SARS-CoV-2'ye karşı oluşan hücresel ve humoral immün yanıt, asemptomatik COVID-19 hastalarında semptomatik olanlara göre daha düşüktür

Eur. J. Immunol. 2020. 50: 2013–2024 DOI: 10.1002/eji.202048915 Alessio Mazzoni et al. 2013

European Journal of Immunology

Immunity to infection

Clinical

Research Article

Cell-mediated and humoral adaptive immune responses to SARS-CoV-2 are lower in asymptomatic than symptomatic COVID-19 patients

Alessio Mazzoni[1], Laura Maggi*[1], Manuela Capone[1], Michele Spinicci[1,2], Lorenzo Salvati[1], Maria Grazia Colao[3], Anna Vanni[1], Seble Tekle Kiros[3], Jessica Mencarini[1,2], Lorenzo Zammarchi[1,2], Elisabetta Mantengoli[2], Lorenzo Menicacci[1], Eleonora Caldini[1], Sergio Romagnani[1], Francesco Liotta[1,4], Alessandro Morettini[5], Gian Maria Rossolini[1,3], Alessandro Bartoloni[1,2], Lorenzo Cosmi[1,4] and Francesco Annunziato[1,6]*

Uzm.Dr.Ayşe ARSLAN

BURSA/2021

Sunum Planı

- Giriş
- Materyal ve metod
- Sonuçlar
- Tartışma
- Makalenin mesajları

Giriş

- COVID-19, Coronavirüs (CoV) ailesinden
- Dört yapısal protein: S, E, M ve N
- N proteini viral RNA ile etkileşimde, S, E ve Mproteinleri lipid zarfına tutturulmuştur
- M proteini, zarf içinde en bol olanıdır

Giriş

- COVID-19 kliniği çok çeşitlidir
  - asemptomatik, hafif, şiddetli, kritik
- Kazanılmış immün yanıt önemlidir
  - Patojenin temizlenmesi
  - Nötralize edici antikorların üretimi
  - Patojen reaktif T hücrelerinin gelişimi/ekspansiyonu
  - Reenfeksiyonu önlemek için immünolojik bellek oluşumu

Giriş

- SARS-CoV-2 ile enfekte hastalarda kazanılmış immün yanıtın özelliklerini karakterize etmek
- Virüsün hangi bileşenlerinin güçlü ve koruyucu immün yanıt ortaya çıkardığını anlamak
- Etkili aşı tasarlamak

Sunulan çalışmada:
Semptomatik ve asemptomatik COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2'ye özgül hücresel ve humoral immün yanıt araştırılmıştır

Materyal ve Metot

Hasta seçimi

- 22 SARS-CoV-2 ile enfekte hasta (NFS örneklerinden PCR ile doğrulanmış)
- Semptomatik 14 hasta: WHO sınıflandırmasına göre , orta ile şiddetli
- Asemptomatik 8 hasta: tarama sırasında pozitif bulunan sağlık çalışanları
- Sağlıklı kontrol-15 (Hasta grubuna yaş dağılımı açısından benzer, SARS-CoV-2 PCR, IgG ve IgM negatif)

Materyal ve Metod

SARS-CoV-2-reaktif T hücrelerinin değerlendirilmesi

- PBMNC (*Periferic blood mononuclear cell*) dansite gradiyent yöntemi
- PBMNC kültür
  - ✓ Sadece medium (arka plan, negatif kontrol)
  - ✓ N, M, S SARS-CoV-2 peptit havuzu
- Peptit havuzları N ve M proteinlerin tüm dizisi, S proteinin-belli bir aa dizisi

Materyal ve Metod

SARS-CoV-2 reaktif T hücrelerinin değerlendirilmesi

- Kümülatif SARS-CoV-2 yanıtının değerlendirilmesi- aynı kuyucukta üç peptit havuzu karışımı

- Florokrom-konjuge antikorlar ile boyama
- Flow sitometri incelemesi

- *Stafilokokal enterotoksin B* (SEB)-Pozitif kontrol

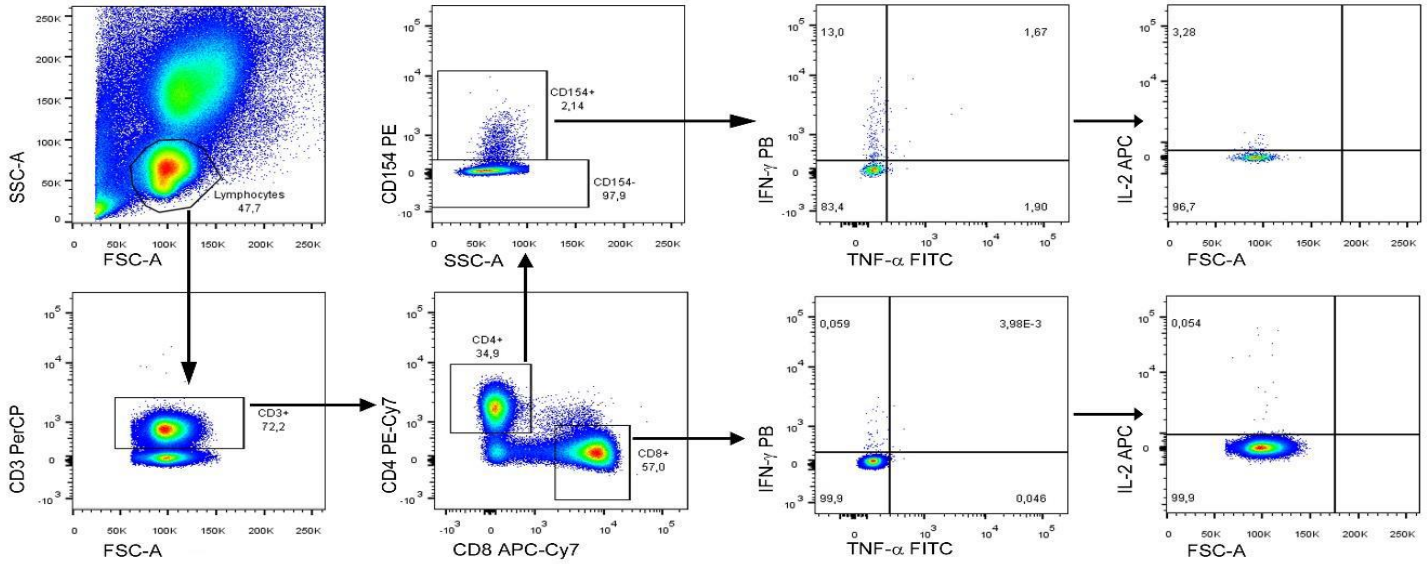
Materyal ve Metot

ELISA ile SARS-CoV-2'ye özgü

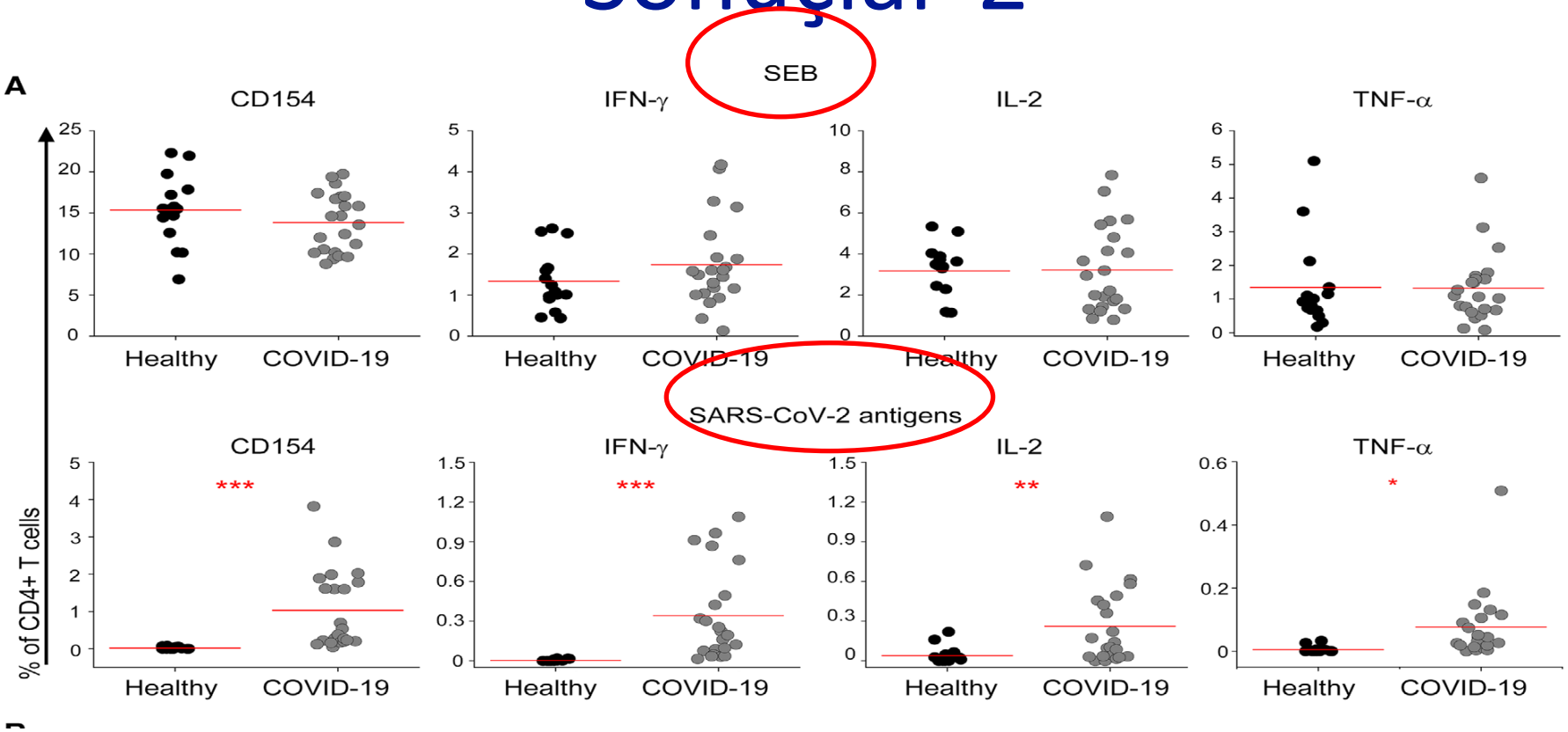
- IgM
- IgA
- IgG'nin değerlendirilmesi

Sonuçlar-1

- Antijene özgül T hücreleri
  - CD154 (CD40 L)
  - IL-2
  - IFN-y ve TNF-α'nın eşzamanlı ekspresyonu ile tanımlandı



Sonuçlar-2

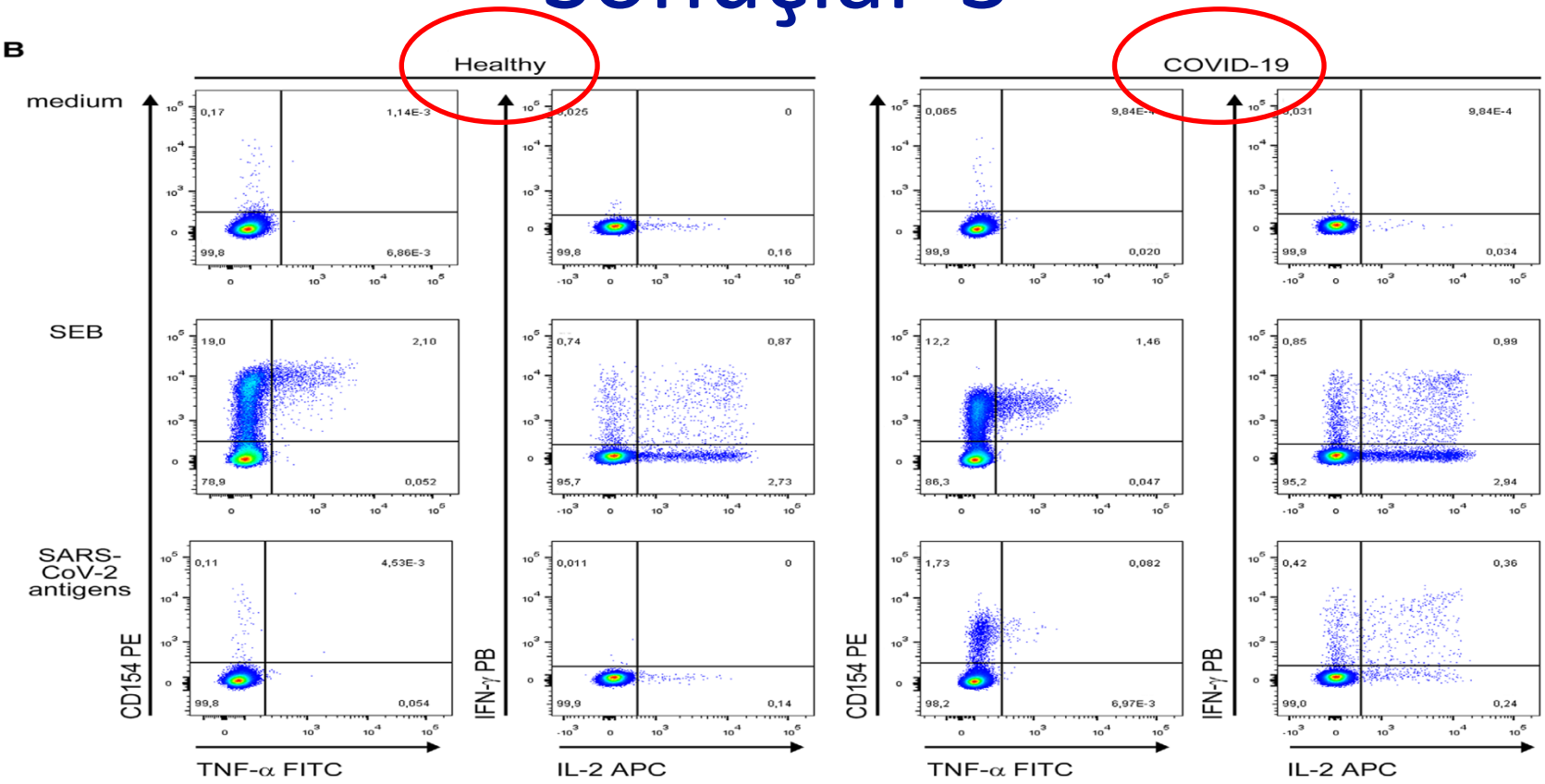


COVID-19 hastalarından ve sağlıklı kontrol grubundan elde edilen $CD4^+$ T hücrelerinin SEB'ye karşı oluşturduğu immun yanıt arasında fark yok

- $CD154^+$ hücrelerinin oranı
- IL-2, IFNy ve TNF-α üretme yeteneği

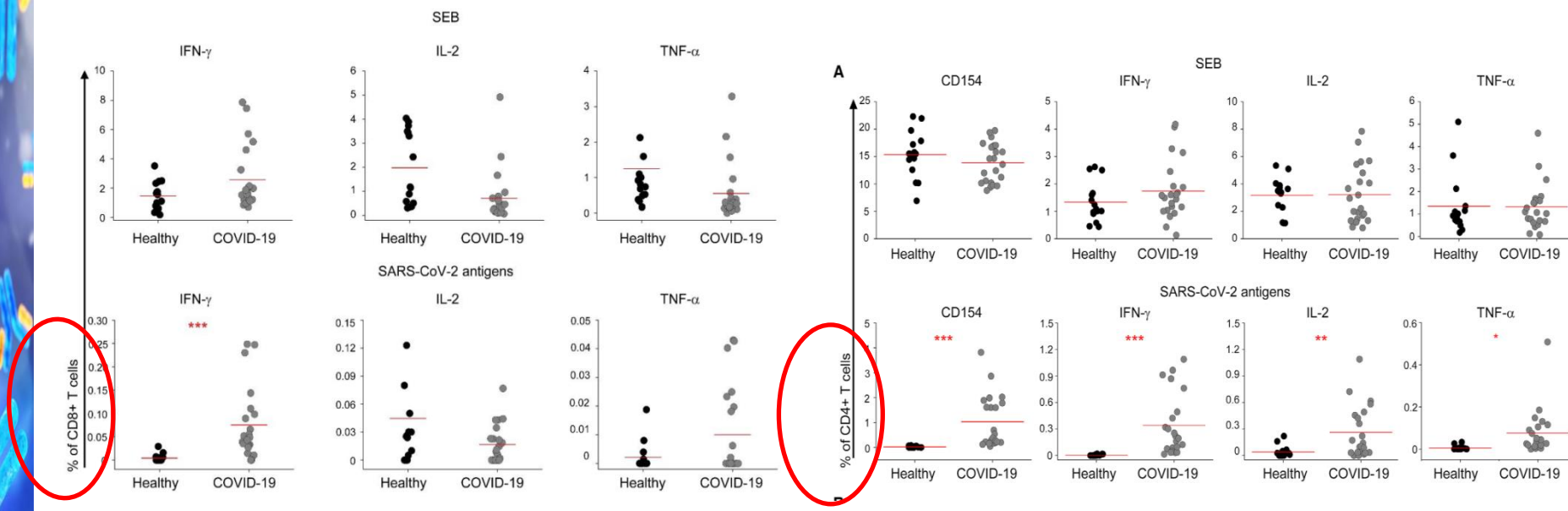
Buna göre COVID-19 hastalarında ve kontrollerde SEB gibi bir süperantijenik uyarana karşılaştırılabilir bir yanıt verilebildiği gözlendi

Sonuçlar-3



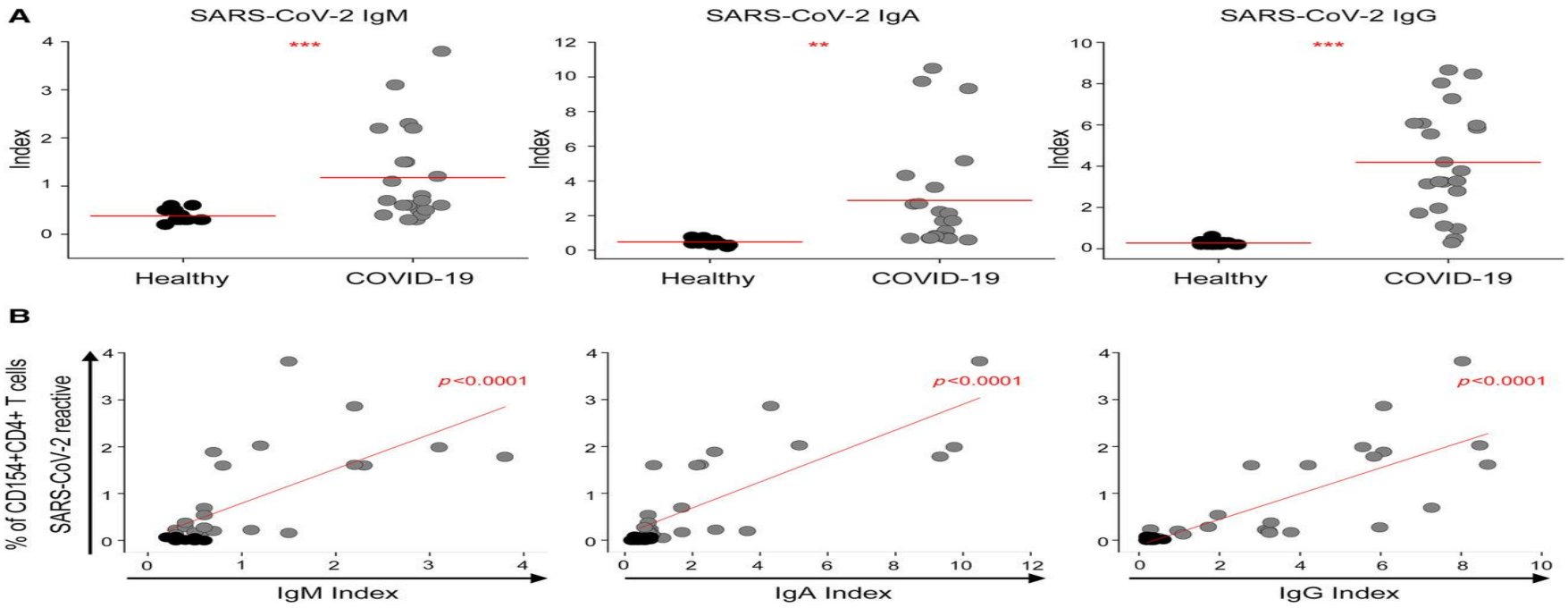
- COVID-19 hastaları SARS-CoV-2 peptit havuzuna karşı net bir $CD4^+$ T hücresi reaksiyonu gösterirken, kontrol grubunun hiçbirinde bu yanıt yok

Sonuçlar-4



- SARS CoV-2 reaktif CD8⁺ T hücrelerinin (IFN-γ üretimi ile karakterize edilmiş) oranı, CD4⁺ T hücrelerine kıyasla daha düşük

Sonuçlar-5

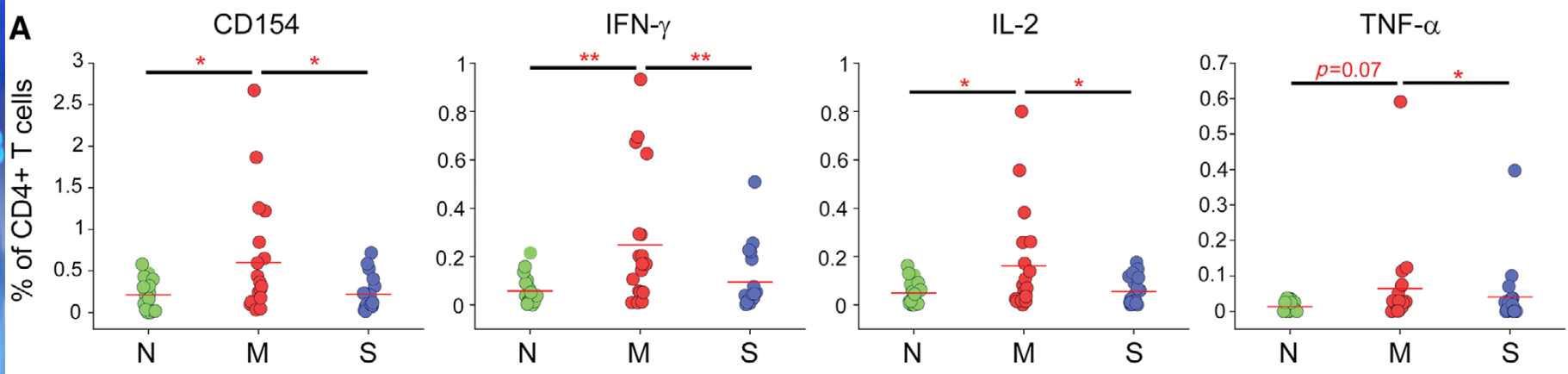


- COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek seviyelerde SARS-CoV-2'ye özgü IgM, IgA ve IgG antikorları

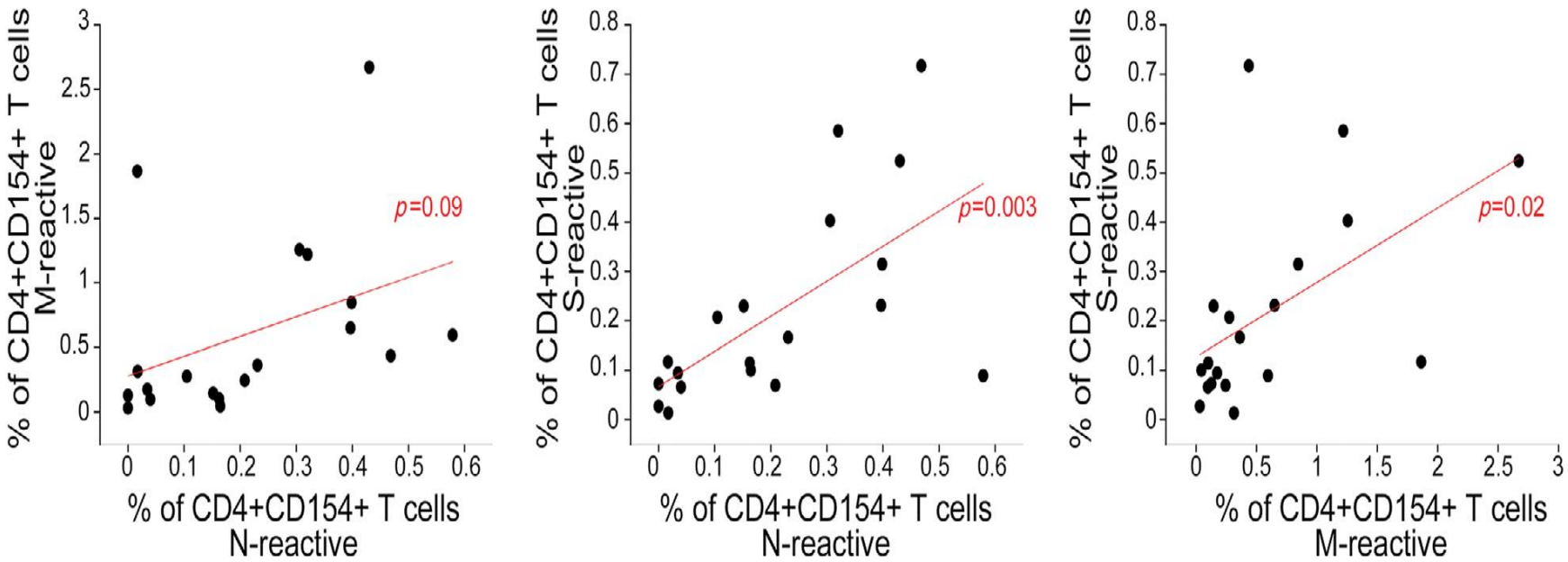
- SARS-CoV-2'ye özgül IgM, IgA ve IgG antikorlarının serum seviyeleri ile SARS-CoV-2'ye özgül $CD4^+$ T hücrelerinin oranları arasında son derece önemli bir korelasyon bulundu

Sonuçlar-6

- Tek peptit havuzu ile yapılan uyarımlarda M-proteini diğerlerine göre daha yüksek $CD4^+$ T lenfosit yanıtı oluşturdu



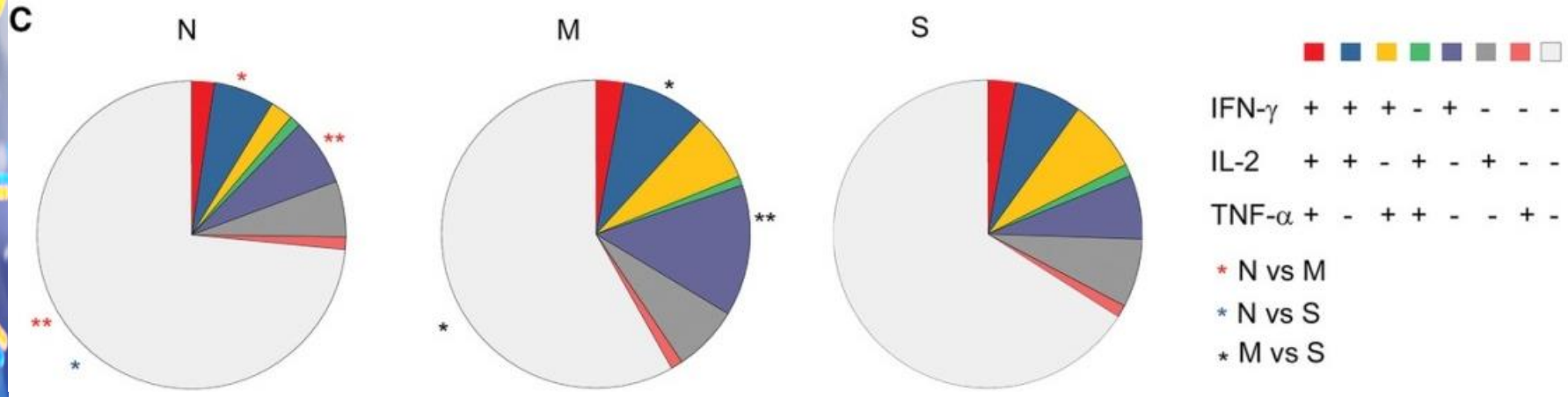
Sonuçlar-7



- M, N veya S protein peptit havuzları ile stimülasyon sonrasında $CD4^+$ T lenfositlerinin yoğunluğunda doğrudan korelasyon
- (SARS-CoV-2'nin farklı viral antijenlerine karşı yeterli hücresel yanıt göstergesi)

N, M veya S proteinleri ile , tek tek yapılan stimülasyonda $CD8^+$ T hücreleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında fark gözlenmemiştir

Sonuçlar-8



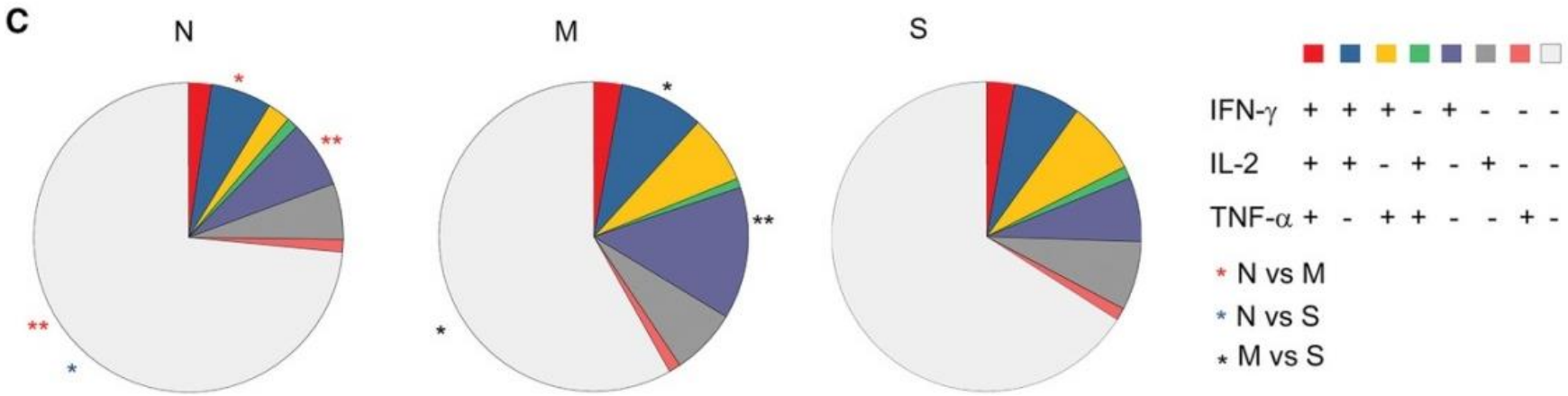
M protein peptit havuzuna özgü CD4⁺ T hücrelerinin

- IFNγ+ IL2+ TNFα-
- IFNγ+ IL2- TNFα-

alt grup oranları

N ve S protein peptit havuzuna kıyasla yüksek

Sonuçlar-9



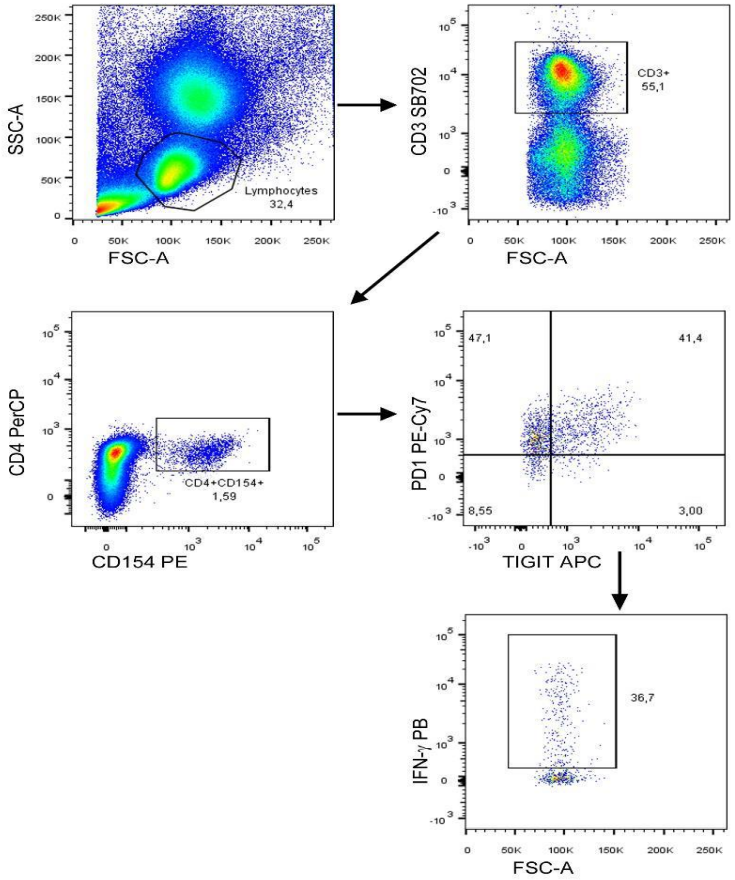
- N reaktif CD4⁺ T hücrelerinde, M ya da S reaktif CD4⁺ T hücrelerine kıyasla IFN-γ, IL-2 ve TNF-α üretemeyen hücrelerin oranı yüksek
- Üçlü negatif hücre alt kümesinin oranı, S reaktif CD4⁺ T hücrelerinde M reaktif olanlara göre daha yüksek

(M > S > N hiyerarşi)

Sonuçlar-10

- CD4 $^{+}$ T hücrelerinin in vivo stimülasyon seviyelerini değerlendirmek için, PD1 ve TIGIT ekspresyonunun yanı sıra CD154^{+} ile IFN-γ üretme kabiliyeti analiz edildi.

- Kontrol olarak hücreler SEB ile uyarıldı.



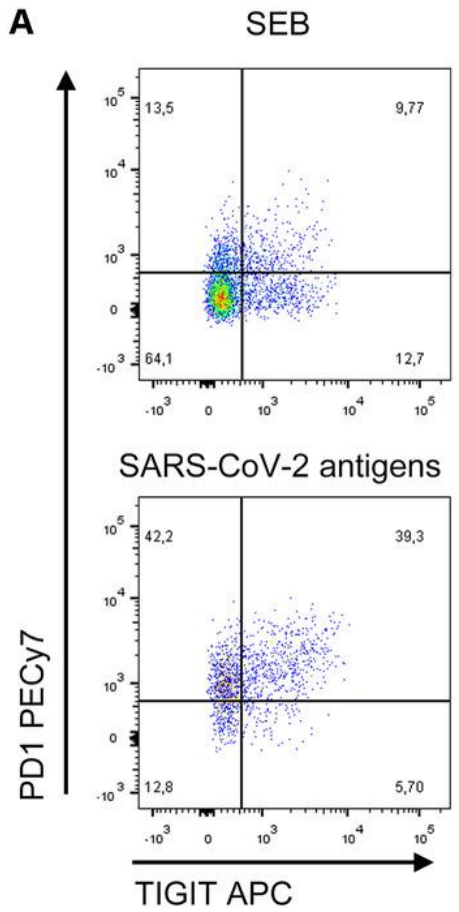
Sonuçlar-11

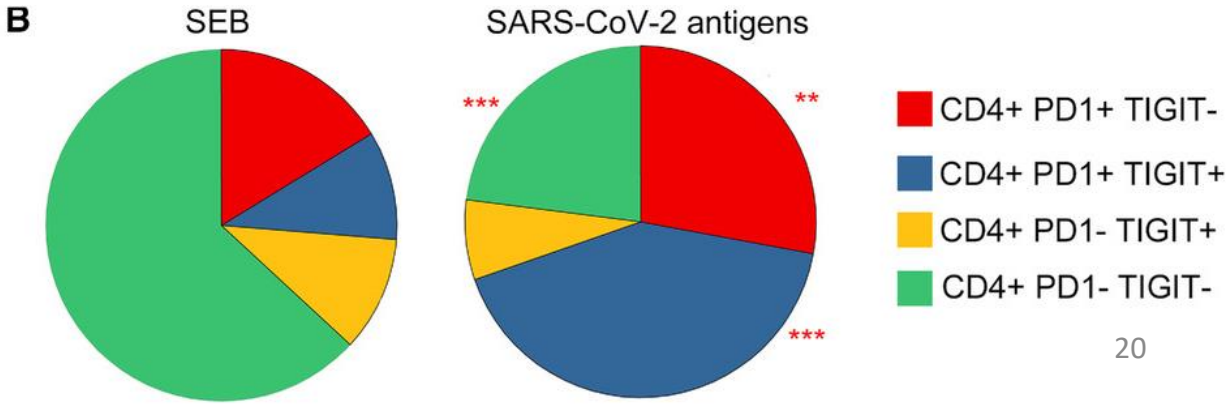
SARS-CoV-2'ye özgü $CD4^+$ $CD154^+$ T hücrelerinin:

- ✓PD1+ TIGIT- ■
- ✓PD1+ TIGIT+ ■

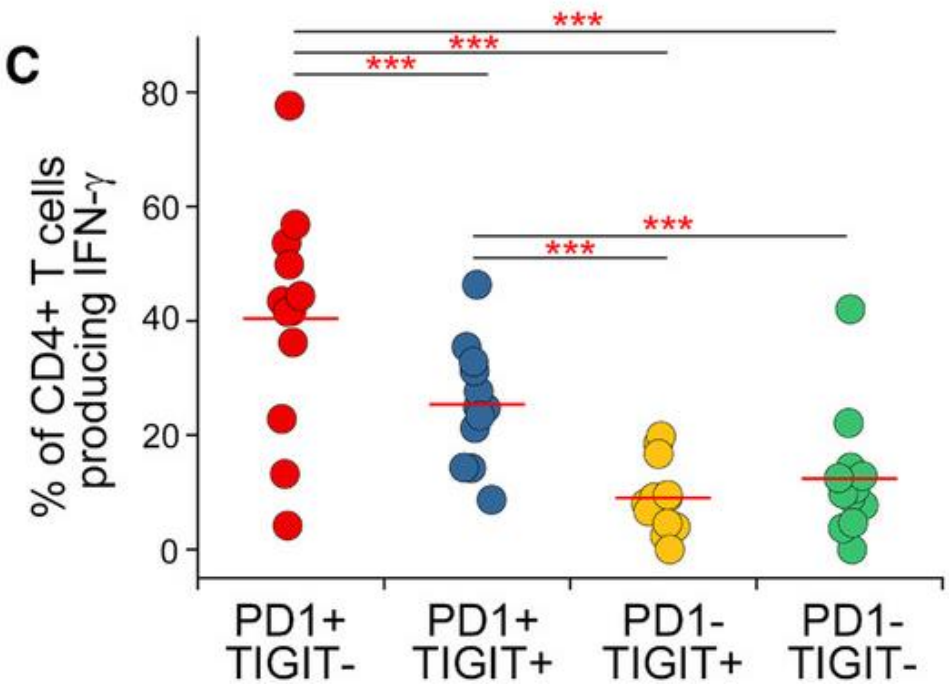
} hücre alt grupları önemli ölçüde artış

- ✓PD1- TIGIT- ■ hücrelerinde önemli bir azalma





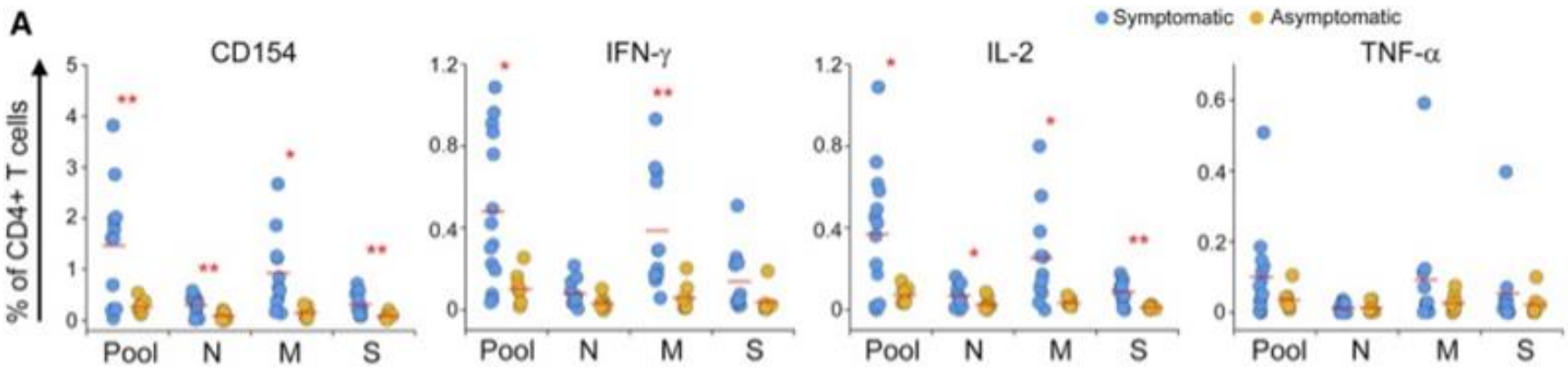
Sonuçlar-12



- SARS-CoV-2'ye özgü $CD4^+$ T hücrelerinde;

PD1+ TIGIT- ■ hücre alt grubunun diğer gruplara kıyasla en fazla oranda IFN-γ üretebildiği görüldü

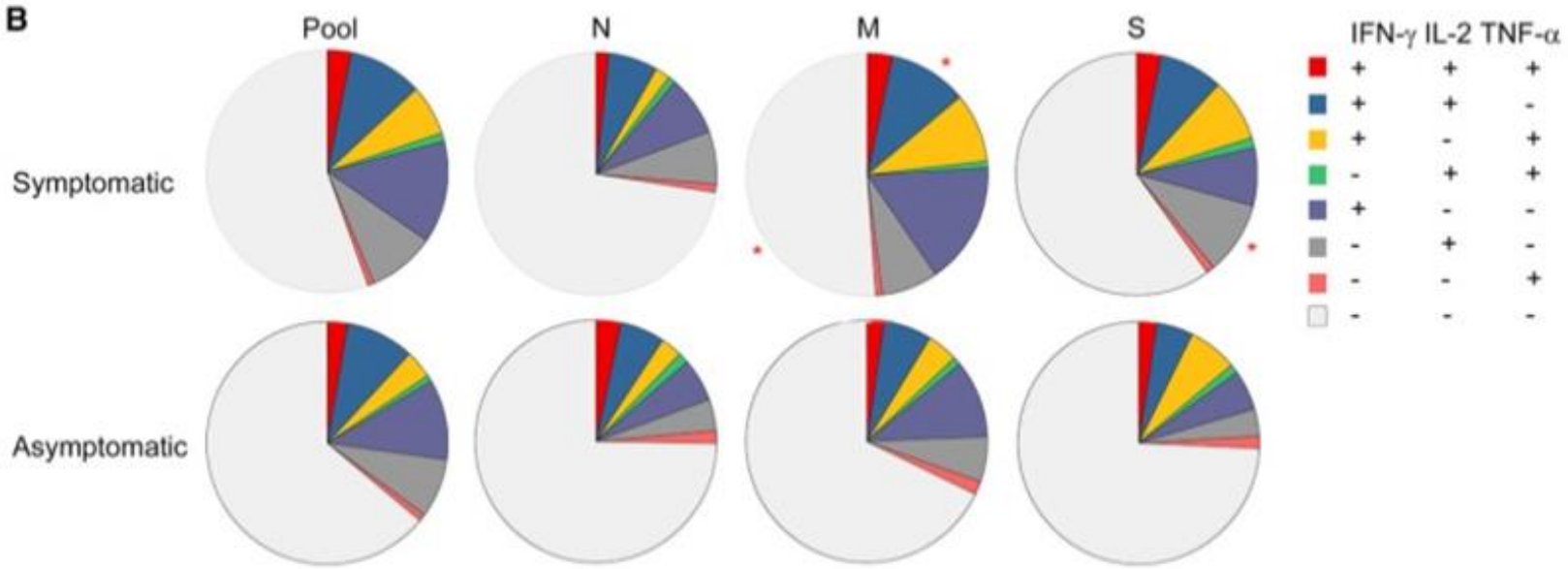
Sonuçlar-13



- Antijen uyarımı sonrasında yapılan incelemede semptomatik hastalarda, asemptomatik olanlara kıyasla SARS-CoV-2'ye özgü $CD154^+$, IFN-γ ve IL-2 , $CD4^+$ T hücrelerinde artış
- TNF-α ise yakın oranda

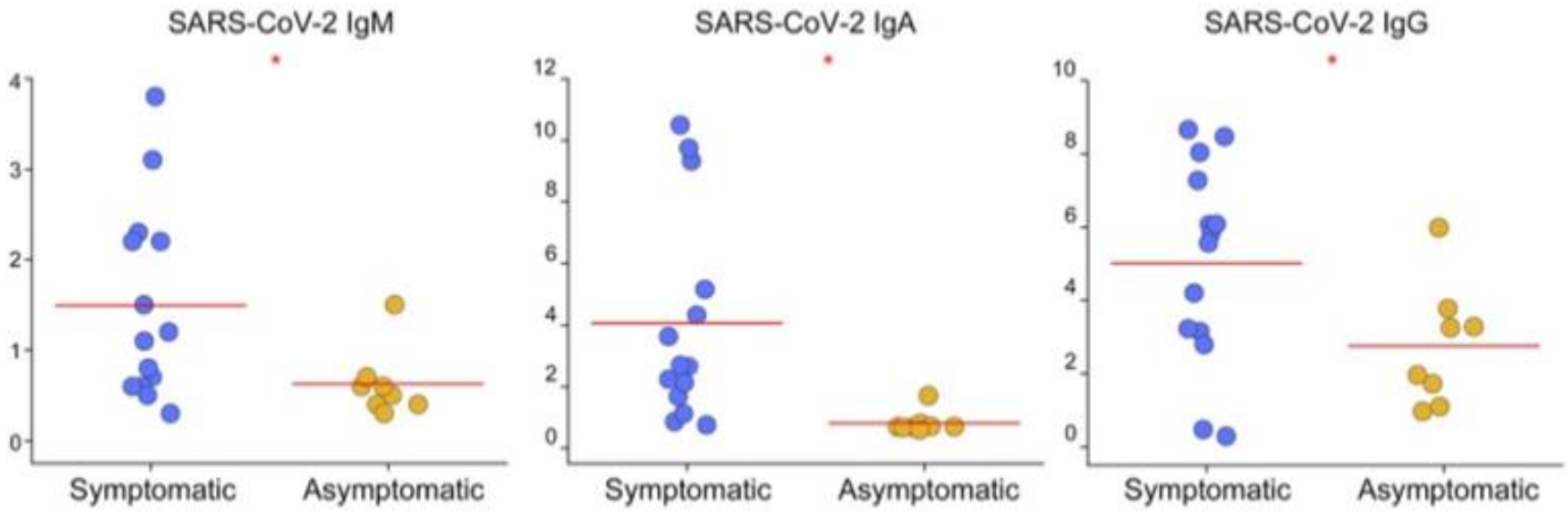
Daha yüksek IFN-γ üreten SARS-CoV-2 reaktif $CD8^+$ T hücre oranı (istatistiksel anlamlı değil)

Sonuçlar-14



- Asemptomatik hastalarda, M protein reaktif sitokin üretemeyen CD154 $^{+}$ hücrelerinin oranı artmış (çok işlevli T hücrelerinin düşük yoğunlukta olmasına işaret)

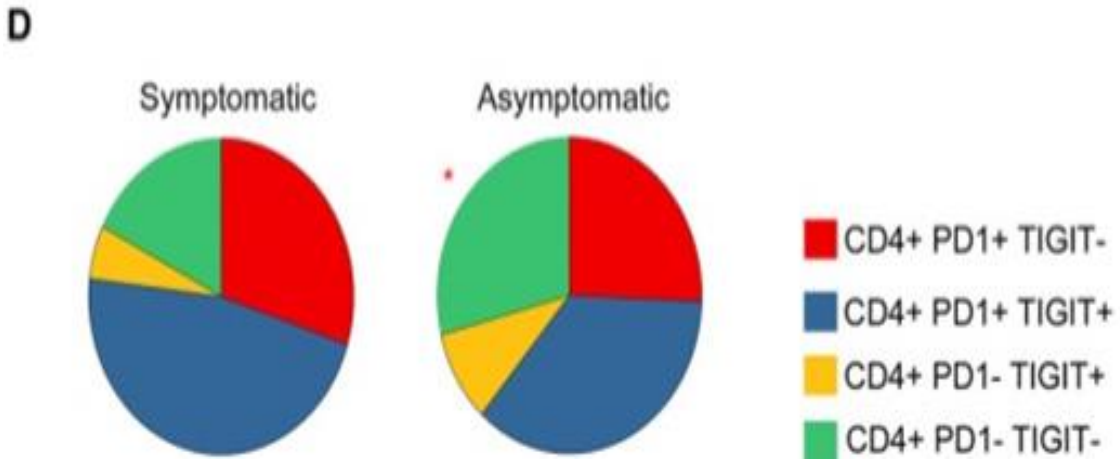
Sonuçlar-14



- Semptomatik hastalarda SARS-CoV-2'ye özgü IgA, IgG ve IgM antikorları daha yüksek
- Hem semptomatik hem de asemptomatik hastalarda, antikor titreleri kontrol grubundan daha yüksek

Sonuçlar-15

- Asemptomatik hastalarda PD1- TIGIT- ■ hücre oranı semptomatik hastalara göre artmış



Bu moleküllerin ekspresyonunun azalması; antijene özgü T hücre işlevselliğinde azalma ve in-vivo daha az oranda restimülasyonu düşündürür

Tartışma

- Humoral ve hücresel immün yanıt,
  - virüsün temizlenmesi
  - reenfeksiyondan korunmak
  - uzun süreli immünolojik bellek

Asıl amaç,

- Nötralize edici antikor salgılayan plazma hücrelerinin üretimini ve patojen reaktif uzun ömürlü hafıza $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin gelişimini uyarabilen bir aşı geliştirmektir

Tartışma

Çapraz reaksiyonun değerlendirilmesi

- Bu çalışmada sağlıklı grupta üç viral proteinden herhangi birinde SARS-CoV-2'ye özgü T hücre yanıtı gözlenmedi
- Peptit havuzunda yapısal olmayan proteinlerin yokluğu ve S peptit havuzunun tüm S proteinini kapsamaması???
- Diğer çalışmalarda sağlıklı/karşılaşmamış bireylerin verdiği yanıt, diğer CoV'lerin neden olduğu enfeksiyonlarla açıklanabilir
- Bu yanıt COVID-19'a karşı koruyucu mu?
- Ek veriler gerekli

Tartışma

T hücre yanıtı ile hastalık korelasyonu

- Şu anda yayınlanan verilerin çoğu yatan hasta verileri
- Çalışmada asemptomatik hastaların daha düşük oranda hücresel ve humoral immün yanıtı gösterdiği bulunmuştur
- SARS-CoV-2-reaktif T hücre yanıtı hastalık şiddeti ile korele saptanmıştır

Tartışma

- Asemptomatik bireylerde, semptomatik hastalardan daha düşük antijene özgü T-hücresi polifonksiyonelliği
- Bağışıklık kontrol noktası moleküllerinin daha düşük ekspresyonu (in vivo olarak azaltılmış restimülasyon)
- Semptomatik hastalarda SARS-CoV-2'ye karşı immün yanıt virüsü ortadan kaldırmada hızlı bir şekilde etkili olmaz ve immün sistem hücreleri tekrar tekrar aktive olur?
- Hiperaktif/tükenmiş/farklılaşmış $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerinin birikimi

Tartışma

- Yaşlı bireylerden oluşan semptomatik hasta grubuna bakıldığında SARS-CoV-2'ye karşı güçlü bir hücresel yanıt oluştuğu görüldü
- Kazanılmış immün yanıt yaştan bağımsız?

Bu çalışmada semptomatik hastalarda asemptomatik hastalara kıyasla virüse özgü antikor titrelerinin ve T-hücre yanıtının artmış olması, kazanılmış immün yanıtın bozulmadığını gösterir

Tartışma

Hedef antijen hangisi olabilir?

- COVID-19 hastalarında koruyucu ve kalıcı immün yanıt ortaya çıkaran virüs antijenini belirlemek ve bu antijene özgü hücresel, humoral kazanılmış immün yanıtı tanımlayabilmek çok önemli
- SARS-CoV-2'ye özgü T hücre yanıtının büyük oranda S proteinine yönelik-aşı çalışmaları

Tartışma

M proteini yeni aşı hedefi olabilir mi?

- Bu çalışmada M > S > N
- Aşı geliştirme için farklı stratejiler???
- M proteini CoV ile enfekte hücrelerin plazma membranında, bu da M'ye özgü antikorların opsonizasyon rolü???
- Karışık peptit havuzları ile eş zamanlı uyarım, tek tek uyarımlara kıyasla daha yüksek $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücre yanıtı ortaya çıkardı
- Farklı viral bileşenleri aynı anda hedef almak önemli

Makalenin mesajları

- SARS-CoV-2 reaktif $CD4^+$ T hücreleri ve virüse özgü antikorlar tüm hastalarda belirlendi
  (kontrol gubunda Ø)
- T hücre yanıtı esas olarak M proteinine yönelik
- Virüs reaktif hücreler PD1 ve TIGIT'i birlikte eksprese ediyor
- Hücresel ve humoral immün yanıt semptomatik hastalarda asemptomatik hastalara göre daha güçlü
- Kontrolsüz kazanılmış immün yanıt hayatı tehdit eden enflamatuar fazın gelişimine katkıda bulunabilir