksiyon meydana geldiğinde, konakçı hücre 97 amino asitli bir protein olan ORF9b'yi salgılar. Mitokondriyi hedefleyerek, immünolojik kaçınma sürecinde önemli olan esnek adaptör TOM70 ile bağlantı kurar. ORF 10, 117 nükleotid kodlama dizisidir (Wang vd., 2020). ORF10 proteininin SARS-CoV-2 enfeksiyonunu PCR tabanlı yöntemlerden daha hızlı tanımlamak için kullanılabileceği beklenmektedir (Khailany vd., 2020).

1.1.8 SARS-COV-2'nin yaşam döngüsü ve koronavirüslerin hücre girişi

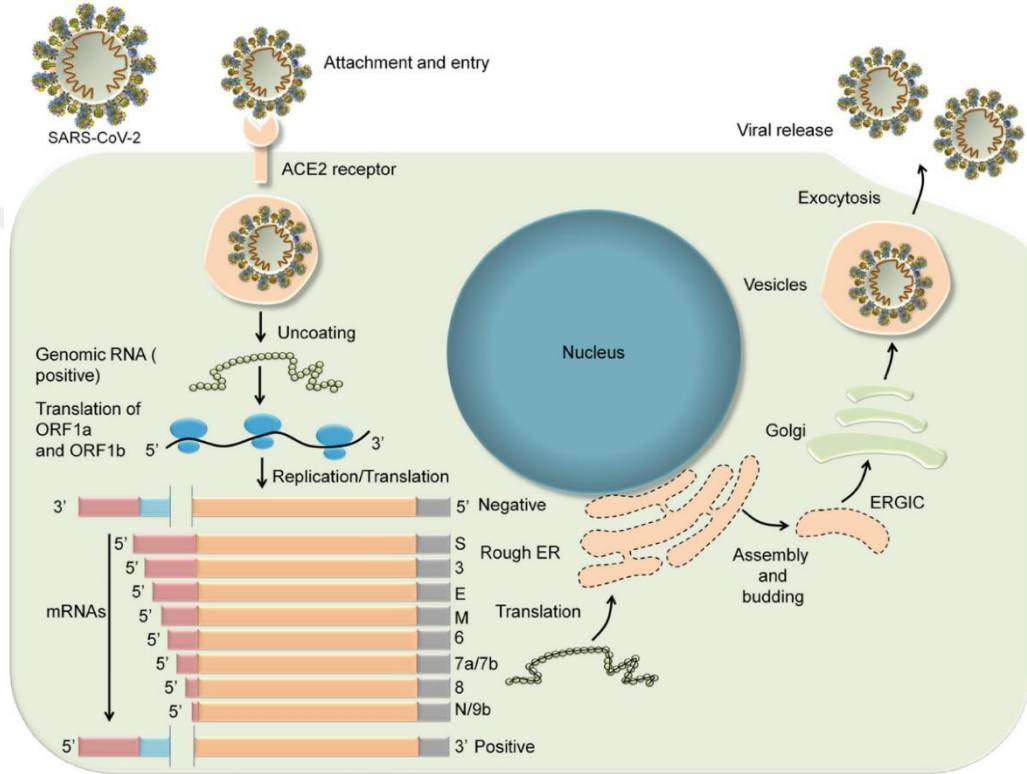
SARS-CoV-2 virüsünün bir konak hücreye girebildiği üç temel süreç vardır: reseptöre bağlanma, proteoliz, ve endozomlarda membran füzyonunun tetiklenmesi (Şekil 1.5) (Boopathi vd., 2020).



Şekil 1.5: SARS-COV-2'nin yaşam döngüsü (Vkovski vd., 2021).

Hem endozomlar hem de plazma membran füzyonu, SARS-CoV-2 için giriş mekanizmalarıdır. ACE2 reseptörü ile S glikoprotein etkileşimi, her iki kısımda da konformasyonel değişiklikler gerektirir. SARS-CoV-2 durumunda, proteaz TMPRSS2 ve lizozomlar, S proteinini iki parçaya böler: S1 ve S2 (Wang vd., 2020). S1 segmenti, ACE2'ye bağlanan RBD'yi içerirken, S2 bileşeni membran füzyonu için çok önemlidir

(**Brielle vd., 2020**). Bağlanmanın ardından virüs, bir endositik yolla füzyona uğrar ve viral RNA'yı sitoplazmaya bırakır (**Wang vd., 2008**). Endozomların içi, bir proton pompasının varlığından dolayı asidik bir pH'a sahiptir (**Gerasimenko vd., 1998**). Ek olarak, sistein proteazlar, büyük olasılıkla katepsin, virüsün sitoplazmadan pH'a bağlı bir şekilde salınmasını sağlar (Şekil 1.6) (**Hoffmann vd., 2020**). Endozomalden bağımsız olmayan giriş, alternatif giriş mekanizmasıdır. Hücre zarıyla ilişkili serin proteaz, TMPRSS2, S proteinini S1 ve S2 alanlarına aktive eder/parçalar.



(S proteininin S1 alanı, konak hücre yüzeyindeki ACE2 reseptörü ile etkileşime girdiğinde, S2 alanındaki konformasyonel değişiklikler, içselleştirmeye ve ardından membran füzyonuna neden olur. Düşük bir pH ve pH'a bağlı sistein proteaz katepsin L, endozomal süreci destekler. Diğer giriş mekanizması endozomal olmayan/klatrin bağımsız mekanizmadır. S proteininin TMPRSS2 tarafından S1 ve S2 alanlarına bölünmesi aracılık etmektedir).

Şekil 1.6: SARS-CoV-2 ana hücreye giriş modeli (Shereen vd., 2020).

Virüsün genomu, hücrenin sitoplazmasına salındıktan sonra, konakçı hücrenin mekanizması tarafından bir mRNA olarak çevrilir, bu da RNA sentezi için gerekli enzimlerin üretilmesiyle sonuçlanır (**Pamukçu, 2021**). İlk gen, replikasyonu başlatan replikaz enzimine çevrilir. PLpro ve Mpro, bu enzimi 16 nsp'ye dönüştüren iki viral proteazdır. Replikasyon sürecinin bir parçası olarak, negatif iplikli RNA sentezlenir ve genomik RNA için bir şablon olarak kullanılır. (**Pachetti vd., 2020**). sgRNA'lar, replikaz poliproteinlerinin aşağı akışında yer alan yapısal ve yardımcı genler için mRNA'lar olarak

hizmet eder. Lider dizinin (TRS-L) 3' ucunda bulunan transkripsiyon düzenleyici diziler (TRS'ler), her TRS dizisinde transkripsiyonu sonlandıran RdRp yoluyla transkripsiyonu kontrol eder. Bu nedenle, transkripsiyon işlemi süresizdir ve ortaya çıkan sgRNA, yapısal, yapısal olmayan ve yardımcı proteinlere çevrilir ve yeni virüslerin oluşumuyla sonuçlanır (**Sakr vd.**, 2021). Replikasyon, transkripsiyon ve translasyonun ardından endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtı virion partiküllerini birleştirir (**Masters**, 2006). SARS-CoV-2 virüsünün montaj süreci hala bir sır olarak kalmaktadır. Coronavirüs bulaşmış hücreler, iki farklı süreç yoluyla virionları serbest bırakır: sarmal nükleokapsidler ve viral zarf yapısı.

N proteini ve RNA, nükleokapsidi oluşturur. Bazen M proteini de tespit edilir (**de Haan ve Rottier**, 2005). N proteini, çeşitli işlevleri olan bir glikoproteindir. Replikasyon ve transkripsiyonu kolaylaştırmak için öncelikle lider RNA'ya bağlanır. Viral genom ile etkileşime girer ve onu ribonükleoprotein (RNP) kompleksi adı verilen sarmal bir yapı içinde kapsüller (**McBride vd.**, 2014). Ek olarak, N proteini nsp3 ve M proteinleri ile etkileşime girerek genomu bir araya getirmek için replikasyon-transkriptaz kompleksini (RTC) oluşturur (**Hsieh vd.**, 2005). İkinci adımda, viral zarf, hücrelerin hücre içi zarlarında birleştirilir. Normal olarak, hücresel zarlardan tomurcuklanan viral nükleokapsid, zarflı virüsler için zarları sağlar. ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment), SARS-CoV'lerin hücre içi zarlarda olduğu yerdir. Daha sonra lümen içinde tomurcuklanma gerçekleşir ve partiküller ekzositoz yoluyla salınır (**Gupta vd.**, 2021). Viral zar proteinleri, viral zarfın gelişiminde çok önemlidir. M ve E proteinleri virion montajı ve salımı için gereklidir, ancak E proteini sadece eser seviyelerde saptanabilir. Sonuç olarak, montaj çoğunlukla M proteinleri arasındaki etkileşimlere bağlıdır (**De Haan vd.**, 2000). M proteini ayrıca nükleokapsid bağlanması için bir matris görevi görerek tomurcuklanmanın gerçekleşmesine izin verir.

1.2 COVID-19 Önleme: Aşı Geliştirme

SARS-CoV ve MERS-CoV ilgili yapılan önceki araştırmalar, SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikoları aktive etmek için potansiyel antijenlerin tanımlanmasını kolaylaştırmıştır (**Zost vd.**, 2020). Spike proteininin S1, RBD ve S2 alt birimleri dahil olmak üzere SARS ve MERS aşılı, önemli nötralize edici antikor titreleri üretmektedir (**Dai vd.**, 2020). Etkin ve güvenli bağışıklama için istenen antijen bulunduğunda adjuvanlar, endüstriyel işlemler ve dağıtım mekanizmaları seçilebilmektedir. SARS-CoV-

2'nin genomik ve yapısal bilgilerinin hızlı erişilebilirliğinin yanı sıra (R. Lu vd, 2020), gelişmiş yeni aşılama platformu teknolojileri de aşı geliştirmeye yardımcı olmuştur (Lurie vd., 2020). SARS-CoV-2 proteinleri ve alt birimleri, canlı zayıflatılmış ve inaktive edilmiş virüsler, bir viral antijeni kodlayan nükleik asitler, replike olan ve olmayan viral vektörler, virüs benzeri partiküllerin tümü COVID-19 aşıları olarak geliştirilmektedir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2: Farklı tipte COVID-19 aşılarının geliştirilmesi

Aşı formu	Antijen	Üretimi	Avantajları	Dezavantajları
İnaktive Edilmiş Virüs	Tüm virion	Isı, kimyasallar veya radyasyon uygulamalarıyla virüs parçacıkları etkisiz hale getirilir.	Güvenli ve yapımı basit, yüksek nötrleştirici titrelere sahip antikorlar.	Aşırı duyarlılık olası bir neden olabilir.
Canlı/ Zayıflatılmış Virüs	Tüm virion	Virülans azaltılması	Daha az yan etkisi vardır ve bağışıklık sistemi yüksek düzeyde aktive olur.	Fenotipik veya genotipik reversiyon tüm yaş grupları için uygun değildir.
RNA	S proteini	Antijen üretmek için genetiği değiştirilmiş RNA üretimi	Daha yüksek derecede uyarlanabilirliğe sahip ve güçlü bir bağışıklık tepkisini tetikleyebilen basit yapı.	Yüksek istikrarsızlık ve güvenlik endişeleri
DNA	S proteini	Antijen üretmek için genetiği değiştirilmiş DNA üretimi	Geliştirmesi ve üretmesi kolay olan yüksek titreli nötrle edici antikorlar güvenli ve etkilidir.	Belirli bir taşıma aracına ihtiyaç vardır. Azaltılmış bağışıklık tepkileri ve tekrarlanan kullanımdan kaynaklanan toksisite.
Rekombinant protein	S proteini	Bütün veya alt birim antijenik bileşenleri üretilir.	Yüksek güvenlik, sürekli üretim ve hücrel ve humoral bir immünolojik tepki ortaya çıkarma yeteneği.	Yüksek maliyet, azalmış immünojenisite ve tekrarlanan dozlarla ve adjuvanlara duyulan ihtiyaç.
Viral Vektör Bazlı Virüs	S proteini	Hedef genin genetiği değiştirilerek üretim	Yüksek düzeyde hücrel ve humoral bağışıklık tepkilerini indükler ve güvenlidir.	Seçenek olarak çeşitli immünolojik yanıtların sunulması.

1.2.1 Nükleik asit aşıları

Enjeksiyondan sonra bir bağışıklık tepkisini tetikleme potansiyelinin keşfedilmesinden bu yana, bulaşıcı hastalıklar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara karşı aşılar için çok sayıda klinik deneyde nükleik asitler kullanılmıştır (Lopes vd., 2019). Nükleik asitlere dayalı

aşılar, yapılması kolay, güvenli ve yüksek oranda immünojenik oldukları için umut vericidir. (**Hasson vd.**, 2015). Genellikle bir hedef antijeni kodlayan plazmit vektörleri olan DNA aşıları, büyük miktarlarda kolaylıkla yapılır. Tipik protein/peptid veya tam virüs aşılarından farklı olarak, oldukça kararlı olduğu için DNA için soğuk depolama gerekli değildir (**Kutzler ve Weiner**, 2008). T hücresi aktivasyonu, APC'lerin MHC I ve II'lerinde antijenik peptitler göstermesine neden olan transgen ekspresyonu tarafından tetiklenir. Çıplak plazmid DNA aşıları, adaptif immün yanıtı artırmak için birkaç enjeksiyona veya bir adjuvan eklenmesine ihtiyaç duyan yeterli bir immünolojik yanıt oluşturmaz (**Hobernik ve Bros**, 2018).

COVID-19 pandemisi, DNA kullanan önceki çalışmaların aksine, birçoğunun S antijenini eksprese eden mRNA ile bağışıklamaya baktığı nükleik asit aşıları açısından bir paradigma kaymasına tanık oldu (**Jackson vd.**, 2020). mRNA bir hücrenin çekirdeğine girmez ve antijenik proteinlere translasyon için konakçı hücrenin sitoplazmasına iletilmesi yeterlidir (**Pamukçu**, 2021). Bağışıklık tepkileri, geleneksel protein veya tam virüs aşıları yerine mRNA aşıları kullanılarak güvenli, verimli ve düşük maliyetli bir şekilde uyarılabilir (**Pardi vd.**, 2018). Öte yandan, kararsızlık ve in vivo dağıtım, üstesinden gelinmesi gereken sınırlamalardır ve in vivo yarı ömrü ve antijen translasyonunu geliştirmek için çok sayıda modifikasyon ve dağıtım stratejisi kullanılmıştır (**Karikó vd.**, 2008; **Kauffman vd.**, 2016). DNA ve mRNA moleküllerinin APC'lere in vivo teslimi büyük bir zorluk olmuştur. Nükleik asit aşılarının immünojenisiteyi artırma yeteneği, nükleik asit dağıtım teknolojisi geliştikçe artmıştır (**Suschak vd.**, 2017). Fiziksel yaklaşımlar (**Wells vd.**, 2000), katyonik peptid dağıtımı (**Zeng vd.**, 2020), lipid ve polimer bazlı dağıtım (**Espeseth vd.**, 2020) lipid içeren zara başarılı bir şekilde nüfuz etmek için kullanılmıştır. İyonize olabilen bir katyonik lipid, kolesterol, polietilen glikol (PEG) ve doğal olarak oluşan fosfolipidler (LNP'ler), mRNA'ların taşınması için en çok kullanılan araçlardan biri haline gelmiştir. mRNA aşılarının faz III klinik araştırmalarının ön sonuçları, COVID-19'u önlemede yüzde 95 (**Polack vd.**, 2020) ve yüzde 94,5 etkinliğini gösterdi. Pfizer/BioNTech'in BNT162b2'si, 2 Aralık 2020'de Birleşik Krallık'ta ve 11 Aralık 2020'de Amerika Birleşik Devletleri'nde acil kullanım için onaylanmıştır ve şu anda tüm dünyada yaygın olarak uygulanmaktadır. Ek mRNA aşılama platformları oluşturulmuş ve olağanüstü bağışıklık ve etkililik için doğrulanmıştır (**Petsch vd.**, 2012). Ayrıca, mRNA-1273 (Moderna) için semptomatik COVID19'un önlenmesine yönelik mRNA bazlı aşılar %94 oranında etkilidir. BNT162b2 ve mRNA-1273 aşılarının karşılaştırmalı etkinliği Dickerman ve diğerleri tarafından incelenmiştir. mRNA-1273 aşısının alıcılarının, BNT162b2 aşısının

alıcılarından daha yüksek bir SARS-CoV-2-bağlayıcı antikor yanıtına sahip olduğunu bulmuşlardır. mRNA içeriği, iki aşı arasındaki etkinlik farkını açıklayabilir (Dickerman vd., 2021). Soğuk zincir dağıtımının zorluklarına rağmen, COVID-19 mRNA aşıları, küresel sağlık krizini azaltmaya yardımcı olma ve bulaşıcı hastalıkların önlenmesinde umut verici potansiyele sahiptir.

1.2.2 Protein alt birim aşıları

S proteininin antijenikliği ve yapısı üzerine yapılan çalışmalar, S2 alt birim alanının hem SARS-CoV hem de SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorları indüklediğini ortaya koymaktadır. S1, RBD ve S2 alanları kullanılarak nötralize edici olmayan antikorların üretimini önleyen alternatif protein aşıları geliştirme çabaları olmuştur (L. Liu vd., 2020). Bununla birlikte, protein alt birimlerinin immünojenisitesi sınırlıdır ve adjuvanlar yardımıyla immün yanıt tetiklenmelidir (Pamukçu, 2021). SARS-CoV-2'nin diğer yapısal proteinlerinin epitopları da aşı adayları olarak kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (Ahmed vd., 2020). Özellikle yüksek oranda immünojenik ve bol miktarda üretilen N proteini, potansiyel bir aşı hedefi olarak kabul edilmiştir (Dutta vd., 2020). Yapısal alt birim proteinlerine karşı T hücresi tepkilerinin baskın ve uzun süreli olduğu gözlenmiş olup, alt birim aşıları artık klinik deneylerde denenmektedir (Grifoni vd., 2020).

1.2.3 Canlı-zayıflatılmış ve tam olarak inaktive edilmiş virüsler

Coronavirüsler, replikasyon için gerekli olmayan ve in vivo olarak modifiye edilerek zayıflatmaya neden olan yapısal olmayan proteinlere sahiptir. Örneğin, birkaç zoonotik koronavirüsü zayıflatmak için E proteinlerinin silinmesi uygulanmıştır (Pamukçu, 2021). Birkaç canlı zayıflatılmış viral aşı için klinik öncesi denemeler devam etmektedir ve Codagenix'ten COVI-VAC, faz I'de COVID-19'a karşı canlı zayıflatılmış bir aşıdır (NCT04619628). Çocuk felci, hepatit A ve grip, etkisiz hale getirilmiş virüsler kullanılarak etkili bir şekilde tedavi edilmiştir (Nunnally vd., 2015). İnaktive virüs aşıları, virüsleri hücre kültüründe çoğaltarak ve ardından formaldehit veya beta-propiolakton depurinasyon ile etkisiz hale getirerek üretilebilir (Qiang vd., 2020). RNA'ları yok edildiğinden canlı zayıflatılmış virüslerden daha güvenli oldukları düşünülürken, hala bağışıklık tepkilerini aktive edebilen sağlam viral epitoplar içerirler (Watanabe vd., 2020). İnaktive edilmiş virüslerin immünojenisitesi, replike olamamaları nedeniyle azalır ve uzun süreli bağışıklama, adjuvanlarla birkaç enjeksiyon gerektirir (Lauring vd., 2010). Sinovac COVID-19 aşısı CoronaVac, Sinovac Biotech tarafından üretilen inaktif bir viral COVID-

19 aşısıdır. Brezilya, Şili, Endonezya, Filipinler ve Türkiye'deki Faz III klinik denemelerinde test edildi ve Sinopharm BIBP ve Covaxin gibi diğer inaktive COVID-19 aşıları gibi klasik teknolojiyi kullanmaktadırlar. Türkiye'nin Faz III bulguları % 83,5 etkinlik ortaya koymuştur. Brezilya'nın faz III çalışmasından elde edilen bulgular Lancet'te yayınlandı ve yüzde 50,7 semptomatik enfeksiyon önleme ve yüzde 83,7 hafif vaka önleme ortaya çıkardı (**Palacios vd.**, 2021; **Tanriover vd.**, 2021). DSÖ, 1 Haziran 2021'de acil kullanım için Sinovac-CoronaVac COVID-19 aşısını onaylamıştır.

1.2.4 Rekombinant viral vektörler

Rekombinant viral vektörler, hedef hastalıkların antijenlerini ifade etmek için kullanılan uyarlanabilir aşılama platformlarıdır (**Ura vd.**, 2014). Hedef antijen(ler) için genleri iletmek için viral vektörler kullanılır (**Waehler vd.**, 2007). Teslimat için rekombinant viral vektörlerin kullanımı, doğal enfeksiyonu taklit eden ve bir adjuvana ihtiyaç duymadan önemli T hücresi yanıtlarını uyaran bir sistemdir (**Humphreys ve Sebastian**, 2018). Rekombinant viral vektörler, verimli üretimleri nedeniyle aşı uygulaması için de çekicidir (**Choi ve Chang**, 2013). Adenovirüs tip 5 (Ad5) tipik olarak antikor titreleri sergilemiştir (**Mercado vd.**, 2020). Bu aşı yönteminin insan olmayan primatlarda ve insanlarda HIV ve Ebola bağışıklaması için etkili olduğu kanıtlanmıştır (**Barouch vd.**, 2018).

SARS-CoV-2 S proteinini kodlayan Ad5 vektörünün kas içi iletimi, Faz II klinik deneylerinde değerlendirilmiştir (**F.C. Zhu, Li vd.**, 2020).

İnsanlar geçmişten günümüze birçok salgın hastalıkla mücadele etmişler ve çok yüksek sayılara ulaşan ölüm vakaları ile karşılaşmışlardır. Kuş gribi, çiçek hastalığı, İspanyol gribi, sarı humma, veba, kolera, Ebola, MERS ve SARS gibi salgınlar kimi zaman belirli coğrafyalarla sınırlı salgınlar olarak görülmüş, kimi zaman da kıtalar arasında yayılarak pandemiye dönüşmüştür. Pandemi süreçlerinde salgının önlenmesi için birçok aşı geliştirme çalışmaları yürütülmüştür. Aşıların asıl hedefi uygulama sonrasında kişilerde spesifik antikorların istenilen düzeyde üretilmesidir. Konuya bu açıdan bakıldığında etkili bir aşının geliştirilmesi aslında etkili antikor üretimi ile olabilmektedir. Her bir aşının etkinliği üretilen antikor düzeyi ile sınırlıdır. Bu yüzden aşı geliştirme çalışmalarında nötralizasyon antikor testleri yapılmaktadır. Nötralizan antikor testlerinde canlı SARS-CoV-2 virüsü yerine bu virüsü başarıyla temsil eden pseudovirüslerin kullanılması güvenlik açısından oldukça önemlidir. Pseudovirüsler, gen terapi ve ilaç geliştirme çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır.

1.3 Pseudovirüsler ve Nötralizan Antikor Testleri

Canlı SARS-CoV-2 çalışmaları, biyogüvenlik seviyesi 3 laboratuvarlarıyla sınırlıdır. Bu, SARS-CoV-2 araştırmasını dünya çapındaki çoğu araştırma laboratuvarı için erişilemez hale getirmiştir ve alternatif bir çözüm olarak pseudovirüsler, SARS-CoV-2'ye karşı aşı ve terapötiklerin geliştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Pseudovirüsler, çekirdeği, omurgası ve yüzey proteinleri farklı virüslerden türetilen bir tür rekombinant virüstür (**Sanders**, 2002). Pseudovirüslerin içindeki genler, doğal yüzey protein ekspresyonunu ortadan kaldırmak için genellikle değiştirilmekte veya modifiye edilmektedir. Pseudovirüsler ilk olarak 1960'larda, bilim adamlarının sıgırlardan izole edilen bir veziküler stomatit virüsü (VSV) üzerinde çalışmaya başlamasından sonra geliştirilmiştir. Kültürde iyi replikasyona ek olarak, daha sonra yüzey proteini VSV-G'nin tüm ökaryotik hücrelere girişi kolaylaştırdığını ve virüsü yalnızca pseudovirüs olarak değil, aynı zamanda DNA'yı terapötik amaçlarla hücrelere iletmek için yararlı bir vektör haline getirdiği gözlenmiştir. İlk Ebola aşısı bir VSV platformu kullanılarak geliştirilmiştir ve daha yakın zamanda virüs, kanser hücrelerini aramak ve yok etmek için de tasarlanmıştır. Daha sonra alternatif yüzey proteinlerini eksprese etmek için ilave bir plazmit kullanılmıştır. Bu da duyarlı konakçı hücreleri enfekte edebilen ancak hücre içinde yalnızca tek bir tur için çoğalabilen bir pseudovirüs üretimini sağlamıştır (**Ory vd.**, 1996, ve **Zhang vd.**, 2017). Viral yüzey proteinleri, pseudovirüsün konakçı hücrelere girişinde çok önemli roller oynamaktadır. Pseudo viral yüzey proteinlerinin konformasyonel yapıları, doğal viral proteinlerinkine yüksek düzeyde benzerliğe sahiptir; bununla birlikte, pseudovirüsler yabancıl tip (YT) virüslere kıyasla virülansı azaltmış ve biyogüvenlik seviyesi 2 laboratuvarlarında güvenli bir şekilde işlenmelerine olanak sağlamış bulunmaktadır (**Welch vd.**, 2016). Sonuç olarak, pseudovirüsler hücre tropizm, reseptör tanıma, ilaç keşfi ve antikorların ve aşılarda geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (**Bartochs vd.**, 2003, **Radoshitzky vd.**, 2007, **Yang vd.**, 2020, **Nie vd.**, 2017, **Zetl vd.**, 2020). Pseudovirüslerin üretiminde lentivirüslerin omurgası kullanılabilir.

1.3.1 Lentivirüsler

Retroviridae familyasının yedi cinsinden biri olarak sınıflandırılan lentivirüsler, primat ve primat olmayan retrovirüsler olmak üzere dokuz virüs oluşmaktadır. Retrovirüs ailesinin tamamı replikatif, genetik organizasyon ve yapı özellikleri bakımından benzerdir.

Lentivirüslerin genomunun çapı 80-120 nm civarındadır ve tek sarmallı iki pozitif yüklü RNA içerir. Aynı zamanda, viral RNA'nın hücrel genoma entegre edilmiş çift katlı DNA'ya ters kopyalandığı benzersiz bir replikatif stratejiye sahiptir (**Coffin J.M. vd.**, 1997). Nükleokapsidi oluşturan replikasyon ve yapısal proteinler için gerekli enzimlere sahiptir. Ek olarak, bir çift lipit zarı ile kaplı bir protein kapsidine sahiptir (**Adamson ve Jones**, 2012). Lentivirüs genomlarında ortak retroviral genlerin ötesinde birkaç düzenleyici genin varlığı, bunların gelişmiş veya daha karmaşık retrovirüsler olarak kabul edilmesine yol açmıştır. Bu düzenleyici genler, konakçı hücre savunmasını devre dışı bırakmak, replikasyonu düzenlemek ve bağışıklık tepkilerini köreltmek gibi çeşitli ve oldukça özel görevlere sahiptir. Ayrıca, bazı proteinler bulaşıcı parçacıklar olarak paketlenabilir ve viral replikasyonun ilk aşamasında sentezlenebilir (**Bukrinsky ve Haffar**, 1999). Lentiviral vektörler, *in vivo* veya *in vitro* olarak bölünen ve bölünmeyen hücrelerin genomlarına entegre olma yeteneğine sahiptir (**Naldini ve Verma**, 1999). Lentivirüs genomu ortalama olarak 9-10 kb'dir. Lentivirüsler, ilgili genlerin virüs replikasyonu, entegrasyonu ve ekspresyonu için gerekli 600-900 nükleotit uzunluğunda homolog bölgelere (LTR: uzun terminal tekrarları) sahiptir. Bu homolog bölgeler (LTR: uzun terminal tekrarları) U3, R ve U5 bölümlerine ayrılmıştır. Tüm retrovirüslerde ortak olan gag, pol ve env genlerine ilave olarak, düzenleyici ve yardımcı proteinleri kodlayan bazı dizileri de bulunmaktadır. Gag geni, proteolitik olarak viral proteaz (PR) tarafından matris (MA), kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC) olmak üzere üç ana yapısal proteine bölünebilen bir polipeptidi kodlamaktadır (**Katz ve Skalka**, 1994). Pro geni, integras (IN) ve ters transkriptaz (RT) yapımında görev alan bir polipeptidi kodlar (**Katz ve Skalka**, 1994). Env geni; SU (yüzey) ve TM (transmembran) (bu iki protein; konakçı hücrenin hücrel reseptörleri ile etkileşime girerek, virüsün hücrenin içine girmesini sağlayan Env proteininin yapısal birimlerini oluşturmaktadır) protein alt birimlerine hücrel proteaz yardımıyla ayrılabilen polipeptidi kodlamaktadır (**Pluta**, 2009).

Bu enzimler, lentivirüslerin yaşam döngüsünde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu viral polipeptitlerin bölünmesi (aynı zamanda virüs olgunlaşmasında da rol oynar), viral RNA'nın çift sarmallı DNA'ya (provirüs) ters transkripsiyonu ve lentivirüsün hücrel genoma entegrasyonunu sağlar (**Katz ve Skalka**, 1994).

1.3.1.1 Lentivirüslerin yaşam döngüsü

Lentiviral yaşam döngüsü, Retroviridae ailesinin tüm üyeleri için benzerdir ve aşağıda özetlenen adımlardan oluşur. Lentivirüsün hedef hücre ile etkileşimi, viral zarf glikoproteininin, virüs için hücrel hedefi tanımlayan hücre zarı üzerindeki spesifik bir

reseptöre bağlanması yoluyla gerçekleşir (viral tropizm). Hücresel reseptöre bağlandıktan sonra viral membran, hücresel membran ile füzyona uğrar (**Maddon ve Axel, 1988**). Viriona bağlı matris ve kapsid proteinleri demonte edildikten ve nükleoprotein kompleksi hücrelere verildikten sonra sitoplazmada ters transkripsiyon başlar. Çoğu retrovirüs için ortak olan bir özellik, heterolog bir zarf glikoproteini (**Schnitzer vd., 1977** ve **Lambright, 1977**) içeren sahte, retroviral parçacıklar oluşturma yeteneğidir. Veziküler stomatit virüsünün (VSV-G) zarf glikoproteini G, gen verme vektörlerinin gelişimine iki büyük avantaj sağladığı için bu tür pseudotipleri oluşturmak için yaygın olarak kullanılır. İlk olarak, VSV'nin hedef hücreye girişi, hücre zarının her yerde bulunan fosfolipid bileşenlerine bağlanma yoluyla gerçekleşir: fosfatidilinositol, fosfatidilserin ve GM3 gangliosid (**Mastromarino vd., 1987**). Bu giriş modu, VSV'ye (ve VSV-G ile pseudotiplenen çoğu retrovirüse) balık, *Xenopus*, sivrisinek ve *Lepidoptera*'dan türetilen memeli olmayan hücreleri içeren geniş bir konak aralığı sağlar (**Burns vd., 1993**). İkincisi, VSV zarfı oldukça kararlı viral partiküller oluşturur. Bu artan stabilite sayesinde, vektörlerin verimli konsantrasyonu, ultrasantrifüjleme ile elde edilebilir (**Burns vd., 1993**; **Akkina vd., 1996**). Vektörlerin konsantrasyonu, büyüklük olarak yaklaşık 2 kat artan titrelelere yol açar. VSV'den gelen tek elementin glikoprotein G olduğu ilk VSV-G pseudotipli retroviral vektör, Burns ve arkadaşları tarafından elde edilmiştir (**Burns vd., 1993**; **Akkina vd., 1996**). Bu vektör, murin lösemi virüsünün çekirdeğini ve genomunu içeriyordu. Ultrasantrifüjleme ile konsantre edildiğinde, bu vektör mililitrede (IU/ml) yaklaşık 10⁹ enfeksiyöz birim titresi elde edilmiştir.

1.3.1.2 Ters transkripsiyon

Ters transkripsiyon, primer olarak hücresel tRNA kullanılarak tek sarmallı bir RNA şablonundan çift sarmallı, doğrusal DNA'nın sentezine yol açar. Viral replikasyonda bu adımı katalize eden enzim, ters transkriptaz, düzeltme yeteneğinin olmaması nedeniyle düşük doğruluğa sahiptir ve bu nedenle, viral genomun yüksek değişkenliğinden kısmen sorumludur.

1.3.1.3 Entegrasyon

Lineer viral DNA'nın sentezi tamamlandıktan sonra viral integraz, 5' ve 3' terminallerinde spesifik bölünmeler gerçekleştirir ve konakçı genoma entegrasyonu katalize eder. Entegrasyon, retroviral gen ekspresyonu (**Sakai vd., 1993**; **Masuda vd., 1995**) için esastır ve provirüsün konakçıda kalıcı bir genetik unsur haline gelmesine izin vermektedir.

1.3.1.4 Transkripsiyon ve viral protein sentezi

Provirüsten erken transkripsiyon, Rev, Tat ve Nef'i kodlayan mRNA'ların üretilmesiyle sonuçlanır. mRNA'nın translasyonu Tat ve Rev'in birikmesine yol açar. Tat ve Rev birlikte "geç" transkripsiyon moduna geçişi indükler, bu sayede eklenmemiş ve tek eklenmiş RNA türleri birincil olarak üretilir. Eklenmemiş ve tek tek eklenmiş mRNA'lar, viral soy üretimi için gerekli yapısal genleri kodlar.

1.3.1.5 Virion montajı ve serbest bırakılması

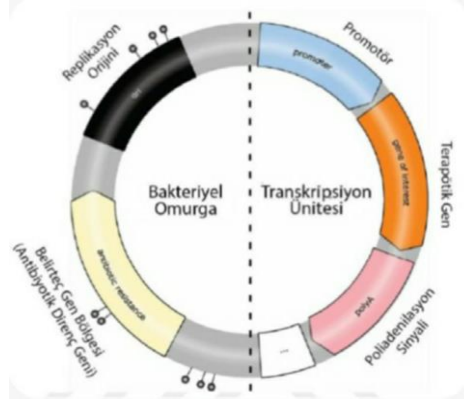
Viral RNA ve yapısal proteinler viral partiküller halinde paketlenir ve plazma zarında tomurcuklanarak serbest bırakılır. Poliproteinler, Gag ve Gag/Pol viral proteaz tarafından parçalandıktan sonra, olgun partiküller tamamen bulaşıcı hale gelir. Halihazırda mevcut lentiviral vektörlerde, gag/pol transfer yapısında mevcut değildir, ancak bir paketleme yapısı tarafından trans olarak sağlanır (**White ve Planelles** 1999; **Naldini vd.**, 1996). Bu nedenle, transfer vektörü konakçı hücreye entegre edildiğinde, gag/pol üretimini yönlendirememesi, sonraki viral soy olmamasını sağlar.

1.3.2 Lentiviruslerin geleneksel ekspresyon sistemlerinden farkı

Memeli hücreleri aktif olarak plazmitleri kopyalamaz, hücreler bölünürken plazmit vektörünü kaybedebilir. Lentivirüsler, genetik materyallerini konakçı hücreye entegre eder, böylece ilgili cDNA'nın stabil ve uzun süreli ekspresyonuna izin verir. Primer hücreleri ve bazı ölümsüzleştirilmiş hücre hatlarını transfekte etmek zordur. Lentivirüsler bu konuda oldukça verimlidir ve pseudotipleme kullanımı yoluyla çok çeşitli hücre tiplerini enfekte edebilirler (**Dufait vd.**, 2012).

1.4 Vektörler

Genetik bilginin bir hücreye transferini kolaylaştırmak için vektör adı verilen araçlarla oluşturulur. Vektörler, viral ve viral olmayan iki dağıtım sistemine ayrılabilir. En yaygın olarak kullanılan viral vektörler, adeno-ilişkili virüs (AAV), adenovirüs ve retrovirüsten türetilir. Viral olmayan vektörler, bakteriyel çift sarmallı plazmit DNA, oligodeoksinükleotitler veya bunlara benzer kimyasal olarak sentezlenmiş bileşikler olabilir (**Howarth vd.**, 2009).

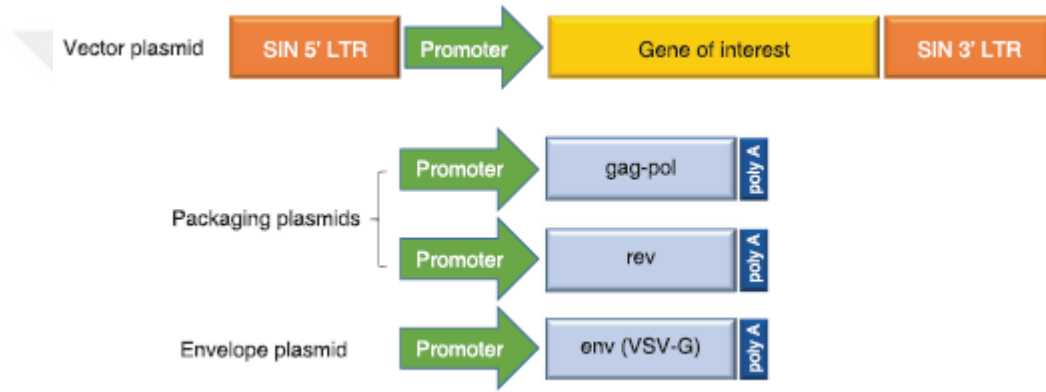


Şekil 1.7: Plazmid vektörü.

1.4.1 Lentiviral vektörler

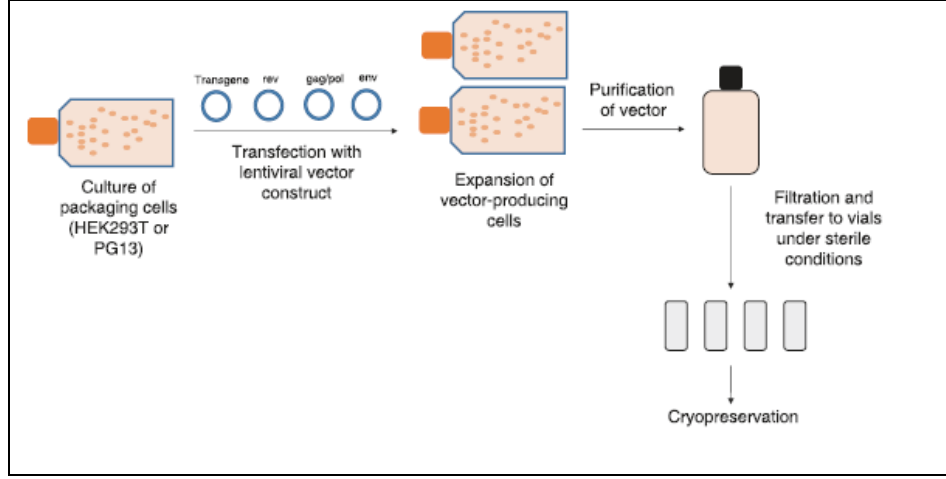
Lentiviral Vektörler Retrovirüs ailesine ait Lentivirüslerden yapılıdır. Lentivirüs ailesinin en yaygın kullanılan türü insan immün yetmezlik virüsü-1'dir (HIV-1). Lentivirüsler konakçı hücreye önemli miktarda genetik bilgi aktarabildiğinden, bu vektörlerin kullanımı gen terapisinde gen transferinin en etkili yöntemlerinden biri olarak kabul edilir. Birinci nesil lentiviral vektörler, gag ve pol genleri dahil olmak üzere HIV genomunun önemli bir bölümünü ve birkaç ek viral proteini içeriyordu (**Vannucci vd.**, 2013). Başka bir virüsün, en yaygın olarak VSV-G'nin zarf proteini, ilk nesil lentiviral vektörlerin tasarımına dahil edildi. VSV-G, en son düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü (**Finkelshtein vd.**, 2013; **Amirache vd.**, 2014) olarak tanımlanan, her yerde eksprese edilen bir reseptörü tanımlar ve lentiviral vektörün geniş bir hücre yelpazesini transdükte etmesine izin verir (**Burns vd.**, 1993). VSV-G geni, diğer lentiviral genlerden ayrı bir plazmit üzerinde kodlanmıştır. Lentiviral yardımcı genler vif, vpr, vpu ve nef ile düzenleyici genler tat ve rev birinci nesil lentiviral vektörlere dahil edilmiştir. Vif, vpr, vpu ve nef, lentiviral için hayatta kalma/uygunluk avantajları sağlar. İn vivo replikasyon, virüsün in vitro büyümesi için gerekli değildir; tat ve rev viral replikasyon için gereklidir. Vif, vpr, vpu ve nef aksesuar virülans faktörlerini içermeyen daha güvenli ikinci nesil lentiviral vektörler daha sonra geliştirilmiştir (**Vannucci vd.**, 2013). Yardımcı genlerin çıkarılması, genetik materyalin konakçı hücreye transferini engellemiştir. Üçüncü nesil lentiviral vektörler, viral genomu ayrı plazmitlere bölerek güvenliği daha da artırdı ve rekombinant virüs oluşumunu daha da olası hale getirmiştir (Şekil 1.8) (**Dull vd.**, 1998). Üçüncü nesil sistemde, gag ve pol genleri, sisteminkinden farklı bir plazmit üzerinde kodlanmıştır. Üçüncü nesil lentiviral vektörler, viral genomu ayrı plazmitlere bölerek güvenliği daha da

artırdı ve rekombinant virüs oluşumunu daha da olası hale getirdi (Şekil 1.8) (Dull vd., 1998). Üçüncü nesil sistemde, gag ve pol genleri, rev veya env genlerinden farklı bir plazmid üzerinde kodlandı ve bu, paketlenme için gerekli viral dizileri içeren üç ayrı plazmitten yapılan bir vektörle sonuçlandı. Tat geni, transgeni içeren yapının yukarı akış LTR'lerine yapısal olarak aktif bir promotör düzenlendiğinde gereksiz işlevi nedeniyle üçüncü nesil lentiviral vektörlerde çıkarıldı. Üçüncü nesil lentiviral vektörler iki ayrı paketlenme plazmitinden oluşur, biri kodlama gag ve pol ve başka bir kodlama rev. Ek bir plazmit, VSV-G'den türetilen zarf proteinini kodlar. İlgili geni kodlayan plazmid, rekombinasyonu önlemek için kendi kendini etkisiz hale getiren (SIN) olacak şekilde değiştirilmiş lentiviral LTR dizileri içerir.



Şekil 1.8: Üçüncü nesil lentiviral vektör.

Üçüncü nesil lentiviral vektörler iki ayrı paketlenme plazmitinden oluşur. Ek bir plazmit, VSV-G'den türetilen zarf proteinini kodlar. İlgili geni kodlayan plazmid, rekombinasyonu önlemek için kendi kendini etkisiz hale getiren (SIN) olacak şekilde değiştirilmiş lentiviral LTR dizileri içerir. Kendini inaktive eden (SIN) lentiviral vektörler oluşturmak için viral genomun 3'LTR'sine silmelerin dahil edilmesi, LTR'nin promotör/arttırıcı aktivitesini bozarak güvenliği daha da artırdı (Dull vd., 1998). Üçüncü nesil SIN lentiviral vektörlerinde kullanılan dahili promotörlerin seçimi de önemlidir. Bir lentiviral vektörün üretimi, GMP (Good Manufacturing Practices) şartlarını sağlayan bir tesiste hücre hattının kültürüyle başlar. Hücreler, üçüncü nesil lentiviral vektörü oluşturan plazmitlerle transfekte edilir ve vektör üreten hücreler, kültürde çoğaltılır. Vektör, hücrelerden ve kültür artıklarından arındırılır ve sterilitiyi sağlamak için filtrelenir ve tek tek alikotlar dondurularak saklanır (Şekil 1.9).

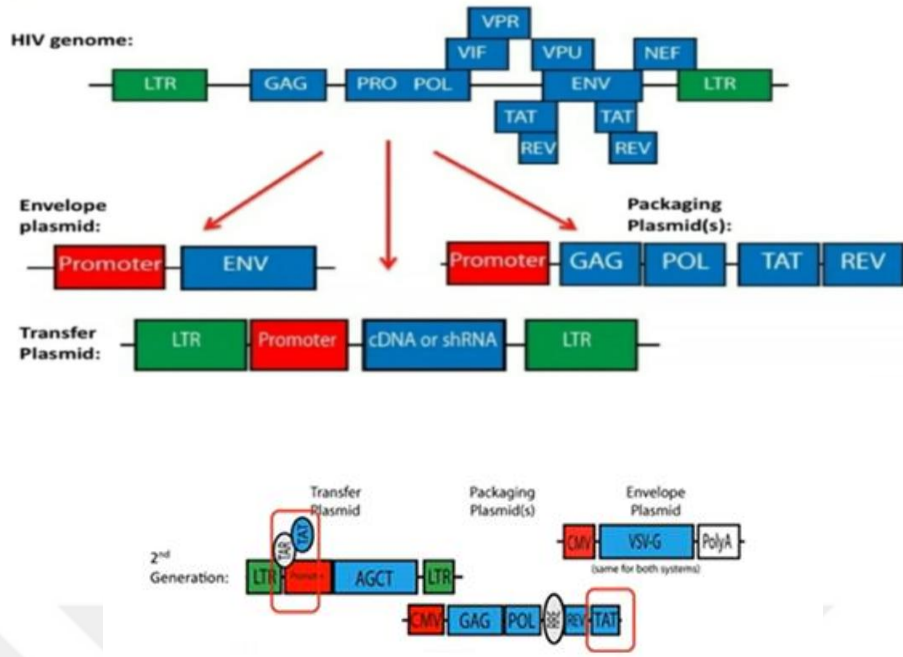


Şekil 1.9: Vektör üretimi.

1.4.2 Lentivirüslerin genetik organizasyonu

2. Nesil Lentiviral Plazmitler

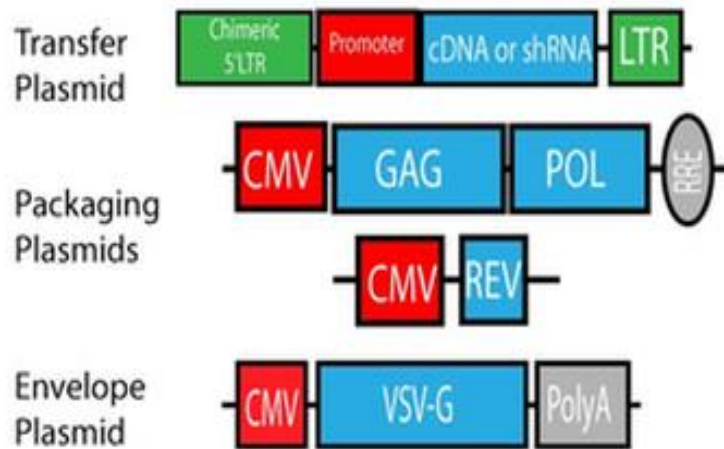
2. nesil lentiviral sistemini oluşturan üç plazmit dağılımını Şekil 1.10’da görülmektedir. Bu sistem Gag, Pol, Rev ve Tat genlerini kodlayan tek bir paketleme plazmidi içermektedir. Transfer plazmidi viral LTR’leri ve psi paketleme sinyalini içerir. Bir dahili promotör sağlanmadıkça, gen ekspresyonu, zayıf bir promotör olan ve ekspresyonu aktive etmek için Tat’ın varlığını gerektiren 5’LTR tarafından yürütülür (**Cronin vd.**, 2005). Zarf proteini Env (genellikle VSV-G) üçüncü, ayrı bir zarf plazmitinde kodlanmaktadır. Tüm 2. nesil lentiviral transfer plazmitleri, 2. nesil paketleme sistemi ile kullanılmalıdır (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>). Çünkü LTR’den gelen transgen ekspresyonu Tat’a bağlı olmaktadır.



Şekil 1.10: 2. Nesil lentiviral plazmitlerin şematik gösterimi (<https://www.addgene.org/>)

3. Nesil Lentiviral Sistem

3. nesil sistem, 2. neslin güvenliğini birkaç önemli yolla daha da geliştirmektedir. İlk olarak, paketleme sistemi iki plazmide bölünür: biri Rev'i kodlarken diğeri Gag ve Pol'i kodlamaktadır (Şekil 1.11). Daha güvenli olmasına rağmen, bu sistem kullanımı daha zahmetli olabilir ve ilave bir plazmit eklenmesi nedeniyle daha düşük viral titrelerle sonuçlanabilir (Tareen vd., 2013).



Şekil 1.11: 3. Nesil lentiviral plazmitlerin şematik gösterimi (<https://www.addgene.org/>)

İkinci olarak Tat, transfer plazmiti üzerindeki heterolog bir promotöre kaynaşmış kimerik bir 5' LTR'nin eklenmesiyle 3. nesil sistemden elimine edilir. Bu promotörden transgenin ekspresyonu artık Tat transaktivasyonuna bağlı değildir. 3. nesil transfer plazmidi, 2. nesil veya 3. nesil paketleme sistemi ile paketlenabilir (Maetzig vd., 2011) .

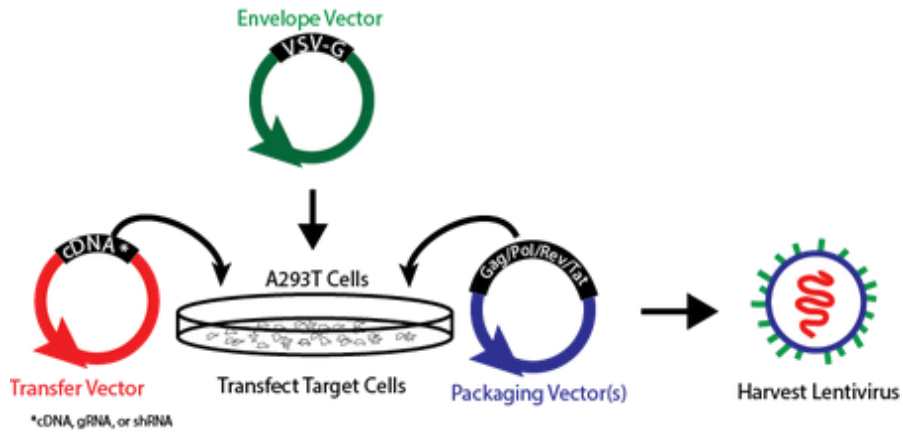
1.4.3 Laboratuvarda lentivirüs plazmit bileşenlerinin oluşturulması

Lentivirüs üretimi için üç farklı plazmid kullanılmaktadır:

- **Transfer Plazmid/Lentiviral Vektör:** LTR'ler aracılığıyla konakçı genomuna entegre edilen genetik materyali (cDNA, shRNA) içermektedir.
- **Zarf Plazmidi:** Başka bir virüsün (HIV-1 değil) zarfını (Env) içerir. Çoğunlukla veziküler somatit virüsünün (VSV G) G proteinini içerirken virüsün özgüllüğünü, yani hangi hücre türlerinin enfekte olabileceğini/tanınabileceğini belirlemektedir. Hemen hemen her transfer plazmiti ile kullanılabilir.
- **Paketleme Plazmidi:** HIV-1 çekirdek proteinlerini (ve yardımcı faktörleri) içerir; minimum Gag, Pol ve Rev. Çeşitli versiyonları vardır. Bir veya iki plazmit olabilir.

1.4.4 Lentivirüs oluşturma: çoklu plazmid kullanımı

Üç plazmid bileşeninin tümü, HEK293T hücreleri gibi bir paketleme hücre hattına transfekte edilir. Virüs toplanır ve hedef/konakçı hücreleri enfekte etmek için kullanılır. LTR'ler arasındaki genetik materyal, hedef hücreye dahil edilir ve cDNA veya shRNA stabil olarak eksprese edilebilir (Şekil 1.12). Lentiviral vektör kullanımını çevreleyen iki ana güvenlik endişesi bulunmaktadır: Çoğaltma yetkin lentivirüs oluşturma potansiyeli ve onkogeneze için potansiyel (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>).



Şekil 1.12: Viral üretim şeması (<https://www.addgene.org/>).

1.4.5 Lentiviral vektörlerin kullanımını çevreleyen güvenlik endişeleri

Paketleme vektörü iki ayrı plazmide bölünmüş olduğundan 3. nesil sistemler, 2. nesil sistemlerden daha güvenli olarak kabul edilir. Ayrıca 3. nesil sistemler viral üretim aşamasında transfer vektöründen tam boy virüs üretmek için HIV tat proteinini kullanmazlar. Addgene firmasına ait lentiviral transfer vektörlerinin çoğu, kendi kendini inaktive eden (SIN) vektörlerdir. Bu vektörler, bir tur ters transkripsiyondan sonra 5'LTR'ye aktarılan viral genomun 3'LTR'sinde bir delesyona sahiptir. Bu delesyon, bir konak hücreye dahil edildikten sonra tam uzunluktaki virüsün transkripsiyonunu ortadan kaldırır. Onkogeneze potansiyeli büyük ölçüde lentiviral transfer vektörü içinde bulunan spesifik eke (onkogen olup olmamasına bağlı olarak) dayanır ve vaka bazında değerlendirilmelidir (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>).

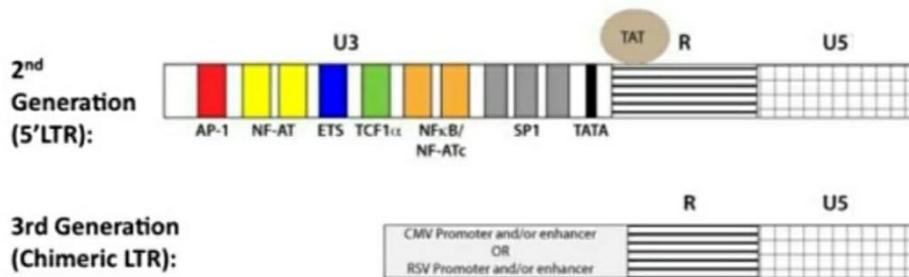
1.4.6 Güvenlik ve lentiviral vektörler

Lentiviral vektörlerin güvenli bir şekilde kullanılması için çeşitli düzenlemeler yapılmıştır:

- Viral genomun ayrılması: Replikasyon bileşenli bir retrovirüs (replication-competent retrovirus-RCR) oluşturma olasılığını en aza indirmek için çoklu plazmitlerin kullanılması.
- HIV yapısal geni Tat'a bağımlılığı azaltmak için kimerik bir LTR'nin kullanılması.
- Kendi kendini etkinleştirmeyen (Self- inaktivating-SIN) vektörlerin geliştirilmesiyle güvenlik açıkları giderilebilmektedir.

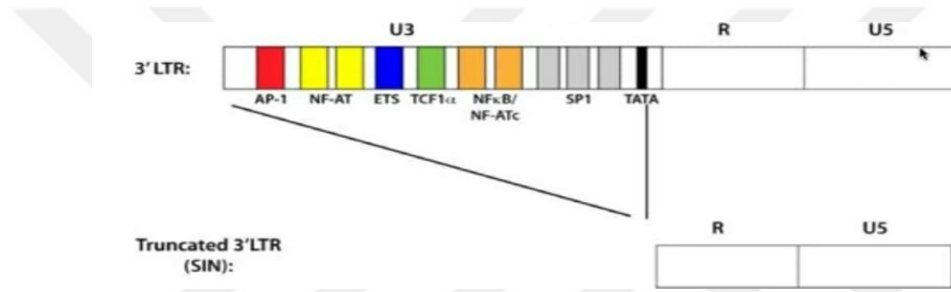
Ayrıca çeşitli geliştirilmiş güvenlik uygulamaları bulunmaktadır:

- **Kimerik 5'LTR'lerin Kullanımı:** Tat, 5' LTR'de doğrudan U3 bölgesine bağlanarak transkripsiyonu düzenleme görevi görür. Tat geninin transkriptindeki kaybını telafi etmek için, 3. nesil sistemde U3 bölgesini bir CMV veya RSV promotörü ile değiştiren kimerik bir 5' LTR oluşturulmuştur (Şekil 1.13).



Şekil 1.13: Kimerik 5' LTR'lerin kullanımı (<https://www.addgene.org/>).

- **Kendiliğinden İnaktive Olan (SIN) Plazmidlerin Kullanımı:** Kısaltılmış 3' LTR (SIN) bölgesi içeren plazmidler dizayn edilmektedir. SIN plazmitleri, 3' LTR'nin U3 bölgesinde büyük bir delesyon barındırır. Bu delesyon, ters transkripsiyon işlemi sırasında 5' LTR' yi çoğaltır ve 5' LTR'yi tam uzunlukta viral genomik RNA'nın transkripsiyonunu teşvik edemez hale getirerek virüs replikasyonunu yetersiz hale getirir (**Maetzig vd.**, 2011). Lentiviral plazmitler, geniş bir hücre yelpazesinde gen ekspresyonu ve susturma için kullanılabilir. Lentiviral plazmitlerin genetik özellikleri değiştirilerek HIV-1 ile ilgili güvenlik endişeleri giderilmiştir. İkinci ve üçüncü nesil lentiviral plazmitler, belirgin dizi farklılıklarına ve plazmit bileşenlerine sahiptir. Lentiviral teknolojilerdeki ilerlemeler, birçok alanda ilerlemeleri kolaylaştırmaya devam etmektedir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14: Kendiliğinden inaktive olan (SIN) plazmidler (<https://www.addgene.org/>).

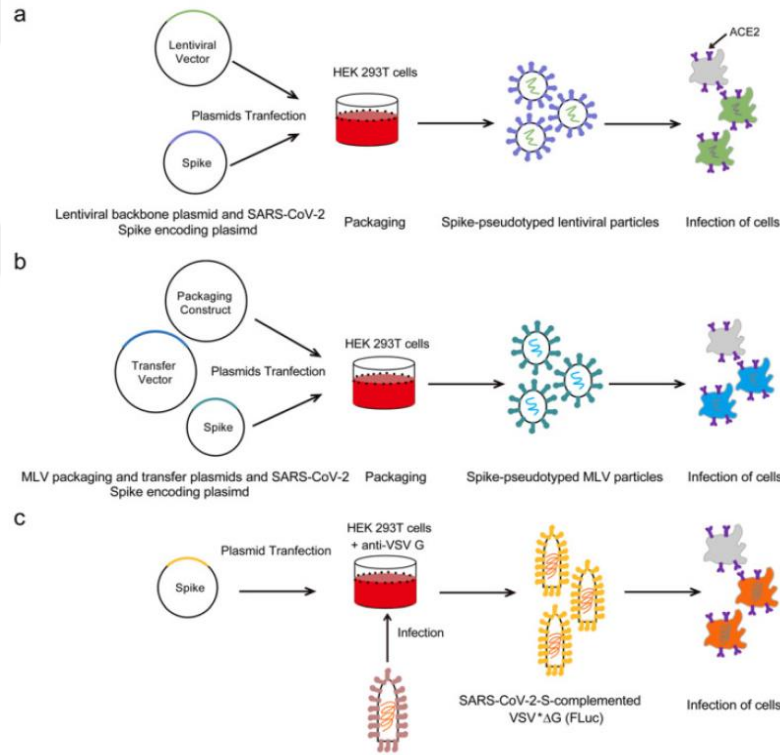
1.5 Pseudovirüs Üretiminde Kullanılan Paketleme Sistemleri

1.5.1 İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV-1) bazlı lentiviral paketleme sistemi

HIV-1 lentiviral paketleme sistemi şu anda en yaygın kullanılan SARS-CoV-2 pseudoviral paketleme sistemidir. Şekil 1.15a'da, HIV-1'den türetilen lentiviral partiküle dayalı olarak SARS-CoV-2 pseudovirüslerini oluşturmak için temel stratejileri gösterilmiştir. Genel olarak, iki veya üç plazmid, pseudovirüsleri üretmek için hücrelere birlikte transfekte edilmiştir.

İki plazmitli paketleme sistemi, en yaygın olarak kullanılan SARS-CoV-2 pseudoviral paketleme sistemidir. SARS-CoV-2-S proteinini ifade etmek için bir plazmit, paketleme proteinlerini ve sinyallerini ifade etmek için ise başka bir HIV-1 omurga plazmitini içermektedir. İkili plazmid paketleme sisteminde pNL4-3-kfs18, pNL4-3 ve Luc RE gibi birkaç HIV-1 lentiviral omurga plazmiti kullanılmıştır (**He vd.**, 2020; **Yang vd.**, 2020). HIV-1 üçlü plazmit paketleme sistemi genellikle bir paketleme plazmiti, raportör geni

içeren bir transfer plazmiti ve bir SARS-CoV-2 S proteini eksprese eden plazmitten oluşmaktadır. Spesifik olarak, bu sistem HIV-1 omurgasının ayrı paketleme ve transfer plazmitlerini içermektedir. Paketleme plazmidi Gag ve Pol proteinlerini ifade ederken, transfer plazmidi HIV-1 ters transkripsiyon, entegrasyon ve paketleme için gerekli cis-düzenleyici elemanların yanı sıra çoklu klonlama bölgeleri ve heterojen bir promotörün kontrolü altında bir raportör geni içermektedir (**Huang vd., 2020; Ou vd., 2020**). SARS-CoV-2 S protein ekspresyon plazmidi, bir sitomegalovirüs (CMV) promotörü tarafından indüklenen bir vektörden yapılır. Birkaç bağımsız grup, pNL4-3LuRE ve SARS-CoV-2 S protein eksprese eden plazmitin birlikte transfeksiyonunun SARS-CoV-2 pseudovirüsü üretebileceğini bildirmiştir (**Yang vd., 2020, Wan vd., 2020 Ou vd., 2020**), SARS-CoV-2 pseudovirüsleri üretmek için bir SARS-CoV-2 S protein eksprese eden plazmit, psPAX2 ve pLenti-GFP'yi HEK 293T hücrelerine birlikte transfekte etmiştir.



Şekil 1.15: Farklı paketleme sistemlerine dayalı SARS-CoV-2 pseudovirüslerin üretim şeması (**Minghai vd., 2021**).

1.5.2 Murin lösemi virüsü (MLV) bazlı paketleme sistemi

MLV'ler tipik basit retrovirüslerdir. Zarflıdırlar ve sırasıyla viral kapsid proteinlerini, viral enzimleri ve zarf proteinlerini kodlayan üç gen (gag, pol ve env) taşıyan pozitif iplikli

RNA içermektedirler (**Fan vd.**, 1997; **Witte vd.**, 1977) tarafından yapılan çalışma, veziküler somatit virüsünün (VSV), MLV'nin paketlenildiği hücreleri enfekte etmek için kullanıldığını göstermektedir. Şekil 1.15b, MLV paketleme sistemine dayalı SARS-CoV-2 pseudo virüslerini üretme stratejilerini göstermektedir. Son zamanlarda, (**Zheng vd.**, 2021) SARS-CoV-2 pseudovirion partikülleri oluşturmak için üç plazmit içeren MLV paketleme sistemini HEK 293T hücrelerine birlikte transfekte etmiştir: ilk plazmit paketleme yapısında olan SV-Psi- -Env- -MLV; ikinci plazmit, lusiferaz rapörtör genini kodlayan minimal bir retroviral transfer vektörü olan L-LUC-SN; ve üçüncü plazmit ise SARS-CoV-2 S proteinini kodlayan bir ekspresyon plazmidir. **Walls vd.**, (2020), bir MLV Gag-Pol paketleme yapısını, bir lusiferaz rapörtörünü kodlayan bir MLV transfer vektörünü ve bir S proteini kodlayan plazmiti SARS-COV-2 pseudovirüslerini başarıyla üretmek için HEK 293T hücrelerine birlikte transfekte etmiştir (**Walls vd.**, 2020).

1.5.3 VSV Paketleme sistemi

VSV, tek tip bir zarf glikoproteinine (G) sahip olan negatif zincirli bir RNA virüsüdür (**Licty vd.**, 2004). Şekil 1.5c, VSV paketleme sistemine dayalı SARS-CoV-2 pseudovirüsünün oluşturulmasının ana hatlarını göstermektedir. Kısaca, HEK293T hücreleri hücre kültürü kaplarında üretilmiştir ve SARS-CoV-2 S protein ekspresyon plazmidi ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücreler yıkanmıştır ve lusiferazı kodlayan VSV*ΔG (Flux) ile transfekte edilmiştir. 37°C'de 1 saatlik bir inkübasyon periyodundan sonra, inokulum çıkarılmıştır ve hücreler yıkanmıştır. Pseudo tipte parçacıklar, aşılama 20 saat sonra hasat edilmiştir. Son zamanlarda, **Zettl vd.**, (2020), hem GFP hem de lusiferazı kodlayan G-silini bir VSV olan pseudo tipli bir VSV*ΔG'yi (FLuc) birlikte transfekte etmiştir. SARS-CoV-2 S proteini ile ve onu nekahat dönemindeki COVID-19 hastalarının serumlarında SARS-CoV-2 nötralize edici antikorların tespiti için kullanmıştır (**Zettl vd.**, 2020). **Letko vd.**, (2020), SARS-CoV-2 ve diğer soy B betacoronavirüsleri için hücre girişi ve reseptör kullanımını incelemek için SARS-spike kimeralarını taşıyan VSVΔG-luc kullanmıştır (**Letko vd.**, 2020). **Nie vd.**, (2020), SARS-CoV-2'nin tam uzunlukta spike proteinini taşıyan pseudo tipte bir VSV'den oluşan, SARS-CoV-2 için bir pseudo virüs nötralizasyon tahlilini başarıyla oluşturmuştur (**Nie vd.**, 2020). Özellikle, SARS-CoV-2 pseudo virüsünü yapmak için VSV paketleme sistemi kullanıldığında, pseudo virüsle karıştırılmış kalıntı VSV virüsü olabilir, yanlış pozitif sonuçlar üreterek nötralizasyon testine müdahale edebilmektedir. Tercihen, VSV miktarı en aza indirilmelidir; bununla birlikte, fazla VSV'nin pseudovirüs bazlı bir

tahlile müdahale ettiğine inanılıyorsa, pseudovirüs preparasyonunun bir VSV nötralize edici antikor ile tedavisi düşünülebilir (**Hoffman vd.**, 2020).

1.5.4 Diğer paketleme sistemleri

Araştırmacılar, bahsi geçen SARS-CoV-2 pseudovirüs paketleme sistemlerinin yanı sıra diğer paketleme sistemleriyle birlikte SARS-CoV-2 pseudovirüslerini de üretmişlerdir. **Yan vd.**, (2021), bir SARS-CoV-2 pseudovirüsü üretmek için bir faj vektörü kullanmıştır. Spesifik olarak, N, E ve ORF1ab ve SARS-CoV-2 genlerini eklemek için bir MS2 vektörü kullanılmıştır (**Yan vd.**, 2021). Genel olarak, MS2 kullanılarak 500 bp'lik RNA'nın paketlenmesi verimli olsa da, 1,5 kb'lık RNA'nın paketlenmesi iyi çalışmamaktadır (**Pasloske vd.**, 1998). MS2 tabanlı zırlı L-RNA teknolojisi paketleyebilse de >2 kb RNA sekansları (**Wei vd.**, 2008), MS2'nin paketleme kapasitesi hala lentivirüsler kadar iyi değildir. Bu sınırlama nedeniyle, N, E için genler ve ORF1ab geninin dokuz parçası MS2 vektörüne ayrı ayrı yerleştirilmiştir ve farklı MS2-tabanlı psöдовirüsler, kalite kontrol materyalleri oluşturmak için birlikte karıştırılmıştır. Araştırmacılar ayrıca SARS-CoV-2 Spike proteinini ifade etmek için vektör olarak NS1 ile silinmiş bir influenza A virüsünü kullanmıştır ve bu influenza virüsü bazlı pseudovirüs şu anda bir klinik denemede aday aşı olarak test edilmektedir (**Kaur vd.**, 2020). Adenovirüs vektörü, SARS-CoV-2 S proteinini ifade etmek için kullanılmıştır ve SARS-CoV-2'ye karşı aday aşı olarak değerlendirilmiştir (**Zhu vd.**, 2020, **Mercado vd.**, 2020, **Van vd.**, 2020).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pseudovirüsler, virüsler ve konakçı hücreler arasındaki etkileşim üzerine in vitro çalışmalar yapmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (**Steffen vd.**, 2016). Ayrıca, özellikle viral enfeksiyon ve biyolojik dağılım mekanizması üzerinde in vivo çalışmalar için çok faydalı oldukları kanıtlanmıştır (**Hutchens vd.**, 2007). Raportör genler, niceliksel analizleri kolayca gerçekleştirmek için genellikle pseudovirüslere dahil edilmiştir. Bunlar esas olarak lusiferaz ve flüoresan protein kodlayan genleri içerir ve her bir seçenek belirli avantajlar ve dezavantajlar içerir. Örneğin, biyoluminesans deneyleri genellikle daha düşük arka plan gürültüsüne sahiptir ve daha hassastır, ancak veri toplama ve analizi zaman alıcı ve pahalı olabilir. Buna karşılık, gösterge olarak bir floresan protein kullanan tahliller çok daha ucuzdur ve çalıştırılması daha kolaydır; ancak daha yüksek arka plan sorunlarıyla karşılaşabilirler ve daha az duyarlıdır (**Chan vd.**, 2006; **Nie vd.**, 2016; **Li vd.**, 1963). **Ou vd.**, (2020), hücre tipi duyarlılığını, virüs reseptörünü ve SARS-CoV-2'nin giriş yolunu belirlemek için bir lentiviral psödop tip sistemi kullanmıştır (**Ou vd.**, 2020). **Yi vd.**, (2020), insan embriyonik kök hücre kaynaklı beyin organoidleri ve tek tabakalı kortikal nöronlar içindeki nöral katmanları enfekte etmek için başak proteinli bir SARS-CoV-2 pseudovirüs kullandılar ve olgun nöronların somada ACE2 eksprese ettiğini ve başak protein istilasına karşı duyarlı olduklarını ortaya çıkarmışlardır (**Yi vd.**, 2020).

Günümüzde spike içeren SARS-CoV-2 pseudovirüsü, en çok geliştirilen pseudoviral sistemdir. Çeşitli çalışmalar, SARS-CoV-2'nin konak hücre yüzeyi reseptörü olarak ACE2 kullandığını ve S proteini ile ACE2 arasındaki etkileşimin esas olarak onun hedef hücrelere girişine aracılık ettiğini doğruladığı için (**Zhou vd.**, 2020, **Walls vd.**, 2020), antikör nötralizasyon deneyleri hedef S protein bazlı SARS-CoV-2 pseudovirüsleri üzerinde geniş çapta araştırılmıştır. Geleneksel tahlillerle karşılaştırıldığında, bildirilen pseudovirüs tabanlı tahliller, YT virüsüne dayalı tahlillerle iyi bir korelasyon gösterirken, aynı zamanda tipik olarak daha yüksek verim ve daha az numune serumu gerektirmektedir (**Bentley vd.**, 2015). Zettl ve arkadaşları, VSV tabanlı bir SARS-CoV-2 pseudovirüsü üretilen bunları nekahat dönemindeki COVID-19 hastalarında nötrale edici antikör titrelerini belirlemek için kullanmıştır. Çoğu hastanın yalnızca düşük titrede nötrleştirici antikora (%50

nötrleştirici doz < 320) sahip olduğu sonucunu elde etmişlerdir (**Zetll vd.**, 2020). Nie arkadaşları, bir VSV pseudovirüs üretim sistemi kullanarak biyogüvenlik düzeyi 2 olan laboratuvarlarda SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorları değerlendirmiştir (**Nie vd.**, 2020). **Crawford vd.**, (2020), insan serumu veya plazmasının SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici aktivitesini ölçmek için lusiferaz bazlı bir tahlilde pseudotipte lentiviral partiküller kullanmıştır ve nötralizasyondan ziyade antikor bağlanmasını ölçen enzime bağlı immünosorbent tahlile dayalı yöntemler için değerli bir tamamlayıcı sağlamışlardır (**Crawford vd.**, 2020).

2.1 Vektör Üretimi İçin Kullanılan Hücresel Hatlar

HEK293 hücre tipi, 1973 yılında Hollanda'nın Leiden şehrinde bulunan Alex van der Eb'in laboratuvarında insan embriyonik böbrek hücrelerinin transforme edilmesi yöntemi ile üretilmiştir. Transforme olan hücreler fetüs hücrelerinden alınmıştır. 293 sayısı ile Eb'in post doktora öğrencisi olan Frank Graham'ın deneylerini numaralandırma alışkanlığından gelmektedir. Mevcut lentiviral vektör üretimi için en sık kullanılan HEK293 hücre türevi HEK293T'dir. HEK293T hücreleri SV40 adı verilen büyük T-antijenine sahiptirler (**Gama vd.**, 2011, **Merten vd.**, 2011, **Ausubel vd.**, 2012). Bu antijen SV40 orijini taşıyan vektörler için amplifikasyon kolaylığı sağlayan bir yöntem fırsatı sunmaktadır. Bu sistem geçici transfeksiyon sonucu elde edilen ekspresyon seviyelerini önemli seviyede artırmaktadır. Diğer HEK293 hücre türevleri farklı özellikler gösterse de büyümedeki güvenilirlik ve transfeksiyon kolaylığı en çok ilgi çeken özelliklerdendir (**Smith vd.**, 2009).

(**Mishra vd.**, 2021) tarafından yapılan araştırmalarında, SARS CoV-2 Nükleoprotein, Lentiviral spike parçalarının enfektivitesini artırdığını tespit etmişlerdir. Bu konudaki araştırmalar, ACE2+ hücrelerindeki hücresel giriş sürecini özetlerken, diğer SARS CoV-2 genlerinin tamamlayıcı katkılarını büyük ölçüde hesaba katmadığından dolayı bunu ele almak için, tarafsız bir ORF taraması gerçekleştirmiş, nükleoproteini (N), ve oldukça bulaşıcı D614G mutantını spike-psödotipli LV partikül enfektivitesinin güçlü bir artırıcısı olarak tanımlanmıştır. Parçacıklar N proteininin mevcudiyetinde üretildiğinde başak proteininin viryonlar açısından daha zengin olduğu gösterilmiştir. Spike'ın bu zenginleştirilmesi, LV partiküllerini daha bulaşıcı hale getirdiğini ve aynı zamanda bir insan IgG-Fc kaynaşmış ACE2 mikro gövdesinin nötralize edici etkilerine karşı daha az savunmasız hale getirdiğini tespit edilmiştir. Bu araştırmada ortaya konulan sonuçlar

SARS CoV-2'nin başak glikoproteini ile lentiviral vektör pseudotiplemesini açıklarken diğer viral genlerden gelen ek katkıları hesaba katmanın önemini vurgulanmaktadır.

Crawford vd., (2020), yaptıkları bu çalışmada; lentiviral parçacıkların SARS-CoV-2 Spike ile etkili bir şekilde nasıl pseudotiplendirileceğini ve SARS-CoV-2 reseptörü ACE2'yi ifade etmek üzere tasarlanmış 293T hücrelerini nasıl enfekte edeceği ayrıntılarıyla izah edilmiştir (**Crawford vd.**, 2020). SARS-CoV-2 Spike-pseudotipli lentiviral partiküller üretmek ve nötrleştirme deneyleri yapmak için ayrıntılı bir protokol açıklanmıştır. Bu protokolde SARS-CoV-2'ye reaktif antikorların ve serumların nötralize edici aktivitesinin daha kolay değerlendirmesi amaç edinilmiştir. Bu tahlil, insan serumu veya plazma numunelerinin uygun bir 96 kuyulu formatta taranmasına izin verdiği; bu, bağışıklık gelişimini daha iyi anlamak ve potansiyel olarak donörleri nekahat plazmasının pasif transferini taramak için çok sayıda hasta numunesinin test edilmesini kolaylaştıracağı belirtilmiştir (**Duan vd.**, 2020; **Schwegmann –Weßels vd.**, 2009).

Nie vd., (2020), SARS-CoV-2 için bir sahte virüs nötralizasyon testinin oluşturmuş ve doğrulamışlardır. Bir VSV psödovirüs üretim sistemine dayalı olarak, SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorları değerlendirmek için bir psödovirüs tabanlı nötralizasyon testini geliştirmişlerdir (**Nie vd.**, 2020). Pseudovirüs tabanlı nötrleştirme deneyleri (PBNA), çok yönlü oldukları ve kullanımları çok daha güvenli oldukları için geniş tip virüs tabanlı yöntemlere göre büyük avantajlar sağladığı belirtilmiştir. Pseudovirüs tabanlı nötrleştirme deneyleri (PBNA), çok yönlü oldukları ve kullanımları çok daha güvenli oldukları için geniş tip virüs tabanlı yöntemlere göre büyük avantajlar sunduğu belirtilmiştir. Psödovirüsün çok yönlülüğü, virüsün farklı dış zar proteinleri veya zarf proteinleri ile psödotiplenmesiyle elde edilir ve canlı virüsün zarf proteinlerini sağlayan bulaşıcı sürecini taklit ettiği ifade edilmiştir (**Li Q vd.**, 1963; **Nie vd.**, 2020) . Pseudovirüs öldürücü viral bileşenler içermediği ve tek bir replikasyon turu gerçekleştirmesi nedeniyle bu nedenle çok daha güvenilir olduğu ifade edilmiştir. Deneysel prosedürde ölümcül geniş tip virüsün olmaması, SARS-CoV-2 aşısının ve terapötiklerinin geliştirilmesini büyük ölçüde kolaylaştırdığından dolayı aşı ve terapötik geliştiricilere, aday ürünlerini değerlendirmeleri için SARS-CoV-2 pseudovirüs ile ilgili protokoller sağlanılmıştır.

Johnson vd., (2020) tarafından yapılan araştırmada , COVID-19 hastalarından nötralize edici antikorların saptanması için uygun olan nispeten yüksek titreli SARS-CoV-2 psödopartiküllerinin üretilmesiyle sonuçlanan bir dizi modifikasyon açıklanmaktadır (**Johnson vd.**, 2020). Burada, pseudotiplenmiş HIV-1, mürin lösemi virüsü (MLV) ve

veziküler stomatit virüsü (VSV) parçacıklarının üretimi için kodonla optimize edilmiş bir SARS-CoV-2 Spike glikoproteininin kullanımını karakterize edilmiştir. Tam uzunluktaki Spike proteinin, her üç sistemde de verimsiz bir şekilde işlev gördüğü, ancak sitoplazmik kuyruğun son 19 amino asidini silerek, aktivitesinin 10 kattan fazla arttığı belirtilmiştir. SARS Spike'ın sitoplazmik kuyruğunun kesilmesinin viral psödotiplerin üretimini arttırdığını gösterdiğinden (**Giroglou vd.**, 2004), ayrıca son 19 amino asit silinmiş bir SARS-CoV-2 Spike alt klonu oluşturulduğu belirtilmiştir. Spike'ı aktive eden proteaz TMPRSS2'nin istikrarlı bir şekilde eklenmesi, SARS-CoV-2 Spike ile pseudotiplenmiş HIV-1 parçacıklarına duyarlılığını 5 ila 10 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda SARS-CoV-2 Spike'taki D614G ve R682Q modifikasyonları, pseudotipleme verimliliğini artırdığı ve SARS-CoV-2 Spike psödotiplerinin, nötralizasyon testlerinde işlev gördüğünü belirtilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada yer alan deneysel süreçler İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Endüstriyel Biyoteknoloji ve TUBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM) Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Tanı Teknolojileri Laboratuvarlarında (TTL) gerçekleştirilmiştir.

3.1 Kimyasal Malzemeler

SOC Medium (Super Optimal Culture Medium), MN Plazmid İzolasyon Kiti (Macherey-Nagel MiniPrep Plasmid DNA Purification Kit), 5X loading dye (NEB), Etidyum Bromür (Sigma-Aldrich, ABD), kompetent DH5 α (*E. coli*) hücreler (New England Biolabs (NEB)), FBS (NEB), DMSO (Sigma), Tripsin EDTA(Sigma), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM (Diagnovum)), L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific), Penisilin- Streptomisin (Sigma), 6 well (Corning, ABD) kullanılmıştır.

3.2 Tampon Çözeltiler

TAE (Tris-AsetikAsit-EDTA) tamponu (pH 8.0) 10X konsantrasyonda hazırlanıp 1X konsantrasyonda kullanıldı. 10X/L TAE tamponu 48.4 g Tris-base, 11.42 g glasiyel asetik asit ve 20 mL 0.5 M EDTA içermektedir.

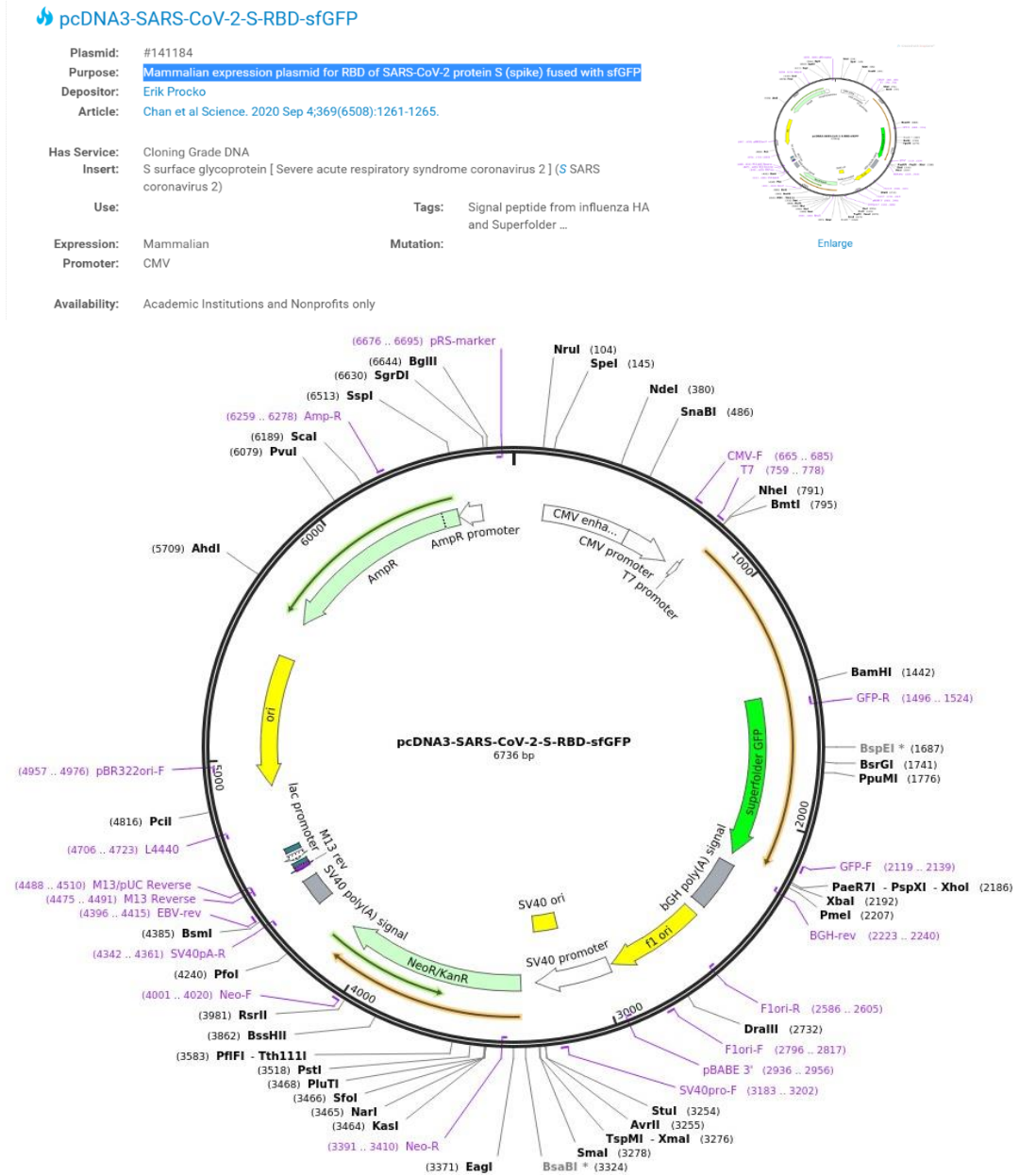
3.3 Cihazlar

Inverted Flouresans Microscope (Zeiss Primovert), Etüv (Memmert), Steril Kabin (Biyogüvenlik Kabin, Esco Class 2), Yatay Elektroforez Sistemleri (Thermo Scientific), Sıcak Su Banyosu (Memmert), Karbondioksitli Etüv (Mini Galaxy A), Güç Kaynağı (Thermo Scientific), Nanodrop (Thermo Scientific) cihazları kullanılmıştır.

3.4 Plazmidlerin Seçimi

HIV-1 tabanlı pseudotip virüs yapımı için geliştirilen stab plazmidler Addgene firmasından (Addgene Company, Cambridge, Massachusetts, ABD) temin edilmiştir. Plazmid #39196

(pHIV-Luc-ZsGreen), plazmid #12263 (pCMV-delta R8.2) ve plazmid #149543 (pGBW-m4137384) kullanılmıştır. Ayrıca Plazmid #141184 (pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1). 141184 numaralı plazmid sfGFP ile kaynaşmış SARS-CoV-2 protein S'nin (spike) RBD gen bölgesini taşımaktadır. 39196 numaralı plazmidin insertleri Luciferase Luc2P ve ZsGreen gen bölgelerini içermektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.1: Plazmid #141184 (pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-sfGFP) şematik gösterimi Addgene plasmid # 141184; <http://n2t.net/addgene:141184> ; RRID:Addgene_141184).

pHIV-Luc-ZsGreen

Plasmid: #39196

Depositor: [Bryan Weim](#)

Inserts: Firefly Luciferase Luc2P
ZsGreen

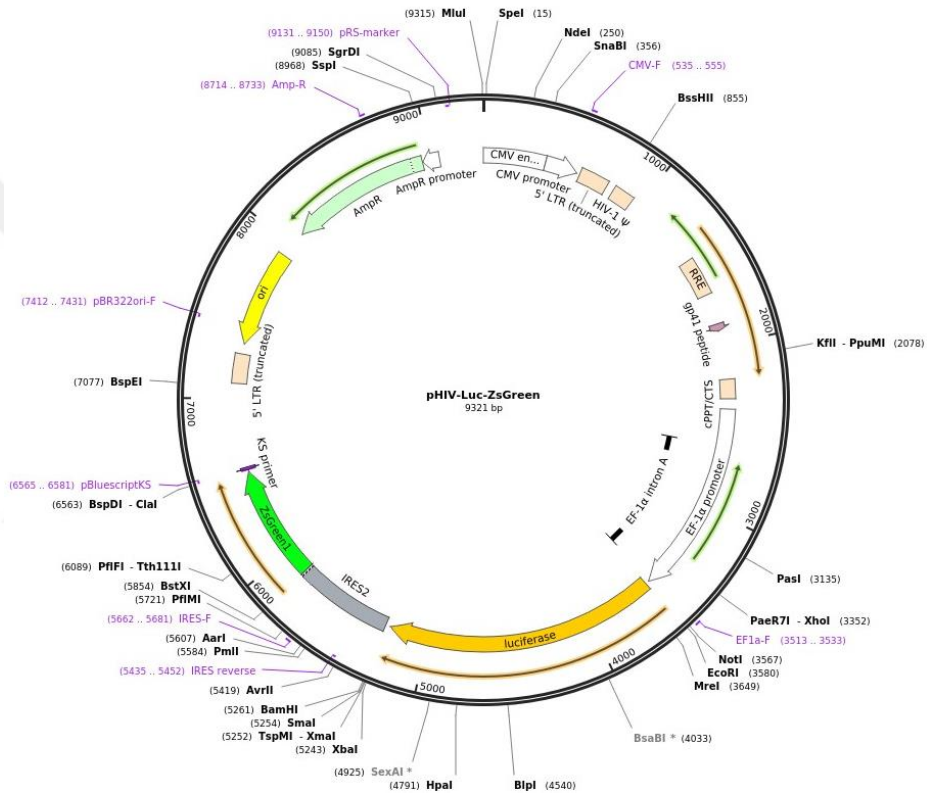
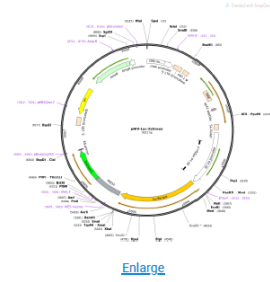
Use: Lentiviral

Expression: Mammalian

Promoter: EF1-alpha and EF1-alpha

Tags:
Mutation:

Availability: Academic Institutions and Nonprofits only



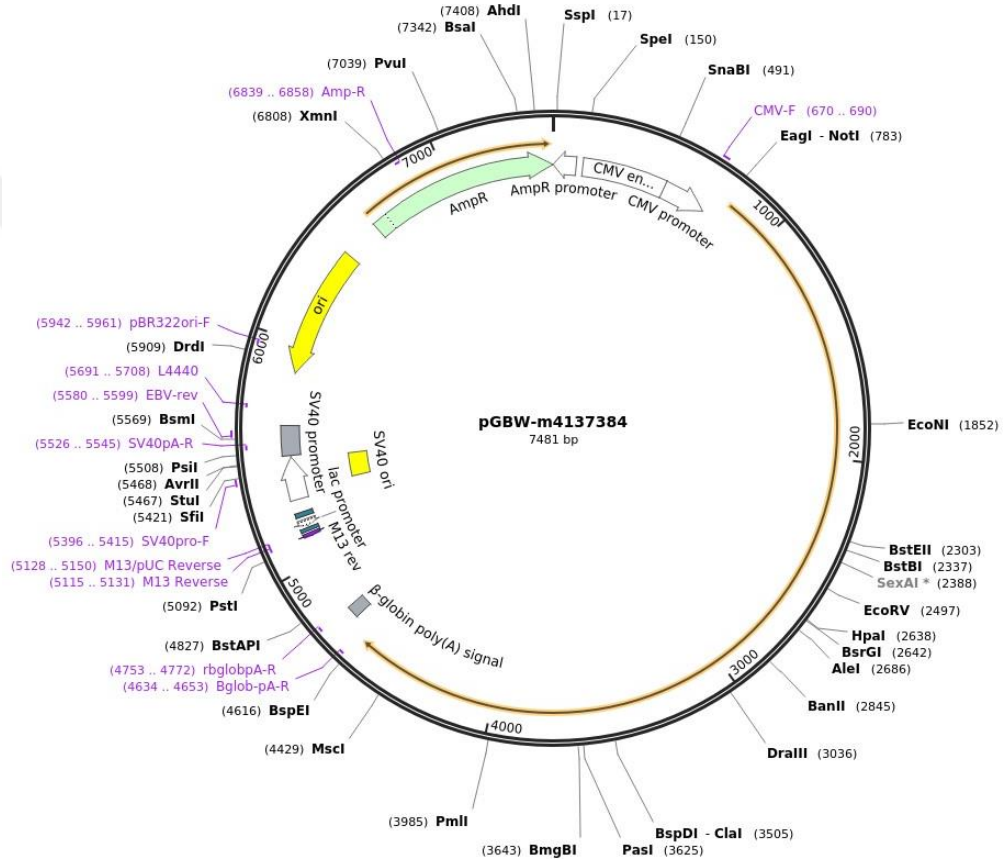
Şekil 3.2: Plazmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen) şematik gösterimi (Addgene plazmid # 39196; <http://n2t.net/addgene:39196>; RRID:Addgene_39196).

12263 numaralı paketleme plazmidini HIV-1 GAG/POL, Tat ve Rev gen bölgelerini taşıyan insertlere sahiptir (Şekil 3.3).



pGBW-m4137384

Plasmid: #149543
Purpose: Mammalian expression plasmid for SARS-CoV-2 surface glycoprotein (Spike) for VSV pseudotyping
Depositor: [Benjie Chen, Ginkgo Bioworks](#)
Insert: SARS-CoV-2 S (surface glycoprotein) [\[S\]](#) Human, Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
Use: Mammalian
Expression: Mammalian
Promoter: CMV
Tags: H. sapiens recode
Availability: Industry, Academic Institutions, and Nonprofits



Şekil 3.4: Plazmid #149543 (pGBW-m4137384) şematik gösterimi (Addgene plazmid # 149543; <http://n2t.net/addgene:149543>; RRID: Addgene_149543).

3.5 Transformasyon Öncesi Hazırlıklar

Bakteri ekimi yapılmak üzere LB Agar ve LB Broth sıvı besiyeri hazırlanmıştır (Çizelge 3.1 ve 3.2). Malzemeler tartıldıktan sonra son hacim 1L olacak şekilde distile su ilave edilip homojen bir karışım elde edilmiştir. Besiyerleri, 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Otoklav sonrasında besiyerleri 40-50 °C’ye gelene kadar soğutulup içerisine Ampicillin

(100 µg/mL) eklenmiştir. Antibiyotik içeren LB Agar besiyerleri, petrilere yaklaşık 20 mL olacak şekilde dökülüp oda sıcaklığında katılaşması beklenmiştir. Plaklar, 1 gece boyunca kabin içerisinde bekledikten sonra transformasyon ve diğer bakteri üretimi işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Ayrıca transformasyon öncesinde kompetent bakteri elde etme işlemleri de yapıldı.

Çizelge 3.1: LB Miller agar besiyerinin içeriği.

LB Miller Agar	Miktar (g/L)
Tryptone	10
Yeast Extract	5
Sodium Chloride	10
Agar	15

Çizelge 3.2: LB Miller broth besiyerinin içeriği.

LB Miller Broth	Miktar (g/L)
Tryptone	10
Yeast Extract	5
Sodium Chloride	10

3.6 Kompetent Bakteri Eldesi

Kompetent bakterilerin hazırlanması aşağıda belirtilen basamaklar takip edilerek yapılmıştır:

- 0.368gr $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 50 mL saf suda çözüldükten sonra 121°C’de 15 dk otoklavlanarak steril edilmiştir.
- Otoklav sonrasında soğutulup +4 °C’de depolanmıştır.

Ön Kültür

- -80°C' den alınan bakteri hücreleri buz üzerinde çözülür. Yaklaşık 50 µL bakteri hücresi, 10mL LB Broth içerisinde canlandırmak ve çoğaltmak amacı ile 37°C' de 150 rpm'de gece boyu inoküle edilmiştir.
- Stok kompetent bakteri kültürü yapmak amacıyla 1 adet 50 mL sıvı besiyeri hazırlandı.

Ana Kültür

- Gece boyu inkübe olan ön kültürden 500 µL alınıp 50 mL LB Broth besiyerine inoküle edildi
- 37°C de 180 rpm'de inkübe edilen kültürlerin 600 nm'deki optik yoğunlukları (OD) 0.35-0.40 abs oluncaya kadar inkübasyona devam edildi.

Aliquotlama ve Stok Hazırlanması

- Yaklaşık 1-2 saat sonra OD600 değeri 0.35-0.40 abs arasına ulaştığı zaman hücreler alınıp buz üzerinde 50 mL'lik steril falkona aktarılırdı.
- 6000 rpm'de +4°C de 8 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Buz üzerine alınan pellete, 20 mL soğuk CaCl₂ çözeltisi ilave edilerek yavaşça pipetaj yapıp bakteri çözeltisi resüspanse edildi. 20 dk buzda bekletildikten sonra 6000 rpm'de +4°C'de 8 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
- Pelletin üzerine % 10 steril gliserol içeren 2.5 mL soğuk CaCl₂ çözeltisi eklenerek karıştırıldı.
- Elde edilen stok kültür, 50-100µl aliquatlara ayrılıp vortekslenerek hızlı bir şekilde -80°C'lik derin donduruculara kaldırılırdı.

3.7 Stab Plazmid Kültürlerin Canlandırılması ve DNA izolasyonu

Pseudovirüs üretiminde kullanılacak olan stab plazmid kültürleri laboratuvara ulaştıktan sonra canlandırma işlemleri yapılmıştır. Stab plazmid kültürlerden iğne uçlu öze ile bir miktar bakteri kültürü alınıp 1mL SOC medium içine inokule edilmiştir. Kültürler, 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında sıvı kültürden 100 µl alınıp 5 mL LB sıvı besiyerine aseptik koşullarda ekim yapılmıştır. 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı bakteri kültürden 100-300 µl alınarak amfilisin eklenmemiş LB agar plaklara tek koloni düşürülecek şekilde ekim yapılmıştır. Katı kültürler, 37°C'de 1 gece

boyunca inkübe edilmiştir. Üreme gözlemlendikten sonra katı kültürden tek koloniler alınarak 5 mL LB sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Sıvı kültürlerin OD₆₀₀ değerleri 0.5-0.6 abs'a ulaştığı zaman kültür tüpleri plazmid DNA izolasyonu için buz üzerine alınmıştır. Plazmid DNA izolasyonunda MN Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izolasyon gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür (Şekil 3.5). Ölçme işlemleri sonrasında plazmid DNA'ları +4 ° C'de saklanmıştır.

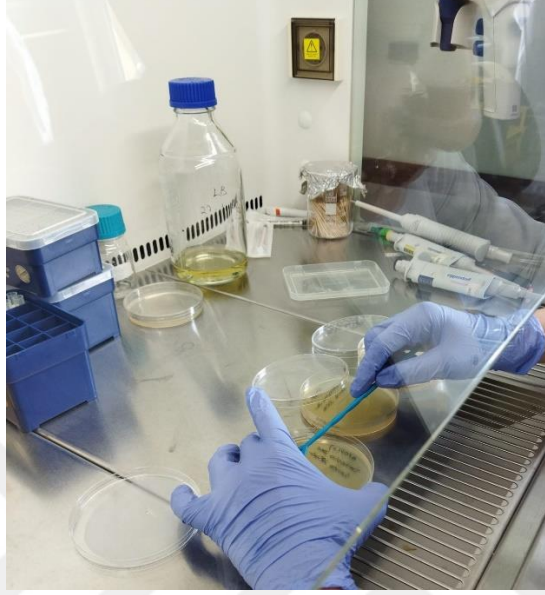


Şekil 3.5: Nanodrop spektrofotometre cihazının görüntüsü.

3.8 Plazmidlerin Kompetent Hücrelere Transformasyonu ve Çoğaltılması

İzolasyonu tamamlanan plazmidlerin kompetent bakteri hücrelerine transformasyonu ısı-şok metodu ile yapılmıştır. Öncelikle plazmid içermeyen kompetent DH5α (*E. coli*) hücreleri, depolandıkları -80°C'lik derin dondurucudan alınıp buz üzerinde çözülmüştür. Hücreler tamamen çözüldükten sonra 50 µl hücreye 100 ng DNA örneği eklenmiştir. Bir pipet ucu ile hafifçe karıştırıldıktan sonra 30 dakika buz üzerinde inkübe edilmiştir. Bekleme süresinin sonunda örnekler 42°C'lik su banyosunda 45 saniye boyunca tutularak hücrelere ısı şoku uygulanmıştır. Uygulama sonrası hücreler, 2 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra hücrelere oda sıcaklığında 950 µL SOC Medium eklenmiştir. Kültürler 37° C'de 1 saat boyunca 220 rpm'de çalkalamalı bir inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında 300-200-100 µl şeklinde kültürden alınıp amfisilin

içeren LB agar plaklara drigalski öze ile yayılmıştır (Şekil 3.6). Kontrol amaçlı 5 mL amfisilin içeren LB sıvı besiyerine 100 µl ekim yapılmıştır. Plaklar ve sıvı kültür bir gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Koloni oluşumu gözlemlendikten sonra plaklar +4 ° C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.6: Plazmidlerin kompetent hücrelere transformasyonu sonrası LB agar plaklara drigalski öze ile yayılmasının görüntüsü.

3.9 Transforme Edilen Plazmid Kültürlerinden DNA İzolasyonu

Katı plazmid içeren bakteri kültürlerinden iğne uçlu öze ile bir miktar bakteri kültürü alınıp amfisilin içeren 5 mL LB sıvı besiyerine aseptik koşullarda ekim yapılmıştır. 37°C'de ve 150 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı kültürlerin OD₆₀₀ değerleri 0.5-0.6 abs arasına ulaştığı zaman kültür tüpleri plazmid DNA izolasyonu için buz üzerine alınmıştır. Plazmid DNA izolasyonunda MN Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izolasyon gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Ölçme işlemleri sonrasında plazmid DNA'ları +4 ° C'de saklanmıştır.

3.10 Agaroz Jel Hazırlama ve Jele Örneklerin Yükleneşi

Elektroforez yöntemiyle plazmid DNA'ların transforme olduğunu tespit etmek amacıyla agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Stok olarak hazırlanan 10X TAE tamponu 1X olacak

şekilde seyreltilmiştir. %1'lik agaroz jel hazırlamak için 1 g agaroz (Sigma-Aldrich, ABD) tartılarak bir erlene alınıp üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklenmiştir. Agaroz içeren çözelti mikrodalga fırında agaroz çözünene kadar kaynatıldıktan sonra soğuması beklenilmiş ve üzerine 2 µl etidyum bromür eklenmiştir. Etidyum bromürün iyice karışması sağlandıktan sonra sıvı agaroz çözeltisi jel kasetine dökülmüş ve uygun boyuttaki tarak dikkatlice yerleştirilmiştir. Jelin donması beklendikten sonra jel kaseti, 1X TAE tampon ile dolu olan elektroforez tankına alınmış ve tarak çıkarılmıştır. Kuyulara, 1 µl 5X loading dye (NEB) ve 5 µl plazmid iyice pipetaj yapıldıktan sonra yüklenmiştir. DNA örnekleri jel üzerinde 100V akımda, 40 dakika yürütülmüştür. 40 dakikanın sonunda UV Transilluminatorde görüntüleme yapılmıştır.

3.11 Mini Kültür Hazırlanması

Transforme edilmiş olan bakteri kültürleri, plazmid DNA izolasyonu için, mini kültür (miniprep) ölçeğinde hazırlanmıştır. Amfisilin içeren 5 mL LB sıvı besiyeri 15 mL' lik falkonlara alındıktan sonra, birkaç tane koloni öze yardımıyla alınıp besiyeri içerisine inoküle edilmiştir. Sıvı kültürlerin OD₆₀₀ değerleri 0.5-0.6 abs arasına ulaştığı zaman kültür tüpleri plazmid DNA izolasyonu için buz üzerine alınmıştır.

3.12 Pseudovirus Üretiminde Kullanılmak Üzere Plazmidlerin İzolasyonu

Plazmid DNA izolasyonunda MN Plazmid İzolasyon Kiti kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre izolasyon gerçekleştirilmiştir. Nanodrop cihazında plazmidlerin konsantrasyonu ve A260/A280 oranları ölçülmüştür. Ölçme işlemleri sonrasında plazmid DNA'ları +4° C'de saklanmıştır. Elektroforez işlemleri Bölüm 3.10'da belirtildiği şekilde yapılmıştır.

3.13 Hücre Kültürünün Hazırlanması

Transfeksiyon öncesinde hücre kültürlerinin çoğaltılması steril laminar hava akımlı kabinlerde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan HEK293T hücre hattı ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilmiştir. İnsan embriyonik böbrek 293T (HEK293T) hücre hattı, SV40 büyük T antijeni ile transforme edilmiş insan embriyonik böbrek hücrelerinin klonal bir izolasyonu olduğu için tercih edilmiştir. HEK293T

hücreleri; %10 fetal sığır serum (FBS), 100 IU/ ml penisilin ve 100 mg/ml streptomisin ilave edilmiş DMEM besiyerinde, 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatörde kültüre edilmiştir.

3.14 Hücre Kültürünün Hazırlanması ve Stoklanması

-80°C’de muhafaza edilen stok HEK293T hücreleri alınarak 37°C su banyosunda çözülmüş, dondurma solüsyonundan arındırıldıktan sonra DMEM besiyerinde T25 filtreli hücre kültür flasklarına ekilmiştir. Hücreler 37°C’de %5 CO₂’li inkübatörlerde inkübe edilmiştir. Hücre yoğunluğu inverted mikroskop ile takip edilerek pasaj işlemleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler, ilk olarak % 0.05’lik Tripsin-EDTA ile muamele edilmiş ve 37°C’de % 5 CO₂’li inkübatörde 1-2 dakika inkübasyona bırakılarak flasktan ayrılmaları sağlanmıştır. Hücrelerin flasktan ayrılışı inverted mikroskop ile tespit edildikten sonra flaska taze besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra hücre-besiyeri içeriği falkon tüpe alınarak 1300 rpm’de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pellet, 9:1 oranında FBS ve DMSO’dan oluşan dondurma çözeltisi içeren kriyotüplere alınmıştır. Hazırlanan kriyotüpler -80°C’de depolanmıştır.

3.15 Hücre Hattının Açılması

Kriyotüplerde dondurulmuş hücre stokları, 37°C’de su banyosunda çözülene kadar bekletilmiştir. Çözülen hücreler, içerisinde 5 mL taze besiyeri bulunan falkon tüplerine aktarıldıktan sonra 1300 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelleti 5 mL %10 FBS içeren DMEM besiyeri ile süspanse edildikten sonra T25 filtreli hücre kültür flasklarına ekilmiştir. Hücre flaskı 37°C’de %5 CO₂’li inkübatöre alınmıştır. Hücre hattının beslenmesi iki günde bir flask içerisindeki besiyerinin taze besiyeri ile değiştirilmesiyle sağlanmıştır. Hücreler uygun yoğunluğa ulaştıktan sonra pasajlanarak canlılıklarının sürdürülmesi sağlanmıştır.

3.16 Hücre Hattının Pasajlanması

Pasaj işlemi sırasında önce flasklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Phosphate buffer saline (PBS) ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve tripsin-EDTA ile hücreler flask yüzeyinden kaldırılmıştır. Tripsin-EDTA’yı nötralize etmek için FBS içeren besi ortamı kullanılmıştır. Elde edilen hücreler 15 mL’lik falkonlara alınarak 5 dakika 1300 rpm’de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet 20 mL %10 FBS içeren

DMEM besiyeri içerisinde tekrar süspanse edilmiştir. Süspanse olan hücreler T75 filtrelili flasklara ekilmiştir. Hücre flaskı 37 °C’de %5 CO₂’li inkübatöre alınmıştır.

3.17 Hücre Sayımı

T75 flasklarda % 80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılıp PBS ile yıkanmıştır. Tripsin-EDTA ile hücrelerin flask yüzeyinden kaldırılması sağlanmış ve üzerine FBS içeren besiyeri eklenmiştir. Hücre-besiyeri karışımından 10 µl alınıp üzerine 10 µl tripan blue boya eklenerek karıştırılmıştır. Karışımdan 10 µl alınıp hücreler inverted mikroskop altında, hemositometre (Kat. No: Z359629-1EA, Bright-Line™, ABD) kullanılarak sayılmıştır. Sayma işleminde, hemositometre içinde 16 kareden oluşan ve her bir köşede bulunan 4 büyük kare kullanılmıştır. Bu dört büyük karedeki hücrelerin toplam ortalamasının 10⁴ ile çarpılması, 1 mL hacimde kaç hücre bulunduğu sayısını vermiştir.

3.18 Plazmidlerin Hücre Kültürüne Transfeksiyonu

3.18.1 Plazmid DNA örneklerin konsantrasyonlarının ayarlanması

Plazmid preparatlarının konsantrasyonundan, gerekli miktarda plazmit DNA'ya ulaşmak için gereken hacim hesaplandı. Plazmidler izole edildikten sonra ölçülen konsantrasyon değerleri dikkate alınarak Çizelge 3.3’de gösterilen şekilde her bir plazmid miktarı belirlendi. Aynı plazmitlerle birden fazla kuyu transfekte edilirse, hacimleri transfekte edilecek kuyu sayısı ile çarpılarak ve sonraki adımlarda karışımın tükenmesini önlemek için hesaplamalara fazladan bir kuyu eklendi. Transfekte edilen toplam DNA miktarı 1 ng/kuyu olacak şekilde uygulamalar yapıldı. Hesaplanan konsantrasyondaki plazmidler enkapsülasyon işlemi için 1.5 mL’lik eppendorf tüplere alınmıştır.

Çizelge 3.3: Pseudovirüs üretimi için hücre kültürü ortamına ilave edilen plazmid ve serum içermeyen OPTIMEM besiyeri miktarları.

Plazmid/ Reagent	Miktar
#39196 (pHIV-Luc-ZsGreen)	400 ng
#12263 (pCMV-delta R8.2)	300 ng
#149543 (pGBW-m4137384)	300 ng
Serum içermeyen OPTIMEM besiyeri	125 µl’ye tamamlanmıştır.

3.18.2 Lipid bazlı transfeksiyon karışımının hazırlanması

Transfeksiyon için Invitrogen Lipofectamine™ 3000 Reagent kullanılmıştır. Karışım firmanın protokolüne göre hazırlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4: Pseudovirüs üretimi için HEK293T hücrelerinin transfekte edilmesi için gereken transfeksiyon reaktifi ve serum içermeyen OPTIMEM besiyeri miktarları.

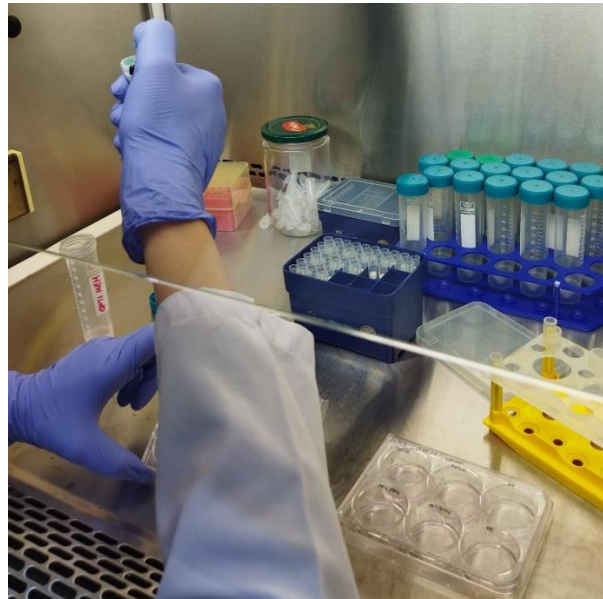
Bileşen	Miktar
P3000 Reagent (Her bir kuyucuk için)	2 µl
Lipofectamine 3000 Reagent (Her bir kuyucuk için)	3 µl
Serum içermeyen OPTIMEM besiyeri	120 µl
Toplam karışım miktarı	125 µl

3.18.3 Plazmid DNA/ lipid karışımının hazırlanması

Çizelge 3.3 ve 3.4’de belirtilen miktarlara göre hazırlanan plazmid DNA’ları ve lipid karışımı 1.5 mL’lik ependorfta birleştirilmiştir. Üzerine 250 µl OPTIMEM besiyeri eklenip oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir.

3.18.4 HEK293T hücre hattına transfeksiyonun yapılması

Sayımı yapılan T75 flasttaki hücreler, 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyusunda 300.000 hücre olacak şekilde, %10 FBS içeren DMEM besiyerine ekilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: HEK293T hücrelerinin 6 kuyucuklu plakaya ekiminin görüntüsü.

Plaka 24 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında %50-60 yoğunluğa ulaşan hücrelerden besiyeri uzaklaştırılarak 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrasında plazmid ve lipid karışımı plakanın çeperinden yavaşça eklenmiştir ve üzerine 500 µL serum içermeyen OPTIMEM besiyeri eklenmiştir. Ayrıca negatif kontrol olarak sadece 2 mL OPTIMEM içeren kuyucuklar da hazırlanmıştır. Sadece #39196 kodlu plazmid içeren transfeksiyon karışımı pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Hücreler 6 saat 37°C %5 CO₂'li inkübatöre bırakılmıştır. 6 saatin sonrasında kuyucuklara 1 mL daha OPTIMEM besiyeri eklenmiştir. Transfeksiyonun ardından hücreler 48 saat 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir.

3.19 Transfekte Edilmiş Hücrelerin Görüntülenmesi

48 saatin sonrasında hücre morfolojisi inverted floresan mikroskop altında kontrol edilmiştir (Şekil 3.8). Transfekte olan hücrelerdeki GFP ışması floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

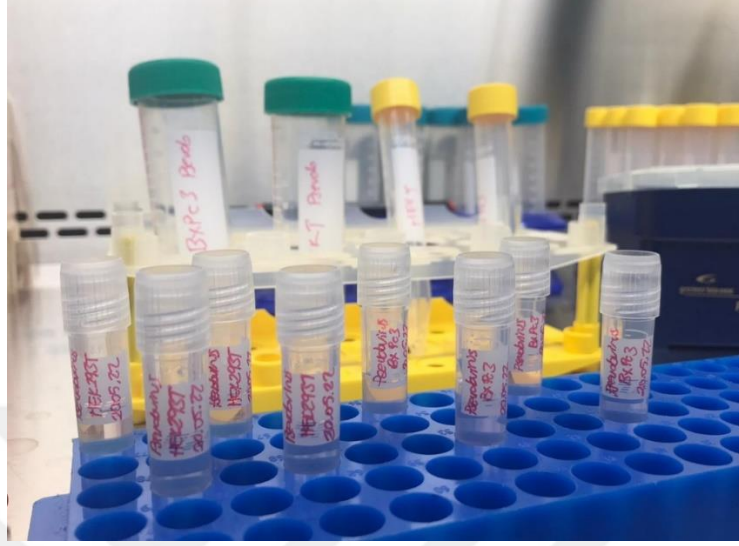


Şekil 3.8: İnverted floresan mikroskopunun görünümü.

3.20 Pseudotip Parçacıkların Toplanması

Görüntüleme işlemleri sonrasında transfeksiyon yapılan kuyulardan süpernatant alınıp 50 mL falkona aktarılmıştır (Şekil 3.9). Hücre kalıntılarını gidermek için tüpler 1300 rpm'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Temizlenmiş süpernatantlar 0.45 µm gözenek boyutlu steril

filtreden geçirilmiştir. Pseudotipli virüs solüsyonu kriyotüplerde 500 µl şeklinde alikotlanmıştır. Kriyotüpler -80 °C'de saklanmıştır.



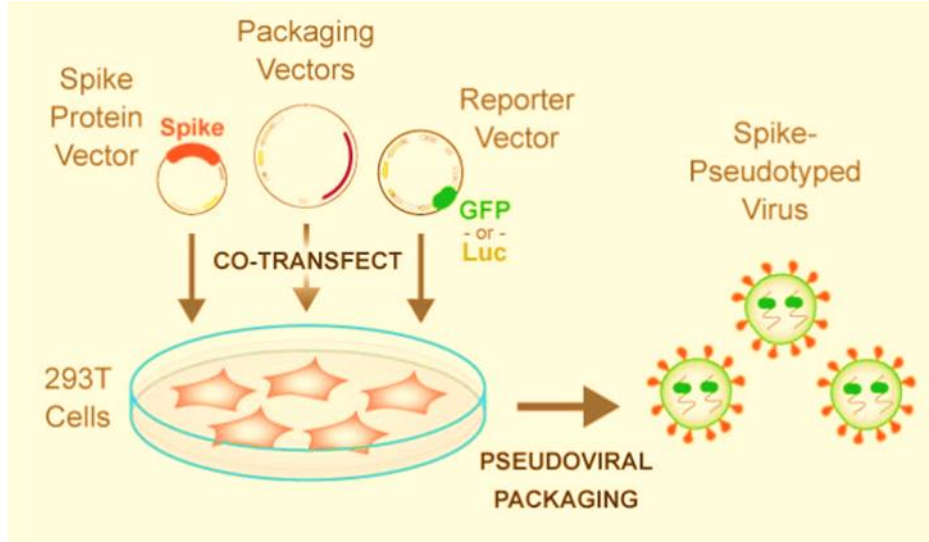
Şekil 3.9: Pseudotip virüslerin hücre kültüründen toplanması.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Pseudovirüs Üretiminin Genel Sonuçları

HIV-1'den türetilen lentiviral parçacıkların pseudotiplendirilmesi için temel strateji Şekil 4.1'de gösterilmiştir. 293T hücrelerinin, bir flüoresan veya lüminesan raportör proteini kodlayan bir lentiviral omurga plazmidi, Spike'ı ifade eden bir plazmit ve viral partikülleri bir araya getirmek için gerekli minimum lentiviral protein setini ifade eden plazmitlerle transfekte edilmesini içerir. Transfekte edilmiş hücreler daha sonra SARSCoV-2 reseptör proteini ACE2'yi ekspresyonuna izin veren hücreleri enfekte etmek için kullanılabilen Spike-pseudotipli lentiviral partiküller üretir (Walls vd., 2020).

Bu çalışmada spike ile pseudotiplenmiş viral parçacıklar üretmek için HIV tabanlı bir lentiviral sistem kullanılmıştır. Şekil 4.1'de gösterildiği gibi, raportör proteinleri kodlayan bir lentiviral omurga, Spike'ı ifade eden bir plazmid ve virion oluşumu için gerekli diğer HIV proteinlerini kodlayan plazmitler (Tat, Gag-Pol ve Rev) ile HEK293T hücrelerinin birlikte transfekte edilmesiyle pseudovirüsler üretilebilmiştir. Lentiviral omurgalar, lusiferaz ifadesini yönlendirmek için bir CMV promotörü ve ardından bir internal (iç) ribozom giriş bölgesi (IRES) ve ZsGreen kullanır. Spike proteini, insan hücrelerinde ekspresyon için optimize edilmiş nükleotit dizisi kodunu ile NCBI açıklamalı (NCBI-annotated) başlangıç bölgesi kullanılarak SARS-CoV-2 türü Wuhan-Hu-1 suşuna aittir (Wu vd., 2020).



Şekil 4.1: Lentiviral pseudotipleme için genel yaklaşım (293T hücreleri, bir işaretleyici protein ifade eden bir lentiviral omurgayı (genom) kodlayan bir plazmid, Spike'ı ifade eden bir plazmid ve virion oluşumu için gerekli diğer HIV proteinlerini (Tat, Gag-Pol ve Rev) ifade eden plazmitlerle transfekte edilir. Transfekte edilmiş hücreler, yüzeylerinde Spike bulunan lentiviral parçacıklar üretir).

S proteinini kodlayan SARS-CoV-2 S plazmidini sentezlendi ve 293T hücrelerine transfekte edildi. Pseudotiplemenin başarısı, pHIV-Luc-ZsGreen plazmidinin GFP için gen kodlamasını entegre ettiğinden, GFP ifadesi ile değerlendirildi.

4.2 Stab Plazmid Kültürlerin Canlandırılması, Transformasyonu ve DNA İzolasyonu Sonuçları

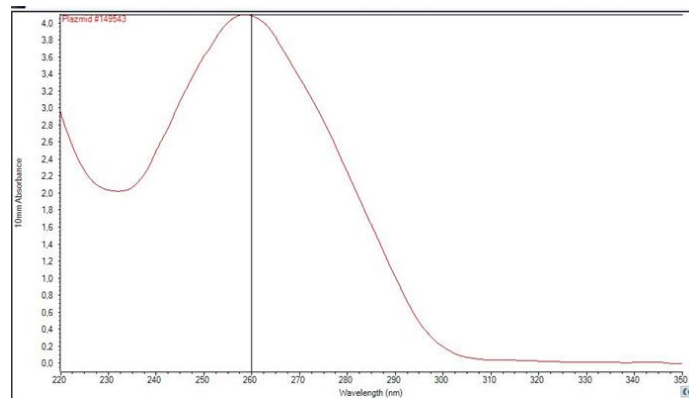
Stab bakteri kültürleri uzun süreli olarak laboratuvar koşullarında muhafaza edilememektedir. Bu sebepten dolayı stab bakteri kültürlerine SOC mediumda canlandırma işlemleri uygulandıktan sonra MN Plazmid İzolasyon Kiti ile plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Stab bakteri kültüründen elde edilen plazmidlerin *E. coli* DH5α kompetent hücrelere transformasyonu gerçekleştirildi. Transform edilmiş bakteri kültürlerinden LB agar besiyerlerine ekim yapıldı. Seyreltilmemiş kültürlerde yoğun üreme tespit edilirken seyrelme yapılan kültürlerde 37 °C'de 16-24 saat inkübasyon sonrasında tekli bakteri kolonisi gelişimi gözlemlendi (Şekil 4.1).



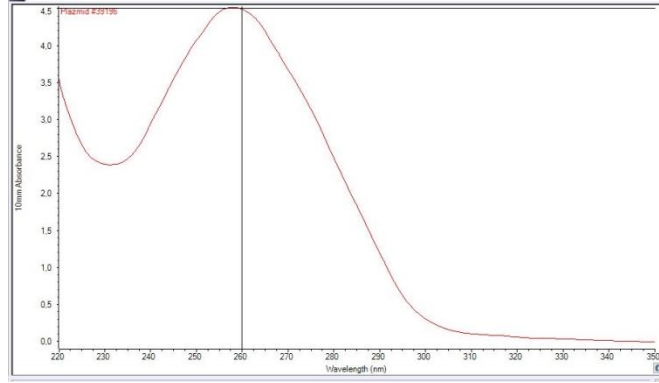
Şekil 4.2: pHIV-Luc-ZsGreen plazmidi içeren transforme bakterinin görüntüsü.

4.3 pDNA'sı Konsantrasyonu ve Saflığının Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

Spektrofotometreyle yapılan soğurma ölçümleri, ilgili dalga boyunda, numunedeki tüm moleküllerin soğurulmasını içermektedir. Nükleotidler, RNA, ssDNA ve dsDNA'nın tümü 260 nm'de absorbe olduğundan, numunenin toplam absorbansına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle, bir NanoDrop Spektrofotometre kullanırken doğru sonuçlar elde etmek için, nükleik asit numunelerinin ölçümden önce saflaştırılması gerekmektedir. Pseudovirüs üretiminde kullanılan her üç plazmidin saflaştırılma işlemleri yapılarak, plazmid DNA örneklerinin 260/280 nm'de spektrofotometrik analizleri yapılmıştır (Şekil 4.2-4).

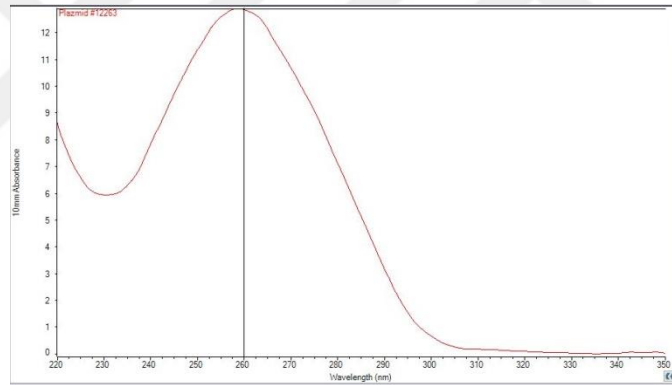


Şekil 4.3: Plazmid #14953 izolasyon sonrası spektral analizi.



Şekil 4.4: Plazmid #39196 izolasyon sonrası spektral analizi.

Plazmid #14953, Plazmid #39196 ve Plazmid #12263 DNA'larının 220-350 nm dalga boyları arasında yapılan spektrum analiz sonuçlarına göre, tüm DNA örneklerinde 260 nm'de maximum absorbans değeri saptanmıştır (Shen, 2019).



Şekil 4.5: Plazmid #12263 izolasyon sonrası spektral analizi.

260 ve 280 nm'de absorbans oranı, DNA ve RNA'nın saflığını değerlendirmek için kullanılır. Yaklaşık 1.8 oranı genellikle DNA için saf olarak kabul edilirken yaklaşık 2.0 oranı da RNA için saf olarak kabul edilmektedir. Oranlar, her iki durumda da kayda değer ölçüde düşükse, bu, 280 nm'de veya yakınında güçlü şekilde protein, fenol veya diğer kirleticilerin varlığını gösterebilir (Lucena-Aguilar vd., 2016). Saflaştırılan her üç plazmidin 260/280 nm oranlarına göre elde edilen DNA'lar yüksek saflıktadır (Çizelge 4.1). DNA örnekleri, bakteriyal lizat karışımından veya saflaştırma işlemleri sırasında kullanılan tamponlardan çeşitli katınlımlar içermemektedir. Plazmid DNA'larının yüksek oranda saflaştırılmış olması transfeksiyon işleminin de yüksek verimle olmasını

sağlayabilmektedir. **Kachel vd.**, (2006), plazmid DNA'sı saflaştırma işlemlerine yönelik geliştirdikleri robotları ile bakteriyel lizatların karmaşık karışımından ultra saf plazmid DNA'yı izole edip ve hücre transfeksiyonlarına dayalı yüksek verimli uygulamaları mümkün hale getirmişlerdir (**Kachel vd.**, 2006).

Çizelge 4.1: Plazmid miniprep kiti ile plazmid DNA izolasyonu sonucunda elde edilen pDNA'ların konsantrasyonu ve saflığının spektrofotometrik ölçüm sonuçları

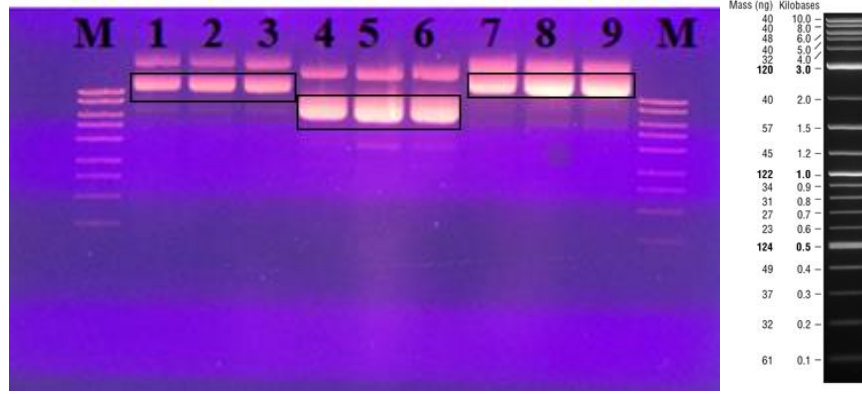
	Konsantrasyon (ng/μl)	A_{260/280}	A_{260/230}
Plazmid # 149543	204.3 ng/μl	1.82 ±0.003	2.01 ±0.005
Plazmid # 39196	224.5 ng/μl	1.81 ±0.001	1.88 ±0.020
Plazmid # 12263	643 ng/μl	1.80 ±0.003	2.17 ±0.001

260/230 nm'deki absorbans oranı da, nükleik asit saflığının tespit edilmesinde önemli olan ikinci parametredir. Saf nükleik asit için 260/230 değerleri genellikle ilgili 260/280 değerlerinden daha yüksektir. Beklenen 260/230 değerleri genellikle 2.0-2.2 aralığındadır. Oranın beklenenden oldukça düşük olması, 230 nm'de absorbe eden kirleticilerin varlığına işaret edebilmektedir. Plazmid # 149543 ve Plazmid # 12263'ün 260/230 oran değeri kabul edilebilirlik düzeyinde tespit edilirken Plazmid # 39196 ait bu oran 2.0 değerinden düşüktür. Ancak oran beklenenden önemli ölçüde düşükse, 230 nm'de absorbe eden kirleticilerin varlığına işaret edebilir. Aksi durumda aynı saflığa sahip iki DNA örneğinden daha az konsantre olan örnek, 230 nm'de tuz absorbansı nedeniyle daha düşük bir 260/230 oranı da gösterbilmektedir. 260/230 oranı, DNA'yı çözmek için salin elüsyon tamponu kullanıldığında bu değer istikrarsızlığı nedeniyle şüpheli bir DNA kalite göstergesi olarak kabul edilir. Bunun nedeni, numunedeki tuz konsantrasyonunun DNA konsantrasyonundan daha fazla artmasıdır. DNA emiliminin kullanılan çözücüye bağlı olduğu bildirilmiştir. Asidik çözeltiler, 260/280 oranını 0.2-0.3 oranında daha az temsil ederken, bazik bir çözelti, oranı 0.2-0.3 oranında fazla temsil edebilmektedir (**Wilfinger vd.**, 1997). DNA saflığının güvenilir ölçümü, birçok moleküler biyoloji uygulaması için önemlidir (**Lucena-Aguilar vd.**, 2016).

4.4 Saflaştırılmış Plazmid DNA'sının Elektroforetik Analiz Sonuçları

MN Plazmid Kiti ile izole edilen pDNA'lar agaroz jel üzerinde görüntülendi. Kit ile izolasyondan sonra jelde süper sarmal (supercoiled) ve gevşek/çentikli sarmal (nicked circles) formda pDNA bantları gözlenmiştir (Şekil 4.5). Kit ile izolasyondan sonra jelde

super sarmal formda 7481, 9321 ve 13.454 bp'lik pDNA bandları tespit edilmiştir. Jel görüntüsünde işaretlenen super sarmal formlar plazmid izolasyonun istenilen ölçülerde olduğunun bir göstergesidir.



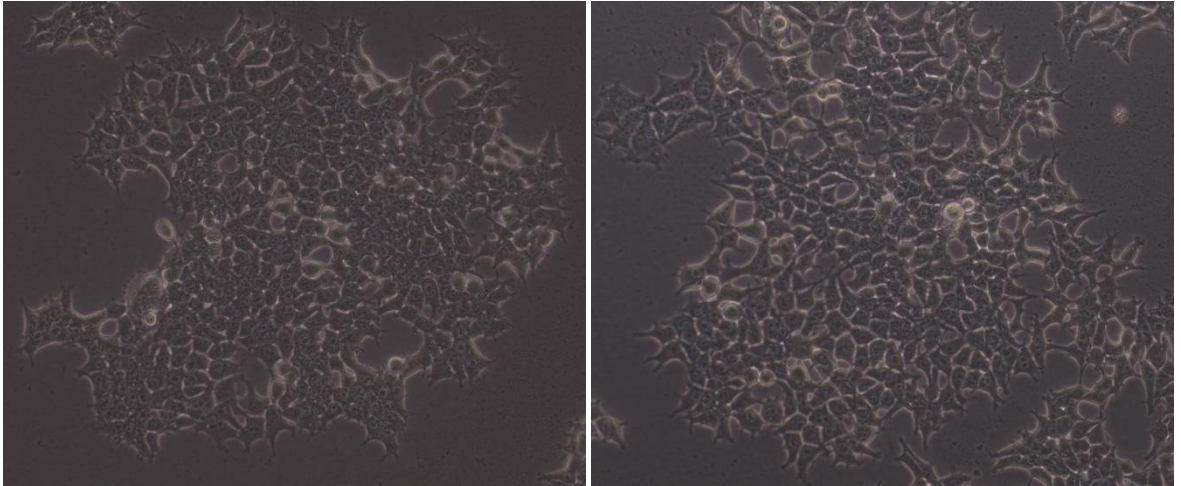
Şekil 4.6: Agaroz jel üzerinde MN Plazmid kiti kullanılarak izole edilen pDNA'ların görüntüsü. M, Marker; 1-3. kuyucuklar, Plazmid #39196 (9321bp); 4-6. kuyucuklar, Plazmid #149543 (7481 bp); 7-9. kuyucuklar, Plazmid #12263 (13.454 bp).

pDNA, az miktarlarda bakteriyel genomik DNA ve değişen oranlarda üç pDNA formu (süper sarmal, gevşek sarmal/ tek zinciri kırık ve doğrusal) içerir. Eğer plazmit DNA'sı süper sarmal formda jelde yürütülürse 3 farklı bant görülür. En üstteki bantta tek zinciri kırık plazmid, orta kısımda lineer hale gelmiş plazmit ve en aşağıda ise süper sarmal plazmid yer alır. Saf ve genellikle super sarmal formda pDNA'nın eldesi oldukça önemlidir (**Abdulrahman ve Ghanem**, 2018). Bu çalışmada, izolasyon kiti ile izole edilen pDNA'nın en optimize edilmiş hali olan super sarmal pDNA elde edilmiştir. Bununla birlikte, super sarmal formun yanı sıra başka biçimlerde pDNA elde etmek, super sarmal DNA'nın agaroz jelden geri kazanılmasını gerektirir. Literatüre göre, pDNA'nın super sarmal formu, çentikli dairesel veya doğrusal DNA'dan daha yüksek transfeksiyon aktivitesi ile sonuçlanmıştır (**Li vd.**, 2010). Topolojinin transfeksiyon verimliliği üzerindeki etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, araştırmacılar, süper sarmal DNA'nın hücrenin perinükleer bölgesine ulaşmak için lineer DNA veya gevşek dairesel DNA'dan daha uygun olduğunu belirtip bu form pDNA'nın transfeksiyon verimliliğini önemli ölçüde artırdığını saptamışlardır (**Hassan vd.**, 2016). DNA topolojisinin bozulmadan super sarmal formu plazmid şeklinde izole edilebilmesi için izolasyon işlemleri sırasında sıcaklık, santrifuj/karıştırma süresi ve şiddetine özellikle dikkat edilmelidir. Aksi takdirde tek sarmallı çentikli veya parçalı halde pDNA formları ortamda meydana gelen gerilim ve sürtünme kuvvetinden dolayı kolaylıkla oluşabilmektedir (**Higgins ve Vologodskii**, 2015).

Bu konformasyonel değişiklik, pDNA'nın transfeksiyon etkinliğini etkileyebilir. Jelden geri kazanım sırasında, süper sargılı pDNA'ya zarar vermemeye özen gösterilmelidir (Azevedo vd., 2019).

4.5 Hücre Kültüründeki Pseudovirüsler Varlığının GFP Işımasıyla Gösterilmesi

Transfeksiyon işlemlerinden sonra HEK293T hücre morfolojisi inverted mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ayrıca plazmidlerin entegrasyonundan sonra pseudovirüs üretimine bağlı olarak rapotör genin GFP' i ekspresyonu floresans ışımada görüntülenmiştir. Bununla birlikte, ilk 48 saatte hücre kültürlerinin bulunduğu 6 kuyucuklu plakalardaki besiyeri rengi de her saatte bir gözlenmiştir (Şekil 4.6). Besiyerinin renginin pembe/kırmızıdan turuncu renge ilk 36 saatlik inkübasyondan sonra yavaş yavaş dönüştüğü tespit edilmiştir. Hücre yoğunluğunun % 60-80'den çok olması durumunda literatürde de belirtildiği üzere besiyeri renginin ortamdaki pH değişimine bağlı olarak hızlı bir şekilde sarı renge dönüşmesi istenilmeyen bir durumdur. Bu renk değişimi makroskobik olarak hücre yoğunluğunun çok arttığını ve hücrelerin hızla yaşlanıp apoptozise uğradığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Millet vd., 2019; Garcia vd., 2014).

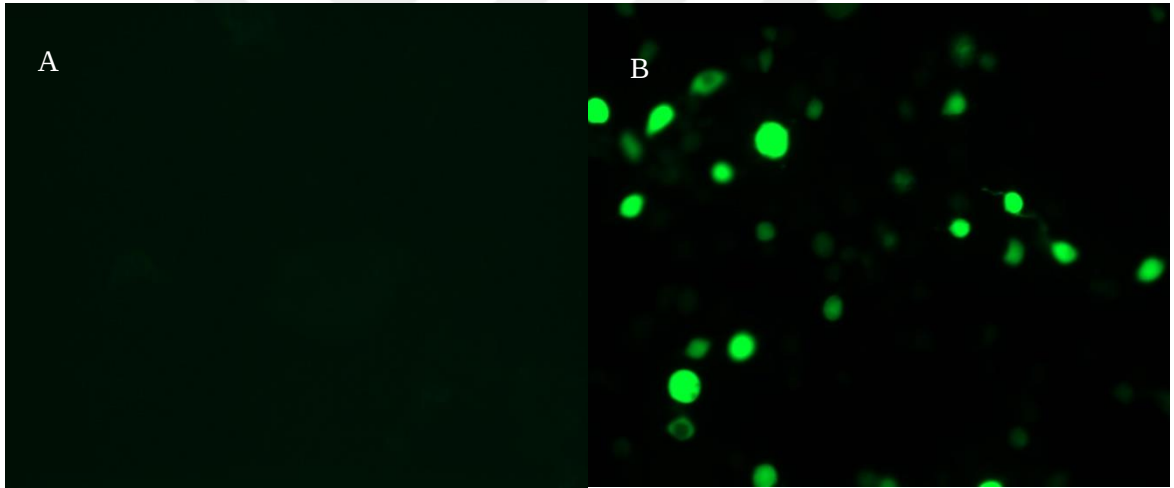


Şekil 4.7: Üçlü plazmid transfeksiyonunun 48. saatinde HEK293T hücrelerinin mikroskobik görüntüleri. Büyütme 20X

Yöntemde üzerinde dikkatle durulması gereken bir dizi kritik adım vardır. Özellikle HEK293T/17 üretici hücre hattının hücre yoğunluğu, başarılı transfeksiyonun sağlanmasında kritik bir faktördür. Millet vd. (2019), % 40-60 hücre yoğunluğun optimal olduğunu belirtmiştir. Daha yüksek yoğunluklar tipik olarak düşük transfeksiyon

verimliliği ve düşük partikül üretimi ile sonuçlanmaktadır (**Millet vd.**, 2019). Ayrıca, HEK-293T/17 hücrelerinin diğer hücre hatlarına göre daha az yapışık (adherent) olduğunu göz önünde tutmak gerekmektedir. İşlemler esnasında hücrelerin plaka yüzeyinden ayrılmamasına özen gösterilmelidir. Bazı çalışmalarda yapışmayı artırmak için hücre kültürü plastik yüzeyleri poli-D-lizinle kaplanmıştır (**Huang vd.**, 2005). Ayrıca, daha yüksek hücre yoğunluğu genellikle zayıf transfeksiyon oranlarıyla sonuçlanır. HEK293T/17 hücrelerine transfeksiyon reaktifi eklendikten sonra, hücre geçirgenliğinin artmaktadır. Bu nedenle bu noktada, sitotoksisiteyi artırabilecekleri için antibiyotik içeren besiyerleri kullanmaktan kaçınmak en iyisidir.

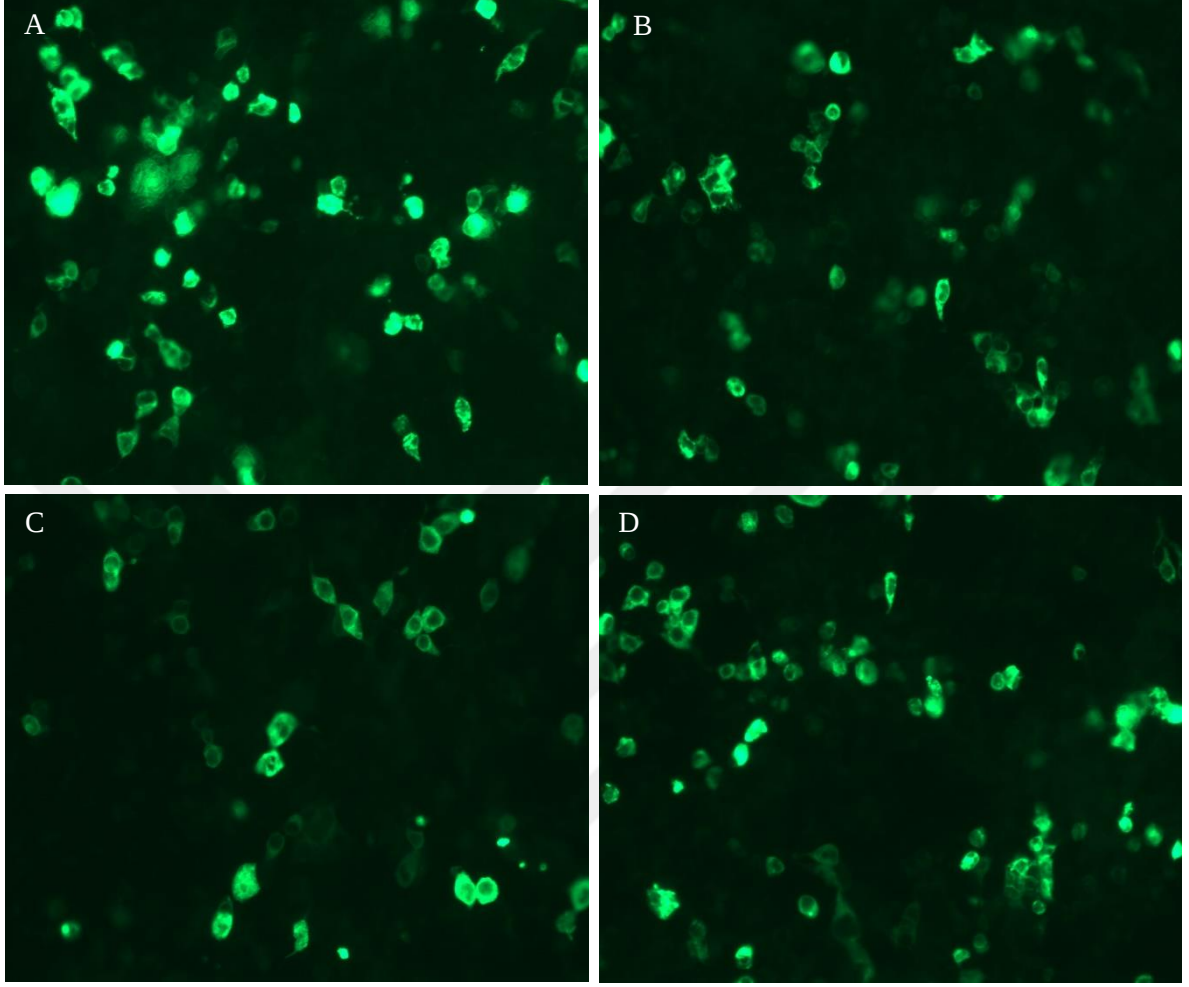
İki farklı kontrol grubunun mikroskop görüntüleri Şekil 4.7’de görülmektedir. Negatif kontrolde herhangi bir floresans ışıma görülmezken sadece GFP raportör gen içeren plazmidin transfekte edildiği pozitif kontrolde üçlü plazmid transfeksiyonun olduğu uygulamalara göre daha az GFP ışıması gözlenmiştir.



Şekil 4.8: Üçlü plazmid transfeksiyonunun 48. saatinde kontrol grubu HEK293T hücrelerinin mikroskopik görüntüleri. A, plazmid transfeksiyonu olmayan hücre kültürü ortamı; B, sadece Plazmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen) transfeksiyonu olan hücre kültür ortamı. Floresans, transfeksiyondan 48 saat sonra kaydedildi. Büyütme 20X.

Pseudotiplenmiş parçacıkları toplamadan önce, transfekte edilmiş HEK293T/17 hücre süpernatantlarının rengi kontrol edilmiştir. Tipik olarak, 48 saatlik transfeksiyondan sonra, hücre kültürü ortamının rengi turuncu-pembe bir renk almıştır. Sarı renkli ortam genellikle zayıf pseudotiplenmiş partikül verimi anlamına gelir ve genellikle hücre yoğunluğu ile ilgili sorunların bir sonucudur. HEK293T hücrelerinin Sars-CoV-2-S proteini ile

pseudotiplenmiş lentiviral vektörle transfeksiyonun 48. Saat görüntülemeleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Taranan tüm bölgelerde yoğun GFP ışımalarına rastlanmıştır.



Şekil 4.9: HEK293T hücrelerinin SarsCoV-2-S proteini ile pseudotiplenmiş lentiviral vektörle transfeksiyonu (A-D). Pseudotiplenmiş vektörlerin hedef hücrelere entegrasyon sonucu yeşil flüoresan proteini (GFP) ışması içerir. Floresans, transfeksiyondan 48 saat sonra kaydedildi. Büyütme 20X.

Bu tezde, pseudo tip parçacık üretimi 6 kuyulu bir plaka biçiminde gerçekleştirilmiştir. Üretilen parçacıkların hacmini artırmak için, 6 kuyulu bir plakanın birkaç kuyucuğu aynı plazmit karışımı ile transfekte edilebilir ve süpernatantlar birleştirebilir. Alternatif olarak, üretimi büyütmek için başka tür kaplar (örn. 25 veya 75 cm² flasklar) kullanılabilir. Bu durumda, transfeksiyon koşulları buna göre ölçeklendirilmelidir.

Pseudotiplenmiş parçacıkların -80 °C’de kriyoviallerde saklanması, enfektivitede gözle görülür bir azalma olmadan birkaç ay boyunca stabilitelerini korumaktadır.

Zamanla enfektivitelerini azaltacağından donma-çözölme döngülerine tabi tutulmaları önerilmez. Bu nedenle, bunları 0,5-1 mL gibi küçük parçalar halinde saklamak ve bir enfeksiyondan önce eritmek en iyisidir.



5. SONUÇ

Biyogüvenlik düzeyi 2 olan bir laboratuvarıda SARS-CoV-2'ye karşı nötrale edici antikor tepkilerini incelemek için kolayca erişilebilen bir yöntem geliştirilmiştir.

Bu yöntem, insan serum veya plazma örneklerinin uygun bir 96 kuyulu formatta taranmasına izin verir; bu, bağışıklık gelişimini daha iyi anlamak ve bağışıklığın pasif transferi için bağışçılar potansiyel olarak taramak amaçlı çok sayıda hasta örneğinin test edilmesini kolaylaştırmaya yardımcı olacaktır. Birçok viral enfeksiyonda nötrale edici antikorların önemi gözardı edilemez. Geçirilmiş enfeksiyon veya aşılama nedeniyle nötrale edici antikorların varlığının, çoğu durumda bireyi gelecekteki enfeksiyondan ve/veya ciddi hastalıktan koruması beklenir. Bu durum, diğer birçok patojen için çalışılmış olsa da, nötrale edici antikorların SARS-CoV-2 enfeksiyonunu ve hastalık şiddetini nasıl etkileyeceği hala belirsizdir. SARS-CoV-2 ortamında antikor nötralizasyonunu ölçen testlerin mevcudiyeti, patogeneiz mekanizmalarının ve bağışıklık sisteminin organizmada virüs varlığına nasıl tepki verdiğinin daha iyi anlaşılmasına yol açacaktır. SARS-CoV-2'ye karşı geliştirilen çeşitli aşılar, 2020 yılından itibaren uygulanmaya başlamıştır. Spike glikoprotein bazlı aşılar için, hücresel bağışıklığın değerlendirilmesiyle birlikte antikor nötralizasyonunu ölçen çalışmalar, aşı etkililiğinin daha iyi anlaşılmasına ve tahmin edilmesine yardımcı olabilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulrahman, A., & Ghanem, A.** (2018). Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1025, 41–57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.001>
- Adamson, C. S., & Jones, I. M.** (2004). The molecular basis of HIV capsid assembly—five years of progress. *Reviews in medical virology*, 14(2), 107-121.
- Adil, M. T., Rahman, R., Whitelaw, D., Jain, V., Al-Taani, O., Rashid, F., & Jambulingam, P.** (2021). SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19. *Postgraduate medical journal*, 97(1144), 110-116.
- Ahmed, SF, Quadeer, AA ve McKay, MR** (2020). SARS-CoV immünolojik çalışmalarına dayalı olarak COVID-19 koronavirüs (SARS-CoV-2) için potansiyel aşı hedeflerinin ön tanımlaması. *Virüsler*, 12(3), 254.
- Akkina, R. K., Walton, R. M., Chen, M. L., Li, Q. X., Planelles, V., & Chen, I. S.** (1996). High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *Journal of virology*, 70(4), 2581-2585.
- Amirache, F., Lévy, C., Costa, C., Mangeot, PE, Torbett, BE, Wang, CX, ... & Verhoeven, E.** (2014). Gizem çözüldü: VSV-G-LV'ler, LDL reseptörüne sahip olmadıkları için uyarılmamış T hücrelerine, B hücrelerine ve HSC'lere verimli gen transferine izin vermez. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 123 (9), 1422-1424.
- Arndt, A. L., Larson, B. J., & Hogue, B. G.** (2010). A conserved domain in the coronavirus membrane protein tail is important for virus assembly. *Journal of virology*, 84(21), 11418-11428.
- Azevedo, G., Valente, J., Sousa, A., Pedro, A., Pereira, P., Sousa, F., & Queiroz, J.** (2019). Effect of Chromatographic Conditions on Supercoiled Plasmid DNA Stability and Bioactivity. *Applied Sciences*, 9(23), 5170. <https://doi.org/10.3390/app9235170>
- Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., & Li, J.** (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses*, 13(6), 1115.
- Bartosch, B., Dubuisson, J. ve Cosset, FL** (2003). Fonksiyonel E1-E2 zarf protein kompleksleri içeren bulaşıcı hepatit C virüsü yalancı parçacıkları. *Deneyisel Tıp Dergisi*, 197 (5), 633-642.
- Banerjee, A., Kulcsar, K., Misra, V., Frieman, M., & Mossman, K.** (2019). Bats and Coronaviruses. *Viruses*, 11(1), 41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>
- Biswas, A., Bhattacharjee, U., Chakrabarti, A. K., Tewari, D. N., Banu, H., & Dutta, S.** (2020). Emergence of Novel Coronavirus and COVID-19: whether to stay or die out? *Critical Reviews in Microbiology*, 46(2), 182–193. <https://doi.org/10.1080/1040841x.2020.1739001>

- Boni, M. F., Lemey, P., Jiang, X., Lam, T. T. Y., Perry, B. W., Castoe, T. A., Rambaut, A., & Robertson, D. L.** (2020). Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. *Nature Microbiology*, 5(11), 1408–1417. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0771-4>
- Boopathi, S., Poma, A. B., & Kolandaivel, P.** (2021). Novel 2019 coronavirus structure, mechanism of action, antiviral drug promises and rule out against its treatment. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(9), 3409-3418.
- Brielle, E. S., Schneidman-Duhovny, D., & Linial, M.** (2020). The SARS-CoV-2 exerts a distinctive strategy for interacting with the ACE2 human receptor. *Viruses*, 12(5), 497.
- Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., & Yee, J. K.** (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 8033-8037.
- Cao, X.** (2020). COVID-19: immünopatoloji ve tedavi için etkileri. *Nature, immünolojiyi gözden geçirir*, 20 (5), 269-270.
- Chan, J. F. W., Kok, K. H., Zhu, Z., Chu, H., To, K. K. W., Yuan, S., & Yuen, K. Y.** (2020). Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 221-236.
- Chang, C. K., Sue, S. C., Yu, T. H., Hsieh, C. M., Tsai, C. K., Chiang, Y. C., & Huang, T. H.** (2006). Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein. *Journal of biomedical science*, 13(1), 59-72.
- Chen, M., & Zhang, X. E.** (2021). Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *International Journal of Biological Sciences*, 17(6), 1574–1580. <https://doi.org/10.7150/ijbs.59184>
- Chen, T., Wu, D. I., Chen, H., Yan, W., Yang, D., Chen, G., & Ning, Q.** (2020). Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: retrospective study. *bmj*, 368.
- Chen, Y., Liu, Q., & Guo, D.** (2020). Emerging coronavirus es: genome structure, replication, and pathogenesis. *Journal of medical virology*, 92(4), 418-423.
- Chen, Y., Yu, Z., Yi, H., Wei, Y., Han, X., Li, Q., ... & Zhang, G.** (2019). The phosphorylation of the N protein could affect PRRSV virulence in vivo. *Veterinary microbiology*, 231, 226-231.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., & Varmus, H. E.** (1997). Retroviruses.
- Cong, Y., Ulasli, M., Schepers, H., Mauthe, M., V'kovski, P., Kriegenburg, F., & Reggiori, F.** (2020). Nucleocapsid protein recruitment to replication-transcription complexes plays a crucial role in coronaviral life cycle. *Journal of virology*, 94(4), e01925-19.

- Corman Victor, M., Olfert, L., Marco, K., Richard, M., Adam, M., Chu Daniel, K. W., ... & Haagmans Bart, L.** (2020). van der Veer Bas, van den Brink Sharon, Wijsman Lisa, Goderski Gabriel, Romette Jean-Louis, Ellis Joanna, Zambon Maria, Peiris Malik, Goossens Herman, Reusken Chantal, Koopmans Marion PG, Drosten Christian. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 25(3).
- Crawford, K. H., Eguia, R., Dingens, A. S., Loes, A. N., Malone, K. D., Wolf, C. R., & Bloom, J. D.** (2020). Protocol and reagents for pseudotyping lentiviral particles with SARS-CoV-2 spike protein for neutralization assays. *Viruses*, 12(5), 513.
- Cronin, J., Zhang, X. Y., & Reiser, J.** (2005). Altering the Tropism of Lentiviral Vectors through Pseudotyping. *Current Gene Therapy*, 5(4), 387–398. <https://doi.org/10.2174/1566523054546224>
- Dai, L., Zheng, T., Xu, K., Han, Y., Xu, L., Huang, E., & Gao, G. F.** (2020). A universal design of betacoronavirus vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 182(3), 722-733.
- Decaro, N., & Lorusso, A.** (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 244, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>
- DeDiego, M. L., Alvarez, E., Almazán, F., Rejas, M. T., Lamirande, E., Roberts, A., ... & Enjuanes, L.** (2007). A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. *Journal of virology*, 81(4), 1701-1713.
- de Haan, C. A., & Rottier, P. J.** (2005). Molecular interactions in the assembly of coronaviruses. *Advances in virus research*, 64, 165-230.
- De Haan, C. A., Vennema, H., & Rottier, P. J.** (2000). Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *Journal of virology*, 74(11), 4967-4978.
- Dickerman, B.A., Gerlovin, H., Madenci, A.L., Kurgansky, K.E., Ferolito, B.R., Figueroa Muniz, M.J., & Hernán, M.A.** (2022). ABD gazilerinde BNT162b2 ve mRNA-1273 aşılarının karşılaştırmalı etkinliği. *New England Journal of Medicine*, 386 (2), 105-115.
- Du, R. H., Liang, L. R., Yang, C. Q., Wang, W., Cao, T. Z., Li, M., ... & Shi, H. Z.** (2020). Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *European Respiratory Journal*, 55(5).
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L.** (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of virology*, 72(11), 8463-8471.
- Dong, L., Tian, J., He, S., Zhu, C., Wang, J., Liu, C., & Yang, J.** (2020). Possible vertical transmission of SARS-CoV-2 from an infected mother to her newborn. *Jama*, 323(18), 1846-1848.
- Dong, Y., Mo, X., Hu, Y., Qi, X., Jiang, F., Jiang, Z., & Tong, S.** (2020). Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics*, 145(6).

- Drexler, J. F., Corman, V. M., & Drosten, C.** (2014). Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral research*, 101, 45-56.
- Drosten, C.** (2014). MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, Eastern Africa, 1983–1997. *Emerging infectious diseases*, 20(12), 2093.
- Du, R. H., Liang, L. R., Yang, C. Q., Wang, W., Cao, T. Z., Li, M., ... & Shi, H. Z.** (2020). Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *European Respiratory Journal*, 55(5).
- Duan, K., Liu, B., Li, C., Zhang, H., Yu, T., Qu, J., & Yang, X.** (2020). Effectiveness of convalescent plasma therapy in severe COVID-19 patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9490-9496.
- Dufait, I., Liechtenstein, T., Lanna, A., Bricogne, C., Laranga, R., Padella, A., Breckpot, K., & Escors, D.** (2012). Retroviral and Lentiviral Vectors for the Induction of Immunological Tolerance. *Scientifica*, 2012, 1–14. <https://doi.org/10.6064/2012/694137>
- Dutta, N. K., Mazumdar, K., & Gordy, J. T.** (2020). The nucleocapsid protein of SARS–CoV-2: a target for vaccine development. *Journal of virology*, 94(13), e00647-20.
- Egloff, C., Vauloup-Fellous, C., Picone, O., Mandelbrot, L., & Roques, P.** (2020). SARS-CoV-2'nin nadir görülen maternal-fetal bulaşmasına ilişkin kanıtlar ve olası mekanizmalar. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104447.
- Espeseth, A. S., Cejas, P. J., Citron, M. P., Wang, D., DiStefano, D. J., Callahan, C., & Bett, A. J.** (2020). Modified mRNA/lipid nanoparticle-based vaccines expressing respiratory syncytial virus F protein variants are immunogenic and protective in rodent models of RSV infection. *npj Vaccines*, 5(1), 1-14.
- Eurosurveillance Editorial Team.** (2020). Nota de los editores: Nuevo coronavirus (2019-nCoV). *Euro Surveill*, 25.
- Fehr, A. R., & Perlman, S.** (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses*, 1-23.
- Finkelshtein, D., Werman, A., Novick, D., Barak, S., & Rubinstein, M.** (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18), 7306-7311.
- Freed, E. O.** (2001). HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*, 26(1), 13-33.
- Gao, H., Yao, H., Yang, S., & Li, L.** (2016). From SARS to MERS: evidence and speculation. *Frontiers of medicine*, 10, 377-382.
- Garcia, V., Krishnan, R., Davis, C., Batenchuk, C., Le Boeuf, F., Abdelbary, H., & Diallo, J. S.** (2014). High-throughput Titration of Luciferase-expressing Recombinant Viruses. *Journal of Visualized Experiments*, 91. <https://doi.org/10.3791/51890>
- Ge, Wang, L. F., & Cowled, C. (Eds.).** (2015). *Bats and viruses: a new frontier of emerging infectious diseases*. John Wiley & Sons.

- Gerasimenko, J. V., Tepikin, A. V., Petersen, O. H., & Gerasimenko, O. V.** (1998). Calcium uptake via endocytosis with rapid release from acidifying endosomes. *Current Biology*, 8(24), 1335-1338.
- Ghareeb, D. A., Saleh, S. R., Nofal, M. S., Kaddah, M. M. Y., Hassan, S. F., Seif, I. K., El-Zahaby, S. A., Khedr, S. M., Kenawy, M. Y., Masoud, A. A., Soudi, S. A., Sobhy, A. A., Sery, J. G., El-Wahab, M. G. A., Elmoneam, A. A. A., Al-mahallawi, A. M., & El-Demellawy, M. A.** (2021). Potential therapeutic and pharmacological strategies for SARS-CoV2. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 51(3), 281–296. <https://doi.org/10.1007/s40005-021-00520-4>.
- Giroglou, T., Cinatl Jr, J., Rabenau, H., Drosten, C., Schwalbe, H., Doerr, HW ve Von Laer, D.** (2004). Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs S proteini ile psödodotiplenmiş retroviral vektörler. *Journal of virology*, 78 (17), 9007-9015.
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., de Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., & Ziebuhr, J.** (2020). Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses—a statement of the Coronavirus Study Group. *BioRxiv*.
- Grifoni, A., Weiskopf, D., Ramirez, S. I., Mateus, J., Dan, J. M., Moderbacher, C. R., & Sette, A.** (2020). Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*, 181(7), 1489-1501.
- Gu, H., Chen, Q., Yang, G., He, L., Fan, H., Deng, Y. Q., & Zhou, Y.** (2020). Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*, 369(6511), 1603-1607.
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X., & Zhong, N. S.** (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England journal of medicine*, 382(18), 1708-1720.
- Guo, Y. R., Cao, Q. D., Hong, Z. S., Tan, Y. Y., Chen, S. D., Jin, H. J., ... & Yan, Y.** (2020). The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak—an update on the status. *Military medical research*, 7(1), 1-10.
- Gupta, M. K., Vemula, S., Donde, R., Gouda, G., Behera, L., & Vadde, R.** (2021). In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(7), 2617-2627.
- Hassan, S., Keshavarz-Moore, E., & Ward, J.** (2016). A cell engineering strategy to enhance supercoiled plasmid DNA production for gene therapy. *Biotechnology and Bioengineering*, 113(9), 2064–2071. <https://doi.org/10.1002/bit.25971>
- Hasson, S. S. A. A., Al-Busaidi, J. K. Z., & Sallam, T. A.** (2015). The past, current and future trends in DNA vaccine immunisations. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(5), 344-353.
- Heald-Sargent, T., & Gallagher, T.** (2012). Ready, set, fuse! The coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*, 4(4), 557-580.

- Higgins, N. P., & Vologodskii, A. V.** (2015). Topological Behavior of Plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0036-2014>
- Hobernik, D., & Bros, M.** (2018). DNA aşılıarı—klinik kullanımdan ne kadar uzakta? *Uluslararası Moleküler Bilimler Dergisi*, 19 (11), 3605.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., & Pöhlmann, S.** (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, 181(2), 271-280.
- Howarth, J. L., Lee, Y. B., & Uney, J. B.** (2009). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell Biology and Toxicology Special Issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biology and Toxicology*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10565-009-9139-5>
- Hsieh, P. K., Chang, S. C., Huang, C. C., Lee, T. T., Hsiao, C. W., Kou, Y. H., & Chang, M. F.** (2005). Assembly of severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA packaging signal into virus-like particles is nucleocapsid dependent. *Journal of virology*, 79(22), 13848-13855.
- Hou, Y., Meulia, T., Gao, X., Saif, L. J., & Wang, Q.** (2019). Deletion of both the tyrosine-based endocytosis signal and the endoplasmic reticulum retrieval signal in the cytoplasmic tail of spike protein attenuates porcine epidemic diarrhea virus in pigs. *Journal of virology*, 93(2), e01758-18.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L.** (2020c). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, 19 (3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Hu, Y., Wen, J., Tang, L., Zhang, H., Zhang, X., Li, Y., & Yang, H.** (2003). The M protein of SARS-CoV: basic structural and immunological properties. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 1(2), 118-130.
- Huang, X., Dai, W., & Darzynkiewicz, Z.** (2005). Enforced Adhesion of Hematopoietic Cells to Culture Dish Induces Endomitosis and Polyploidy. *Cell Cycle*, 4(6), 801–805. <https://doi.org/10.4161/cc.4.6.1695>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., ... & Cao, B.** (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 395(10223), 497-506.
- Jackson, L. A., Anderson, E. J., Roupael, N. G., Roberts, P. C., Makhene, M., Coler, R. N., & Beigel, J. H.** (2020). An mRNA vaccine against SARS-CoV-2—preliminary report. *New England journal of medicine*.
- Jayaweera, M., Perera, H., Gunawardana, B., & Manatunge, J.** (2020). Transmission of COVID-19 virus by droplets and aerosols: A critical review on the unresolved dichotomy. *Environmental research*, 188, 109819.
- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., & Li, X.** (2020). Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV. *Journal of medical virology*, 92(4), 433-440.

- Ji, W., Wang, W., Zhao, X., Zai, J., & Li, X.** (2020). Homologous recombination within the spike glycoprotein of the newly identified coronavirus 2019-nCoV may boost cross-species transmission from snake to human. *Journal of Medical Virology*, doi, 10.
- Jiang, S., Hillyer, C., & Du, L.** (2020). Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends in immunology*, 41(5), 355-359.
- Jiang, S., Hillyer, C., & Du, L.** (2020). Neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Trends in immunology*, 41(5), 355-359.
- Johnson, M. C., Lyddon, T. D., Suarez, R., Salcedo, B., LePique, M., Graham, M., & Ritter, D. G.** (2020). Optimized pseudotyping conditions for the SARS-COV-2 spike glycoprotein. *Journal of virology*, 94(21), e01062-20.
- Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., & Pfeiffer, D. U.** (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(21), 8399-8404.
- Kachel, V., Sindelar, G., & Grimm, S.** (2006). High-throughput isolation of ultra-pure plasmid DNA by a robotic system. *BMC Biotechnology*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-9>.
- Karikó, K., Muramatsu, H., Welsh, FA, Ludwig, J., Kato, H., Akira, S., & Weissman, D.** (2008). Psödouridin mRNAl'ya dahil edilmesi, artan translasyon kapasitesi ve biyolojik stabilite ile üstün immünojenik olmayan vektör verir. *Moleküler terapi* , 16 (11), 1833-1840.
- Katz, R.A., & Skalka, A.M.** (1994). Retroviral enzimler. *Yıllık biyokimya incelemesi*, 63 (1), 133-173.
- Kauffman, K. J., Webber, M. J., & Anderson, D. G.** (2016). Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics. *Journal of Controlled Release*, 240, 227-234.
- Khailany, R. A., Safdar, M., & Ozaslan, M.** (2020). Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene reports*, 19, 100682.
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G.** (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502.
- Klasse, P. J.** (2014). Neutralization of Virus Infectivity by Antibodies: Old Problems in New Perspectives. *Advances in Biology*, 2014, 1–24. <https://doi.org/10.1155/2014/157895>
- Kurnitski, J., Li, Y., Loomans, M., Marks, G., Marr, L. C., & Yao, M.** (2020). How can airborne transmission of COVID-19 indoors be minimised? *Environment International*, 142, 105832. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105832>
- Kutzler, M. A., & Weiner, D. B.** (2008). DNA vaccines: ready for prime time?. *Nature Reviews Genetics*, 9(10), 776-788.
- Lamers, M.M., Beumer, J., Van Der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T.I., & Clevers, H.** (2020). SARS-CoV-2, insan bağırsağı enterositlerini verimli bir şekilde enfekte eder. *Bilim*, 369 (6499), 50-54.

- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., & Yuen, K. Y.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 14040-14045.
- Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H., & Yuen, K. Y.** (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), 14040-14045.
- Leroy, EM, Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., & Swanepoel, R.** (2005). Ebola virüsünün rezervuarları olarak meyve yarasaları. *Doğa*, 438 (7068), 575-576.
- Li, C., Yang, Y. ve Ren, L.** (2020). 2019 yeni koronavirüs ve diğer türlerden koronavirüsün genetik evrim analizi. *Enfeksiyon, Genetik ve Evrim*, 82, 104285.
- Li, H., Bo, H., Wang, J., Shao, H., & Huang, S.** (2010). Separation of supercoiled from open circular forms of plasmid DNA, and biological activity detection. *Cytotechnology*, 63(1), 7–12. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9322-9>
- Li, Q., Liu, Q., Huang, W., Li, X., & Wang, Y.** (2018). Current status on the development of pseudoviruses for enveloped viruses. *Reviews in medical virology*, 28(1), e1963.
- Lighter, Çakmak, J., Phillips, M., Hochman, S., Sterling, S., Johnson, D., Francois, F., & Stachel, A.** (2020). 60 yaşından küçük hastalarda obezite, Covid-19 hastane başvuruları için bir risk faktörüdür. *Klinik Bulaşıcı Hastalıklar*, 71 (15), 896-897.
- Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., & Ho, D. D.** (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 584(7821), 450-456.
- Liu, Y., Mao, B., Liang, S., Yang, J. W., Lu, H. W., Chai, Y. H., & Xu, J. F.** (2020). Association between age and clinical characteristics and outcomes of COVID-19. *European Respiratory Journal*, 55(5).
- Li, F.** (2016). Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annual review of virology*, 3, 237-261.
- Lopes, A., Vandermeulen, G. ve Pr  at, V.** (2019). Kanser DNA aşıları: mevcut preklinik ve klinik gelişmeler ve gelecek perspektifleri. *Deneysel ve Klinik Kanser Araştırmaları Dergisi*, 38 (1), 1-24.
- Lu, H., Stratton, C. W., & Tang, Y. W.** (2020). Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *Journal of medical virology*, 92(4), 401.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., & Tan, W.** (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The lancet*, 395(10224), 565-574.
- Lu, X., Zhang, L., Du, H., Zhang, J., Li, Y.Y., Qu, J., & Wong, G.W.** (2020). Çocuklarda SARS-CoV-2 enfeksiyonu. *New England Journal of Medicine*, 382 (17), 1663-1665.

- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R.** (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>.
- Lurie, N., Saviile, M., Hatchett, R., & Halton, J.** (2020). Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed. *New England journal of medicine*, 382(21), 1969-1973.
- Maetzig, T., Galla, M., Baum, C., & Schambach, A.** (2011). Gammaretroviral Vectors: Biology, Technology and Application. *Viruses*, 3(6), 677–713. <https://doi.org/10.3390/v3060677>
- Malik, Y.S., Sircar, S., Bhat, S., Sharun, K., Dhama, K., Dadar, M., & Chaicumpa, W.** (2020). Ortaya çıkan yeni koronavirüs (2019-nCoV)—mevcut senaryo, genom analizine dayalı evrimsel bakış açısı ve son gelişmeler. *Üç aylık veteriner*, 40 (1), 68-76.
- Mallapaty, S.** (2020). Animal source of the coronavirus continues to elude scientists. *Nature (Lond.)*.
- Masters, P. S.** (2006). The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193-292.
- McBride, R., Van Zyl, M., & Fielding, B.C.** (2014). Koronavirüs nükleokapsidi çok işlevli bir proteindir. *Virüsler*, 6 (8), 2991-3018.
- Millet, J. K., Tang, T., Nathan, L., Jaimes, J. A., Hsu, H. L., Daniel, S., & Whittaker, G. R.** (2019). Production of Pseudotyped Particles to Study Highly Pathogenic Coronaviruses in a Biosafety Level 2 Setting. *Journal of Visualized Experiments*, 145. <https://doi.org/10.3791/59010>
- Milone, M. C., & O'Doherty, U.** (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32(7), 1529–1541. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0106-0>.
- Mishra, T., Sreepadmanabh, M., Ramdas, P., Sahu, A. K., Kumar, A., & Chande, A.** (2021). SARS CoV-2 nucleoprotein enhances the infectivity of lentiviral spike particles. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 663688.
- Morawska, L., Tang, J. W., Bahnfleth, W., Bluysen, P. M., Boerstra, A., Buonanno, G., Cao, J., Dancer, S., Floto, A., Franchimon, F., Haworth, C., Hogeling, J., Isaxon, C., Jimenez, J. L.,**
- Müller, M. A., Corman, V. M., Jores, J., Meyer, B., Younan, M., Liljander, A., & Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., & Hassan, M. I.** (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1866(10), 165878.
- Neuman, B.W., Kiss, G., Kunding, A.H., Bhella, D., Baksh, M.F., Connelly, S., & Buchmeier, M.J.** (2011). Koronavirüs montajı ve morfolojisinde M proteininin yapısal bir analizi. *Yapısal Biyoloji Dergisi*, 174 (1), 11-22.
- Nie, J., Huang, W., Liu, Q., & Wang, Y.** (2020). HIV-1 pseudoviruses constructed in China regulatory laboratory. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 32-41.

- Nie, J., Li, Q., Wu, J., Zhao, C., Hao, H., Liu, H., & Wang, Y. (2020). Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 680-686.
- Nie, J., Wu, X., Ma, J., Cao, S., Huang, W., Liu, Q., ... & Wang, Y. (2017). Development of in vitro and in vivo rabies virus neutralization assays based on a high-titer pseudovirus system. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Nunnally, B. K., Turula, V. E., & Sitrin, R. D. (Eds.). (2015). Vaccine analysis: strategies, principles, and control.
- Ortego, J., Escors, D., Laude, H., & Enjuanes, L. (2002). Generation of a replication-competent, propagation-deficient virus vector based on the transmissible gastroenteritis coronavirus genome. *Journal of virology*, 76(22), 11518-11529.
- Ory, D. S., Neugeboren, B. A., & Mulligan, R. C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(21), 11400-11406.
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., ... & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, 11(1), 1620.
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P., & Ippodrino, R. (2020). Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of translational medicine*, 18(1), 1-9.
- Pal, M., Berhanu, G., Desalegn, C., & Kandi, V. (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.7423>
- Pamukcu, C. (2021). *Development of a pseudovirus-based assay for analysis of neutralizing activity against SARS-CoV-2* (Doctoral dissertation).
- Pardi, N., Hogan, M.J., Porter, F.W., & Weissman, D. (2018). mRNA aşılı—aşı biliminde yeni bir çağ. *Doğa incelemeleri İlaç keşfi*, 17 (4), 261-279.
- Paules, C. I., Marston, H. D., & Fauci, A. S. (2020). Coronavirus infections—More than just the common cold. *Jama*, 323(8), 707-708.
- Petsch, B., Schnee, M., Vogel, AB, Lange, E., Hoffmann, B., Voss, D., & Kramps, T. (2012). İn vitro sentezlenmiş, spesifik mRNA aşılarının influenza A virüsü enfeksiyonuna karşı koruyucu etkinliği. *Doğa biyoteknolojisi*, 30 (12), 1210-1216.
- Pluta, K., & Kacprzak, M. (2009). Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochimica Polonica*, 56(4), 531-595.
- Polack, F.P., Thomas, S.J., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., & Gruber, W.C. (2020). BNT162b2 mRNA Covid-19 aşısının güvenliği ve etkinliği. *New England tıp dergisi*.
- Radoshitzky, S. R., Abraham, J., Spiropoulou, C. F., Kuhn, J. H., Nguyen, D., Li, W., ... & Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*, 446(7131), 92-96.

- Sakr, M. M., Elsayed, N. S., & El-Housseiny, G. S.** (2021). Latest updates on SARS-CoV-2 genomic characterization, drug, and vaccine development; a comprehensive bioinformatics review. *Microbial pathogenesis*, 154, 104809.
- Sakr, M. M., Elsayed, N. S., & El-Housseiny, G. S.** (2021). Latest updates on SARS-CoV-2 genomic characterization, drug, and vaccine development; a comprehensive bioinformatics review. *Microbial pathogenesis*, 154, 104809.
- Sanders, D. A.** (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Current opinion in biotechnology*, 13(5), 437-442.
- Shang, J., Wan, Y., Luo, C., Ye, G., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F.** (2020). SARS-CoV-2'nin hücre giriş mekanizmaları. *Ulusal Bilimler Akademisi Tutanakları*, 117 (21), 11727-11734.
- Stadler K, Massignani V, Eickmann M, Becker S et al.** SARS — beginning to understand a new virus. SARS — beginning to understand a new virus. *Nature Reviews Microbiology* volume 1, pages209–218(2003). DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375156-0.00031-X>.
- Schoeman, D., & Fielding, B. C.** (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, 16(1), 1-22.
- Schwegmann-Weßels, C., Glende, J., Ren, X., Qu, X., Deng, H., Enjuanes, L., & Herrler, G.** (2009). Comparison of vesicular stomatitis virus pseudotyped with the S proteins from a porcine and a human coronavirus. *Journal of general virology*, 90(7), 1724-1729.
- Shen, C.** (2019). *Diagnostic Molecular Biology* (1st ed.). Academic Press.
- Shereen MA, Khan S, Kazmi A, Bashir N, Siddique R.** COVID-19 infection: Origin, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *J Adv Res.* 2020;24:91–98.
- Shi, C. S., Nabar, N. R., Huang, N. N., & Kehrl, J. H.** (2019). SARS-Coronavirus Open Reading Frame-8b triggers intracellular stress pathways and activates NLRP3 inflammasomes. *Cell death discovery*, 5(1), 1-12.
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., & Bu, Z.** (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS–coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016-1020.
- Siddell, S. G., Walker, P. J., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adams, M. J., Dutilh, B. E., & Davison, A. J.** (2019). Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). *Archives of virology*, 164(3), 943-946.
- Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., ... & Qin, C.** (2019). From SARS to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *viruses*, 11(1), 59.
- Su, S., Wong, G., Shi, W., Liu, J., Lai, A. C., Zhou, J., & Gao, G. F.** (2016). Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in microbiology*, 24(6), 490-502.

- Sun, J., Zhu, A., Li, H., Zheng, K., Zhuang, Z., Chen, Z., Shi, Y., Zhang, Z., Chen, S., Liu, X., Dai, J., Li, X., Huang, S., Huang, X., Luo, L., Wen, L., Zhuo, J., Li, Y., Wang, Y., & Li, Y. (2020). Isolation of infectious SARS-CoV-2 from urine of a COVID-19 patient. *https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1760144*, 9(1), 991–993. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1760144>
- Suschak, J. J., Williams, J. A., & Schmaljohn, C. S. (2017). Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(12), 2837-2848.
- Tareen, S. U., Nicolai, C. J., Campbell, D. J., Flynn, P. A., Slough, M. M., Vin, C. D., Kelley-Clarke, B., Odegard, J. M., & Robbins, S. H. (2013). A Rev-Independent gag/pol Eliminates Detectable psi-gag Recombination in Lentiviral Vectors. *BioResearch Open Access*, 2(6), 421–430. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0037>
- Thomas, S. (2020). The structure of the membrane protein of SARS-CoV-2 resembles the sugar transporter SemiSWEET. *Pathogens and Immunity*, 5(1), 342.
- Tu, Y. F., Chien, C. S., Yarmishyn, A. A., Lin, Y. Y., Luo, Y. H., Lin, Y. T., & Chiou, S. H. (2020). A review of SARS-CoV-2 and the ongoing clinical trials. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2657.
- Otter, J. A., Donskey, C., Yezli, S., Douthwaite, S., Goldenberg, S., & Weber, D. J. (2016). Transmission of SARS and MERS coronaviruses and influenza virus in healthcare settings: the possible role of dry surface contamination. *Journal of hospital infection*, 92(3), 235-250.
- Ou, X., Liu, Y., Lei, X., Li, P., Mi, D., Ren, L., ... & Qian, Z. (2020). Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature communications*, 11(1), 1620.
- Van Boheemen, S., De Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., & Fouchier, R.A. (2012). İnsanlarda akut solunum sıkıntısı sendromu ile ilişkili yeni keşfedilen bir koronavirüsün genomik karakterizasyonu. *MBio*, 3(6), e00473-12.
- Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol*, 36(1), 1-22.
- V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>.
- Wang, C., Liu, Z., Chen, Z., Huang, X., Xu, M., He, T., & Zhang, Z. (2020). The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of medical virology*, 92(6), 667-674.
- Wang, Y., Grunewald, M., & Perlman, S. (2020). Coronaviruses: an updated overview of their replication and pathogenesis. *Coronaviruses: Methods and Protocols*, 1-29.

- Welch, S. R., Guerrero, L. W., Chakrabarti, A. K., McMullan, L. K., Flint, M., Bluemling, G. R., ... & Albariño, C. G. (2016). Lassa and Ebola virus inhibitors identified using minigenome and recombinant virus reporter systems. *Antiviral Research*, 136, 9-18.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Veesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Wang, H., Yang, P., Liu, K., Guo, F., Zhang, Y., Zhang, G., & Jiang, C. (2008). SARS coronavirus entry into host cells through a novel clathrin-and caveolae-independent endocytic pathway. *Cell research*, 18(2), 290-301.
- Wang, C., Liu, Z., Chen, Z., Huang, X., Xu, M., He, T., & Zhang, Z. (2020). The establishment of reference sequence for SARS-CoV-2 and variation analysis. *Journal of medical virology*, 92(6), 667-674.
- Wang, L. F., Shi, Z., Zhang, S., Field, H., Daszak, P., & Eaton, B. T. (2006). Review of bats and SARS. *Emerging infectious diseases*, 12(12), 1834.
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020a). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, M. Y., Zhao, R., Gao, L. J., Gao, X. F., Wang, D. P., & Cao, J. M. (2020a). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A.
- Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., & Qi, J. (2020). Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904.
- Wells, J. M., Li, L. H., Sen, A., Jahreis, G. P., & Hui, S. W. (2000). Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors. *Gene Therapy*, 7(7), 541-547.
- Wenzhong, T., & Hualan, L. (2020). Attacks the 1-beta chain of hemoglobin and captures the porphyrin to inhibit human heme metabolism. *ChemRxiv. Preprint*, 10.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-481. <https://doi.org/10.2144/97223st01>.
- Woo, P. C., Lau, S. K., Lam, C. S., Lau, C. C., Tsang, A. K., Lau, J. H., ... & Yuen, K. Y. (2012). Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *Journal of virology*, 86(7), 3995-4008.
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., & Jiang, T. (2020). Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell host & microbe*, 27(3), 325-328.

- Wu, F., Wang, A., Liu, M., Wang, Q., Chen, J., Xia, S., & Huang, J. (2020). COVID-19 ile iyileşmiş bir hasta kohortunda SARS-CoV-2'ye karşı nötrale edici antikör tepkileri ve bunların sonuçları. *MedRxiv* .
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y. M., Wang, W., Song, Z. G., Hu, Y., Tao, Z. W., Tian, J. H., Pei, Y. Y., Yuan, M. L., Zhang, Y. L., Dai, F. H., Liu, Y., Wang, Q. M., Zheng, J. J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>.
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *jama*, 323(13), 1239-1242.
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *jama*, 323(13), 1239-1242.
- Xiang, Q., Li, L., Wu, J., Tian, M., & Fu, Y. (2022). Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiological Research*, 258, 126993. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126993>
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., & Wang, F. S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet respiratory medicine*, 8(4), 420-422.
- Yang, L., Pei, R. J., Li, H., Ma, X. N., Zhou, Y., Zhu, F. H., ... & Zuo, J. P. (2021). Identification of SARS-CoV-2 entry inhibitors among already approved drugs. *Acta Pharmacologica Sinica*, 42(8), 1347-1353.
- Zeng, C., Zhang, C., Walker, PG ve Dong, Y. (2020). mRNA aşılı için formülasyon ve dağıtım teknolojileri.
- Zettl, F., Meister, T. L., Vollmer, T., Fischer, B., Steinmann, J., Krawczyk, A., ... & Zimmer, G. (2020). Rapid quantification of SARS-CoV-2-neutralizing antibodies using propagation-defective vesicular stomatitis virus pseudotypes. *Vaccines*, 8(3), 386.
- Zheng, Y. Y., Ma, Y. T., Zhang, J. Y., & Xie, X. (2020). COVID-19 and the cardiovascular system. *Nature reviews cardiology*, 17(5), 259-260.
- Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... & Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.
- Zhou, P., Yang, X. L., Wang, X. G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., ... & Shi, Z. L. (2020). Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*, 2020-01.
- Zost, S.J., Gilchuk, P., Case, J.B., Binshtein, E., Chen, R.E., Nkolola, J.P., & Crowe, J.E. (2020). SARS-CoV-2'ye karşı güçlü bir şekilde nötrleştirici ve koruyucu insan antikörleri. *Doğa*, 584 (7821), 443-449.

İNTERNET KAYNAKÇASI

- Addgene plasmid # 141184; <http://n2t.net/addgene:141184>; RRID: Addgene_141184) adresinden 30 Temmuz 2022 tarihinde erişildi.
- Kimerik 5' LTR'lerin kullanımı (<https://www.addgene.org/>) adresinden 10 Haziran tarihinde erişildi.
- Kendiliğinden inaktive olan (SIN) plazmidler (<https://www.addgene.org/>) adresinden 15 Haziran tarihinde erişildi.
- Lentiviral transfer vektörü (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>) adresinden 2 Haziran tarihinde erişildi.
- Plazmid #39196 (pHIV-Luc-ZsGreen) şematik gösterimi (Addgene plasmid # 39196; <http://n2t.net/addgene:39196>; RRID: Addgene_39196) adresinden 1 Temmuz 2022 tarihinde erişildi.
- Plazmid #12263 (pCMV-delta R8.2) şematik gösterimi (Addgene plasmid # 12263; <http://n2t.net/addgene:12263>; RRID: Addgene_12263) adresinden 19 Temmuz 2022 tarihinde erişildi.
- Plazmid #149543 (pGBW-m4137384) şematik gösterimi (Addgene plasmid # 149543; <http://n2t.net/addgene:149543>; RRID: Addgene_149543) adresinden 20 Temmuz 2022 tarihinde erişildi.
2. nesil lentiviral transfer plazmitleri, (<https://www.addgene.org/guides/lentivirus>) adresinden 15 Haziran 2022 tarihinde erişildi.
3. Nesil lentiviral plazmitlerin şematik gösterimi (<https://www.addgene.org/>) adresinden 20 Haziran tarihinde erişildi.
- Viral üretim şeması (<https://www.addgene.org/>) adresinden 2 Temmuz tarihinde erişildi.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Zehra KÖSEOĞLU

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2008-2012 İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
- **Yüksek Lisans** : İnönü Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Biyoteknoloji

MESLEKİ DENEYİM:

2013 -2022 yıllarında özel sektörde biyoloji öğretmeni olarak görev yapmış bulunmaktayım.