Tespit edilebilen bir viral enfeksiyon yokluğunda SARS-CoV-2'ye maruziyet T hücresi hafızası oluşturabilir mi?

Sunan: Uz.Dr.Alper TOGAY

SBÜ İzmir Tepecik EAH Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Danışman: Prof.Dr.Melek DEMİR

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

nature COMMUNICATIONS

Received	Accepted	Published
19 August 2020	24 February 2021	19 March 2021

Multidisciplinary journals	2-year Impact Factor
Nature	42.778
Nature Communications	12.121

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-021-22036-z OPEN

Check for updates

Exposure to SARS-CoV-2 generates T-cell memory in the absence of a detectable viral infection

Zhongfang Wang[1,6], Xiaoyun Yang[1,6], Jiaying Zhong[1,6], Yumin Zhou[1,6], Zhiqiang Tang[2,6], Haibo Zhou[3], Jun He[4], Xinyue Mei[1], Yonghong Tang[4], Bijia Lin[1], Zhenjun Chen[5], James McCluskey[5], Ji Yang[1], Alexandra J. Corbett[5] & Pixin Ran[1]✉

[1] State Key Laboratory of Respiratory Disease & National Clinical Research Center for Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Medical University, Guangzhou, China. [2] The Second Peoples Hospital of Changde City, Hunan, China. [3] The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, China. [4] Affiliated Nanhua Hospital of University of South China,

Giriş

- SARS-CoV-2, 2020 Kasım küresel COVID-19
  vaka sayısı 50 milyon
  ölüm sayısı 1.2 milyonu
- 2021 Haziran
  vaka sayısı 171 milyon
  ölüm sayısı 3.5 milyonu

- SARS-CoV-2 → konak bağışıklığı

- Nükleik asit testi (NAT) ve antikor taramasında negatif yakın temaslıların T hücresi bağışıklığı kazanıp kazanmasıdır

Giriş

- COVID-19 şiddeti konak T hücresi bağışıklığı ile ters orantılıdır
- Yeterli nötralizan antikor varlığında, CD4+ ve CD8+ T hücreleri kritik COVID-19 hastalarının iyileşmesinde rol oynamaktadır

Giriş

- Orta ve şiddetli COVID-19 vakalarında lenfopeni önemli laboratuvar bulgusudur
- Otopsi: Akciğerlere yoğun şekilde infiltrasyon görülmektedir
- BAL sıvısında klonal genişleme ortaya koymaktadır

Giriş

- CD4+ T hücre, SARS-CoV-2'nin reseptör bağlanma alanı(RBD) hedefleyen IgG üretimi ile ilişkilidir

- İyileşmeyen hastalarda T hücrelerinin işlevselliği bozuk sitotoksisitesini kaybetmiştir

Giriş

- Akut viral enfeksiyonların çoğu koruyucu bağışıklığın gelişmesiyle sonuçlanır, mevcut veriler uzun vadeli ve sağlam koruyucu bellek belirsizliğini korumaktadır
- MERS-CoV enfeksiyonunu takiben hastalığın başlamasından bir yıl sonra, virüse özgül IgG antikoru, hafif semptomları olan hastaların bazıları için saptanamaz
- SARS-CoV-1 humoral yanıt kısa
  - Bellek B hücreleri birincil enfeksiyondan sonra hızla kaybolmaktadır
- Matematiksel modelleme, SARS-CoV-2 enfeksiyonu sonrası bağışıklık: muhtemelen <2 yıl

Giriş

- SARS-CoV-2 IgG düzeylerinde ~% 70 azalma görülmüştür
- Asemptomatiklerin %40 semptomatiklerin %13 IgG seronegatiftir
- SARS-CoV sağ kalanlarda kısa ömürlü humoral cevabın aksine, CD4+ ve CD8+ hafıza T hücrelerinin 6-11 yıl boyunca devam etmesi T hücrelerinin uzun süreli bağışıklık kazandırabileceğini düşündürmektedir

Giriş

- İyileşen COVID-19 hastalarının sırasıyla% 100 ve% 70'inde SARS-CoV-2'ye özgü CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin tespit edildiği bildirilmektedir
- SARS-CoV-2 T hücresi belleğinin ne kadar iyi kurulduğu ve bellek T hücrelerinin viral antijenlere yeniden maruz kalma üzerine nasıl tepki verdiği önemli sorulardır
- Nükleik asit testi (NAT) ve antikor taramasında negatif olduğu doğrulanan yakın temaslıların, SARS-CoV-2'ye maruz kaldıktan sonra herhangi bir hafıza T hücresi bağışıklığı kazanıp kazanmaması diğer önemli noktadır

Giriş

Bu çalışmada

- İyileşmiş COVID-19 hastalarından
- Yakın temaslılardan
- Maruz kalmamış sağlıklı bireylerden

oluşan geniş bir kohortun SARS-CoV-2 bellek T hücresi havuzlarının çoğalma ve aktivasyon kapasitesini incelenmiştir

Materyal ve metot

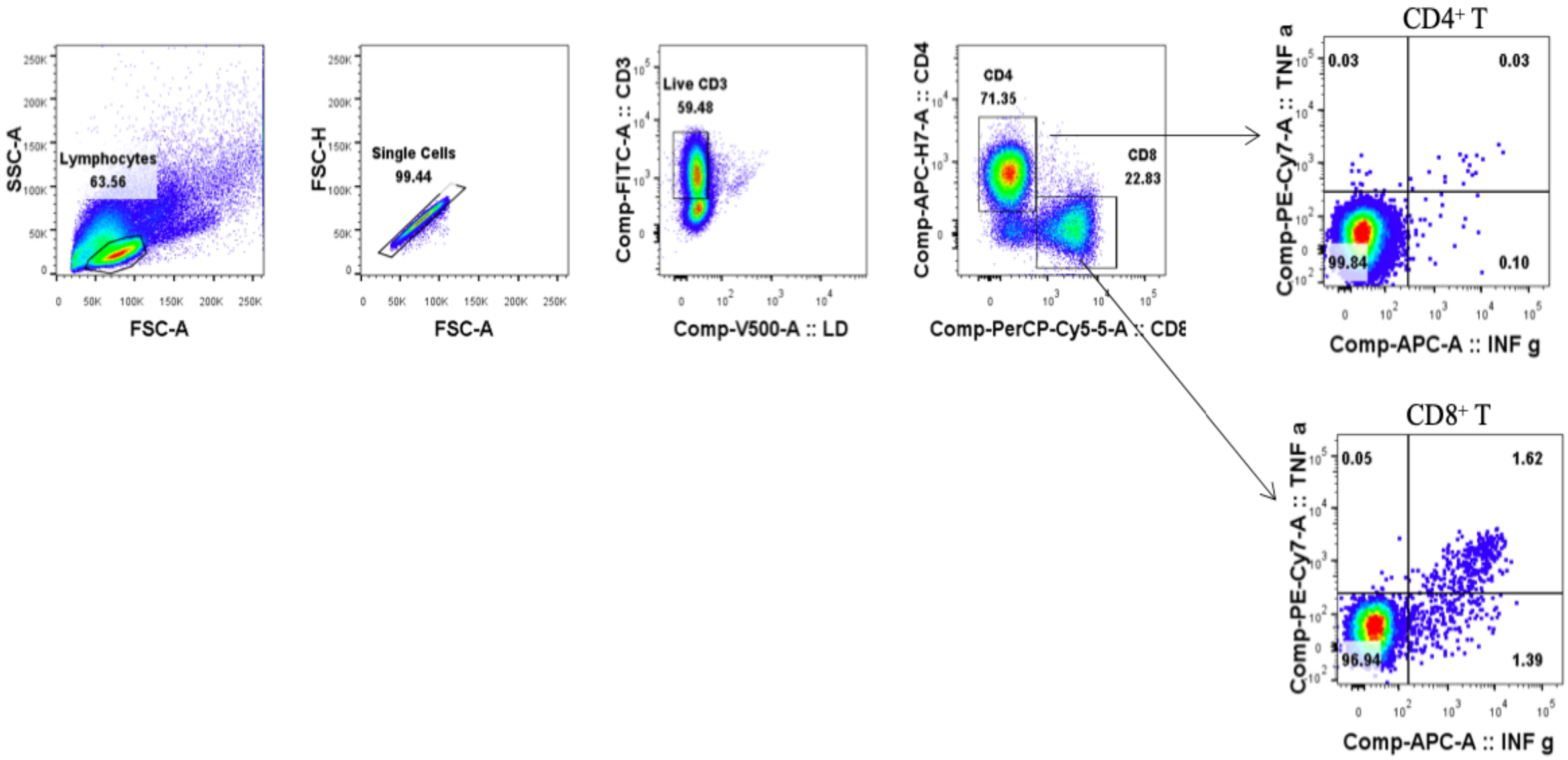
- 90 COVID-19 hastasından PBMC'ler 48-86 gün sonra
- Yakın temaslı 45 aile kümesinden 69 yakın temaslı

  1,5 m kapalı bir alanda >1 saat ya da >24 saat boyunca birlikte
- Önceki koronavirüslerine spesifik çapraz reaktif T hücre çoğalmasını araştırmak için, Eylül 2019'dan önce toplanan 63 sağlıklı donörün kan örneği sağlıklı kontrol olarak kullanıldı
- Dansite gradiyent yöntemi ile Ficoll-Paque

Materyal ve metot

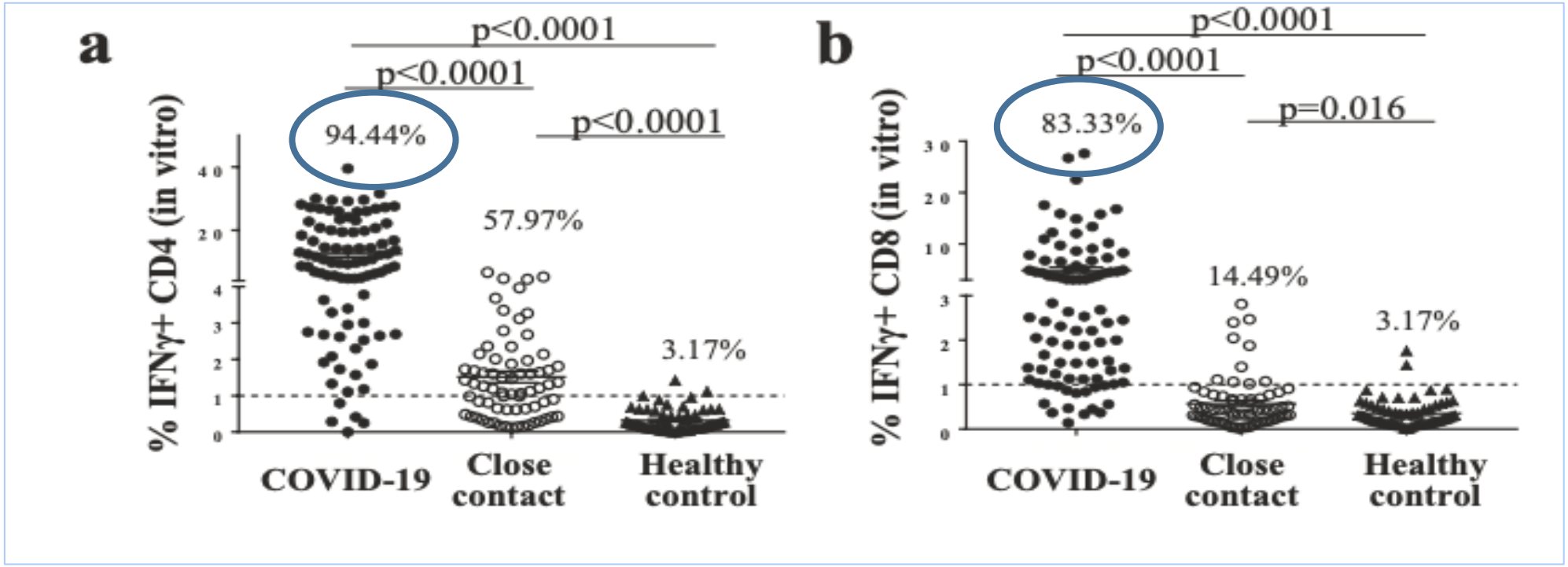
- SARS-CoV-2'nin
  - ✓ RNA'ya bağımlı RNA polimerazının (RdRp)
    ORF1ab bölgesini hedefleyen protein,
  - ✓ Spike glikoproteini (S),
  - ✓ Membran glikoproteini (M),
  - ✓ Nükleokapsid (N),
  - ✓ Zarf glikoproteini (E)

- Peptit havuzları ile
  10 gün boyunca in vitro olarak,
  Gece boyunca ex vivo uyarılmıştır

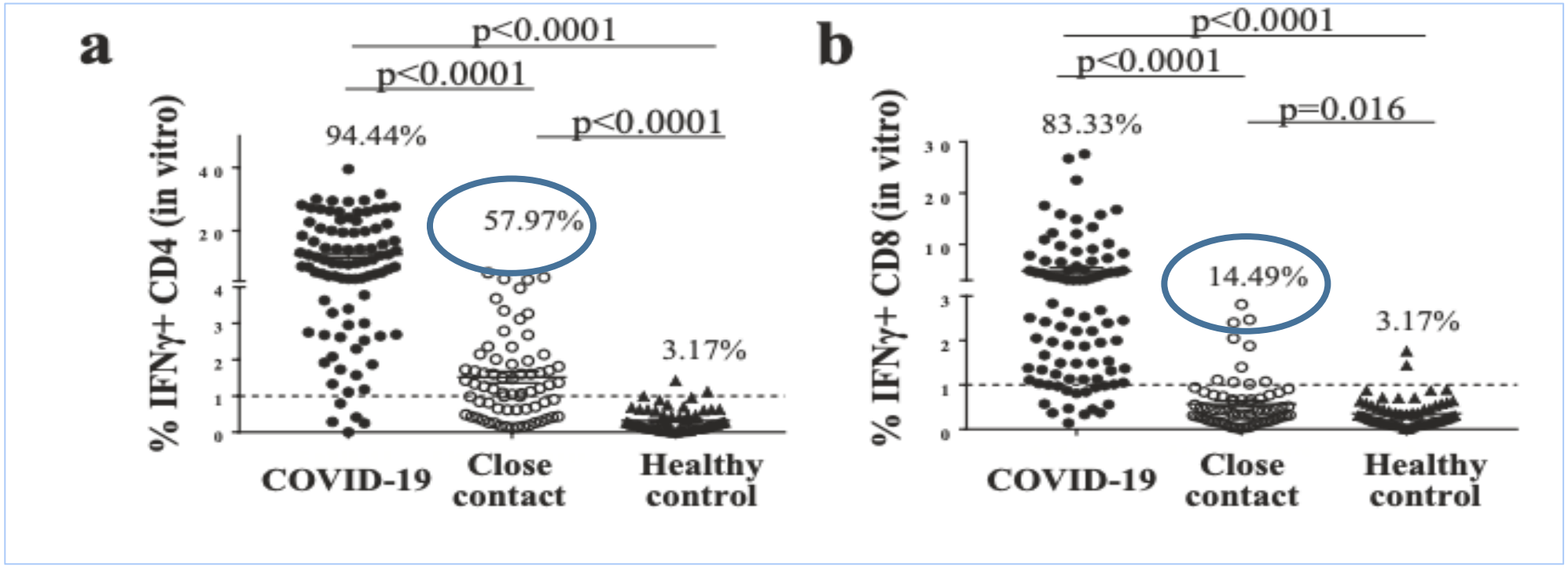


Supplementary Figure 4: Gating strategy for our flow cytometry experiments. PBMCs were stimulated for overnight or

Sonuçlar



- COVID-19 hastalarının ve yakın temaslıların SARS-CoV-2'ye özgü T hücresi bağışıklık belleği geliştirdiği gösterilmiş
- Asemptomatik ve semptomatik COVID-19 hastalarının örneklerinde karşılaştırılabilir düzeylerde SARS-CoV-2'ye özgü bellek T hücresi tespit edilmiş



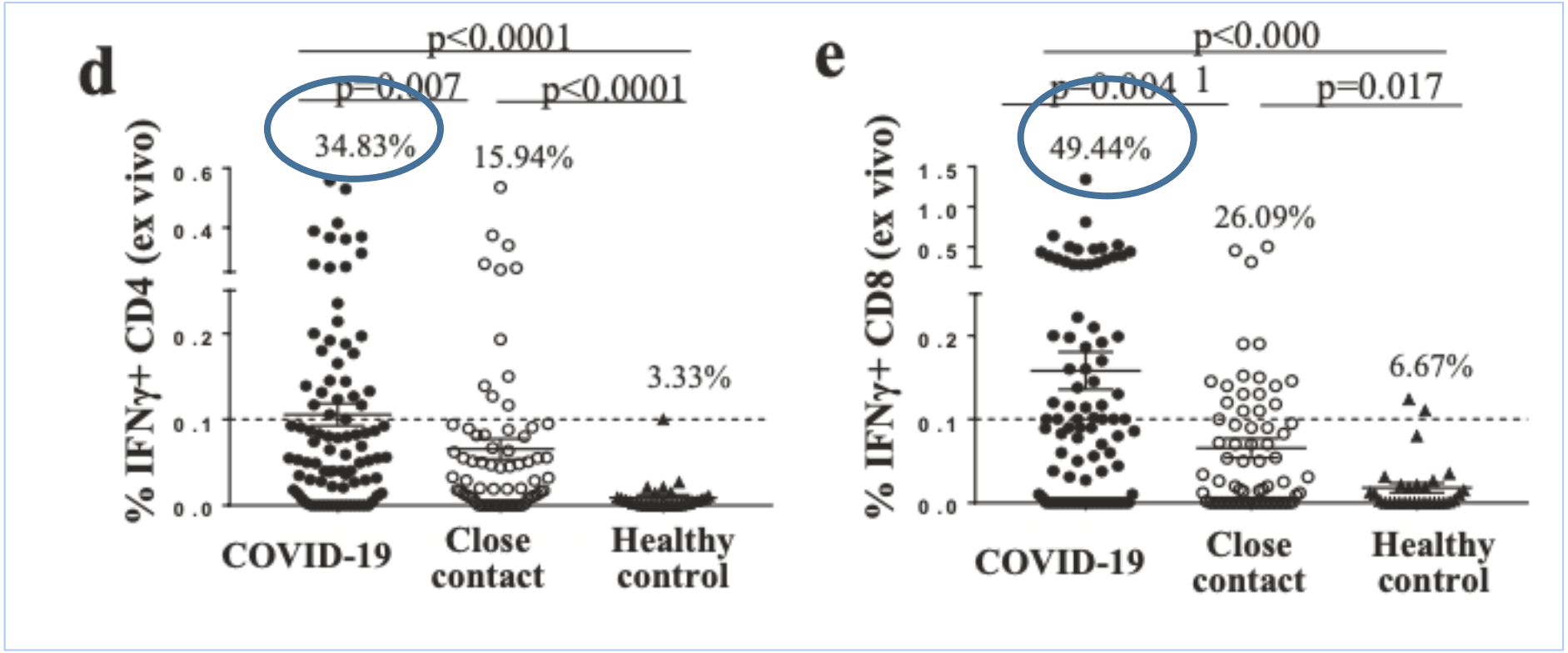
- 64'ü (% 71.11) CD4+ T hücresi 32'si (% 35.56) CD8+ T hücresi % 4'ten daha yüksek
- **Tüm yakın temaslılar:** % 4'ten daha düşük frekanslarda
- **Sağlıklı donörler:** Sadece % 3,17'sinde, saptanabilir düzeylerde virüse özgü CD4+ ve CD8+ T hücreleri içeriyordu

- **SARS-CoV-2'ye maruziyet, T bellek bağışıklığının oluşmasını sağlar:** Ama sadece COVID-19 hastalarında değil, aynı zamanda yakın temaslılarda da bu durum görüldü

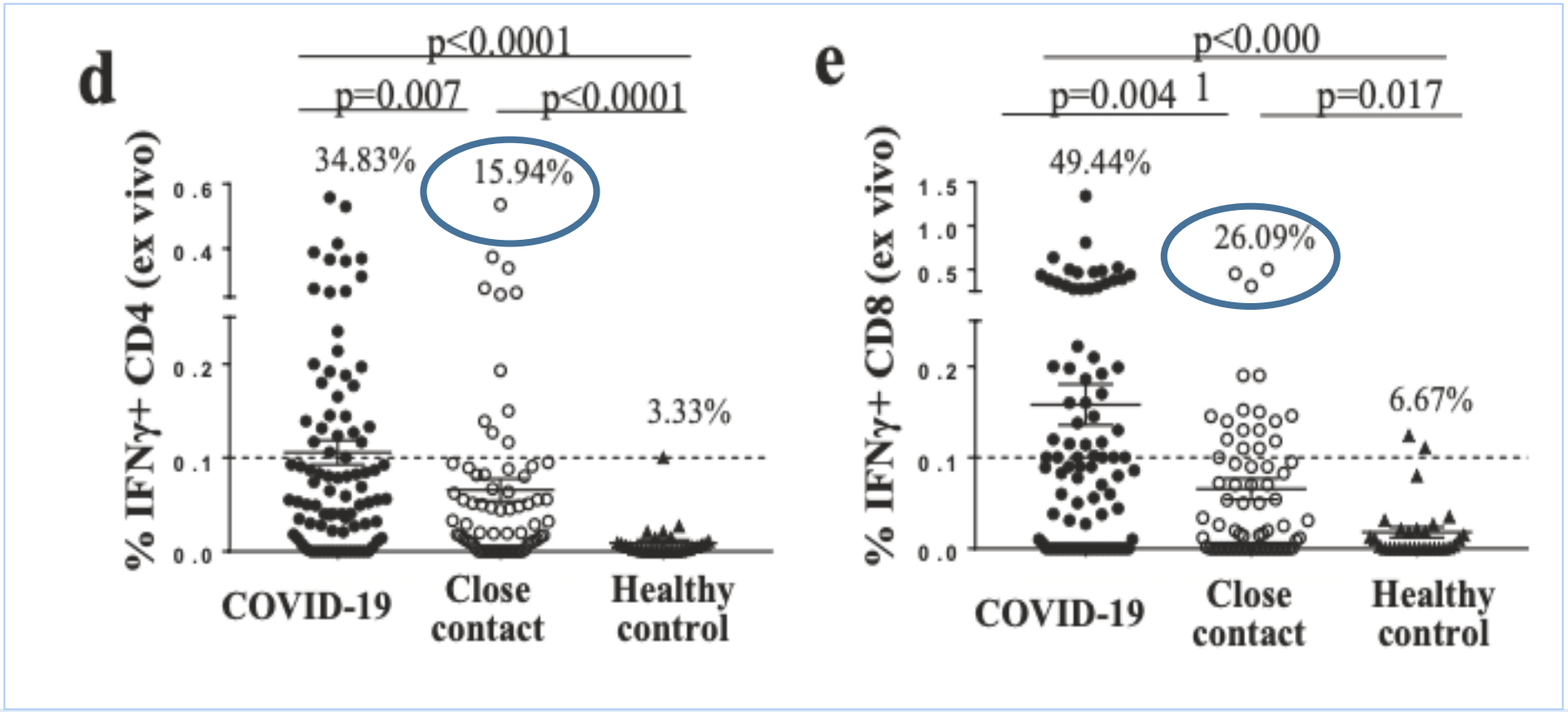
SARS-CoV-2'ye özgül bellek T hücrelerinin ex vivo analizleri

- 89 COVID-19 hastasından
- 69 yakın temaslıdan
- 30 sağlıklı donörden

Alınan CD4+ ve CD8+ T hücreleri için virüse spesifik bellek havuzlarının boyutlarını bir gece peptit uyarma deneyi ile «ex vivo» analiz etmişlerdir



Sonuçlar, COVID-19 hastalarının önemli bir kısmında, hastalık başlangıcından **48-86 gün sonra** virüse özgül T hücrelerinin bulunduğunu gösterdi.

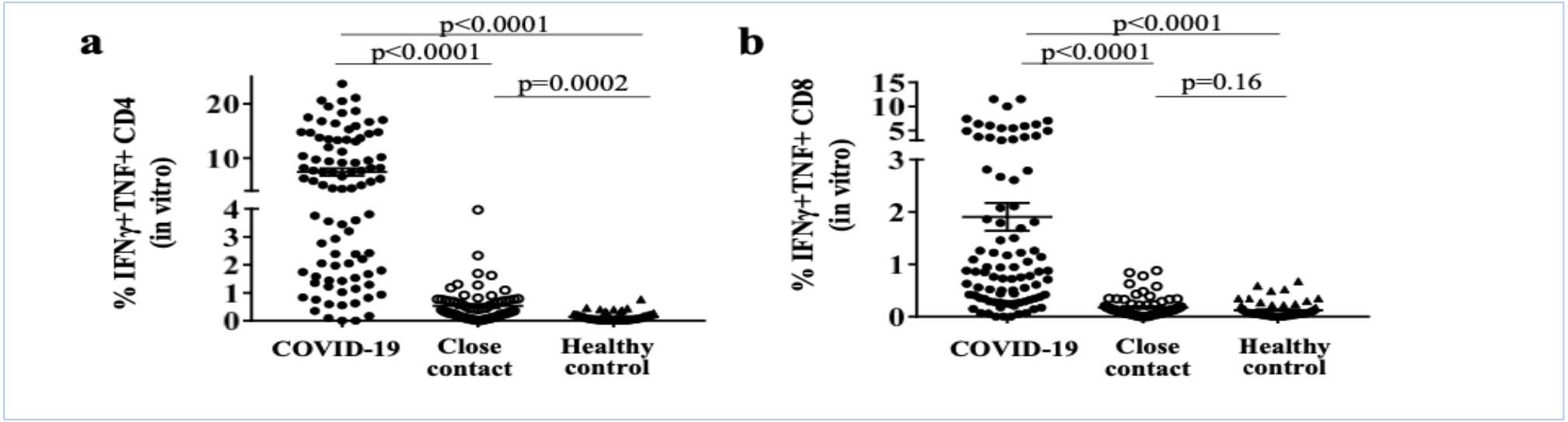


COVID-19 hastalarının ve yakın temaslıların

T hücre hafıza havuzlarının boyutları arasında **iki kat** gibi

önemli bir fark görüldü

IFNɣ ve TNF birlikte pozitifliği

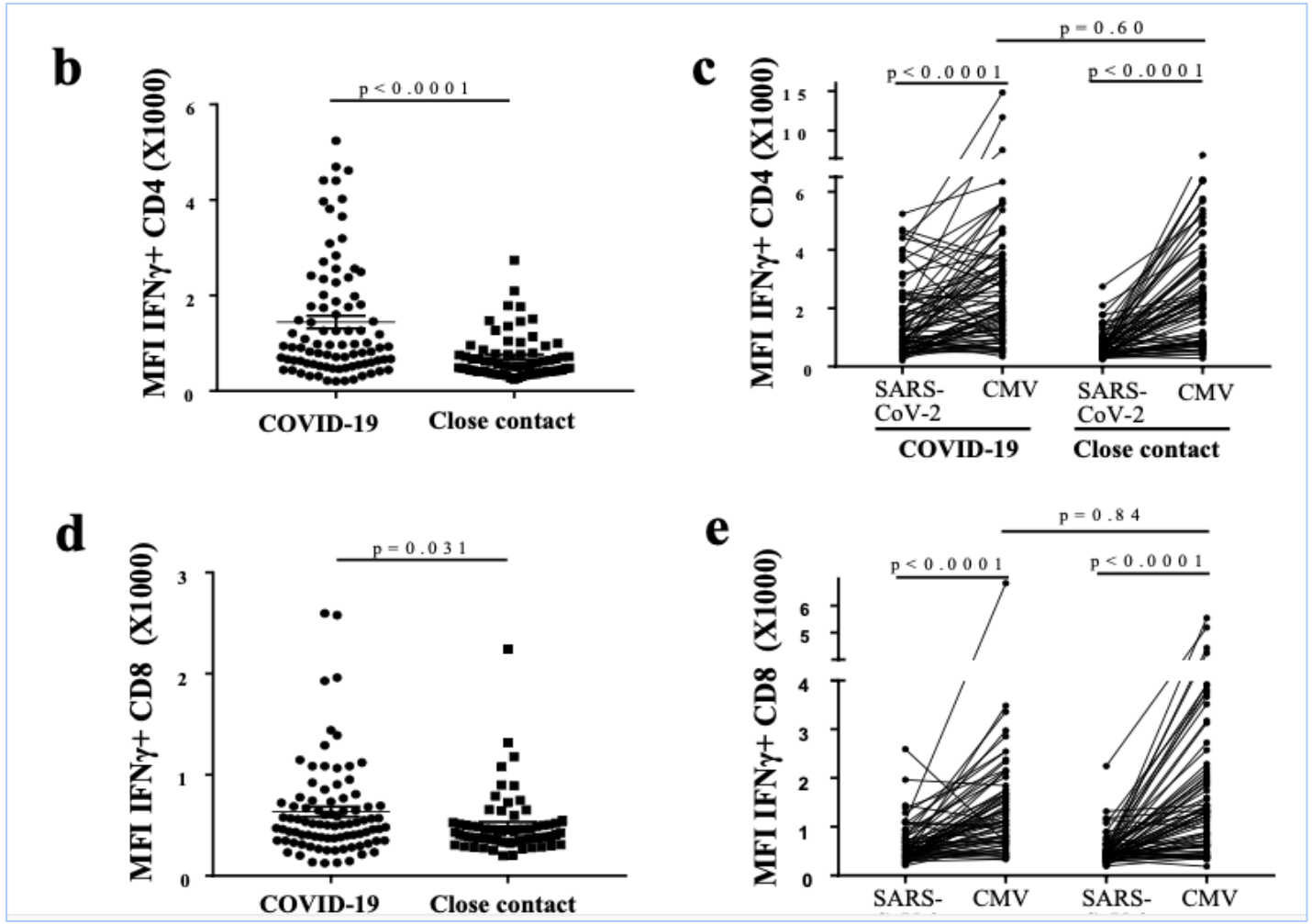


Başlangıçta, SARS-CoV-2'ye özgü bellek CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin düşük seviyelerde IFNy salgıladığı ve COVID-19 hastalarından alınan T hücrelerinin yalnızca küçük bir kısmının işlevsellik (IFNy ve TNF ikili ifadesi) kazandığı saptanmıştır

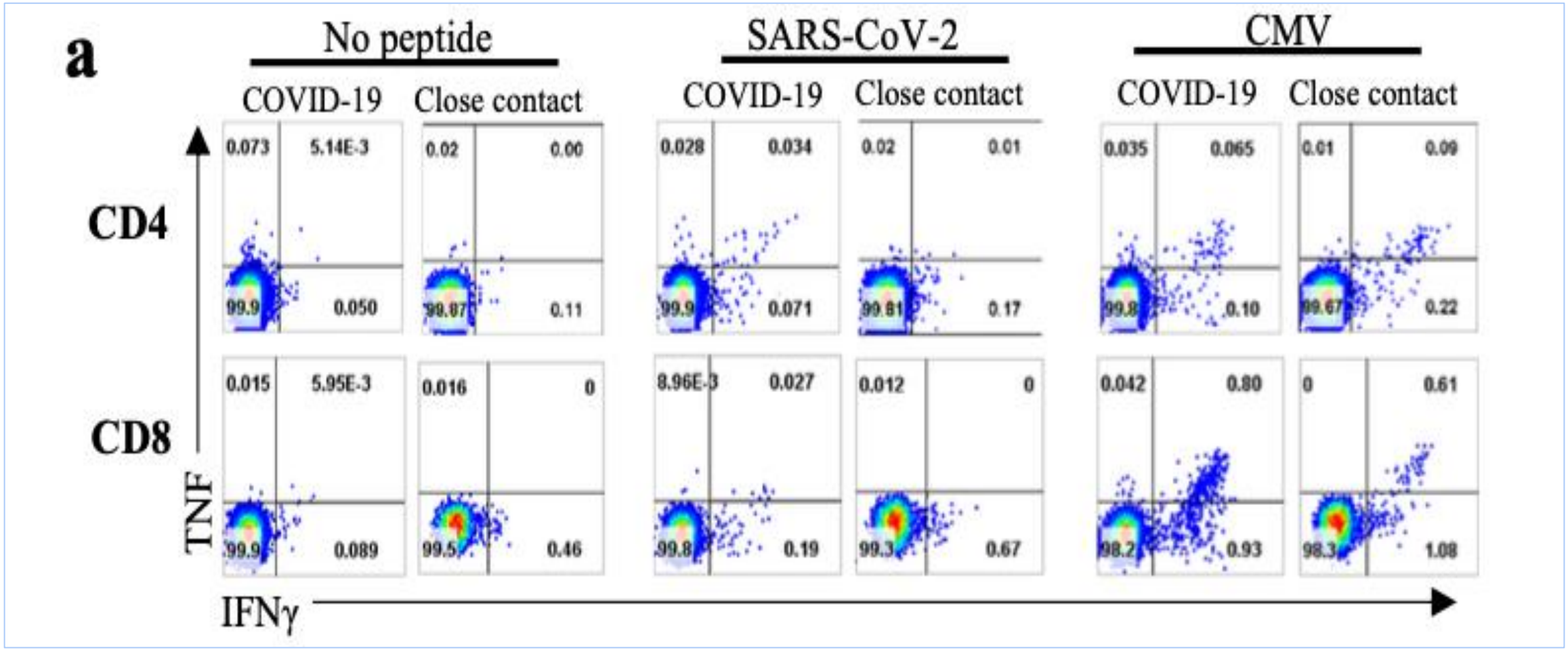
IFNɣ üreten SARS-CoV-2’ye spesifik bellek T hücrelerinin kalitesi

- SARS-CoV-2'ye özgü bellek T hücrelerinin kalitesini değerlendirmek için, COVID-19 hastalarından ve yakın temaslılardan alınan **bellek T hücrelerinde hücre içi boyama** yoluyla IFNy'nin MFI'sı ölçülmüştür

- Bu deneyin sağlamlığını artırmak için, **pp65 proteinini kapsayan CMV peptit havuzları** ile stimülasyonun ardından tüm numunelerin IFNy üretimi için de değerlendirildiği bir dahili kontrol eklenmiştir



IFNy ve TNF ekspresyon seviyeleri ve CMV'ye özgü CD4+ ve CD8+ bellek T hücrelerinin sayıları, karşılık gelen SARS-CoV-2'ye özgü bellek T hücrelerinden önemli ölçüde daha yüksektir



CMV peptitleri, COVID-19 hastalarından ve yakın temaslılardan alınan örneklerde CD4+ ve CD8+ T hücreleri tarafından benzer seviyelerde IFNy üretimini indüklemiştir

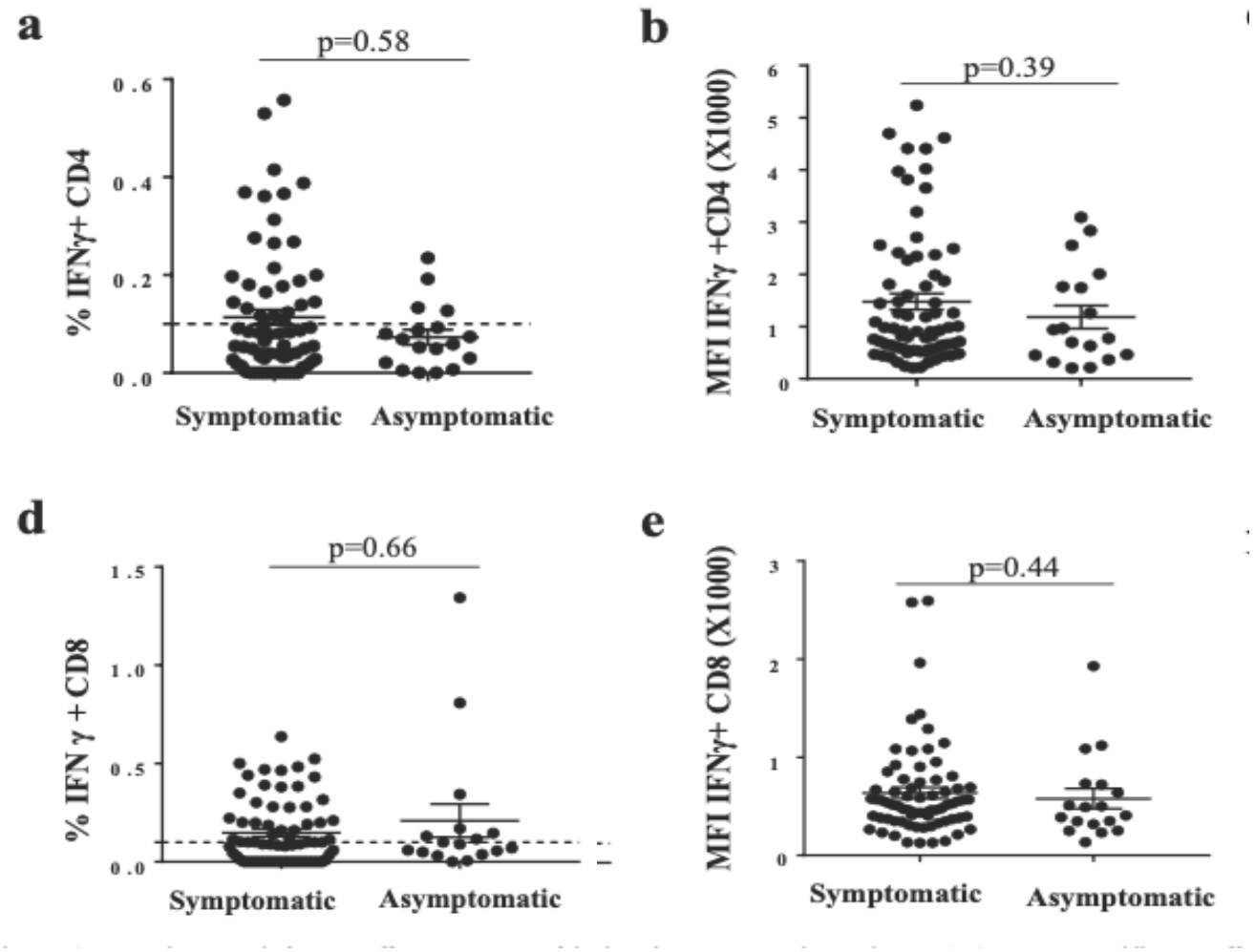
Sonuçlar

- Son epidemiyolojik veriler, SARS-CoV-2 enfeksiyonlarının %18-62'sinin asemptomatik olduğunu göstermektedir

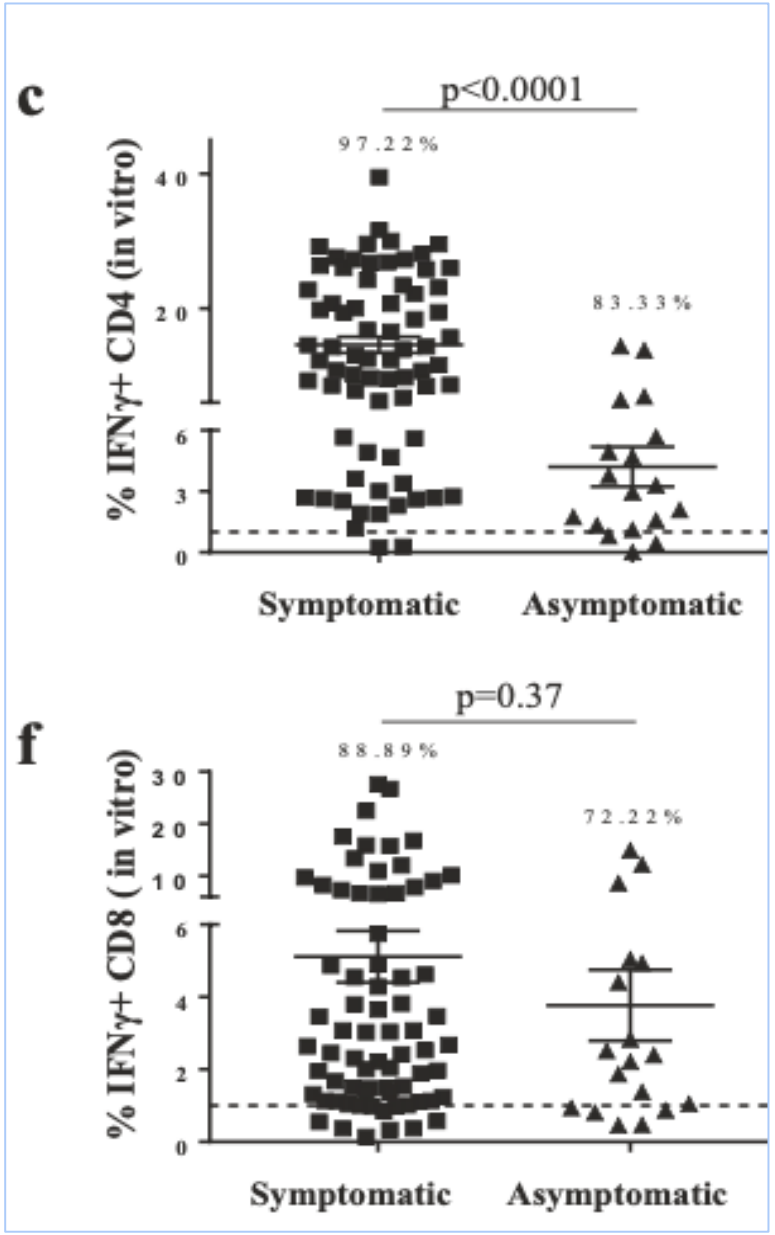
- Bu nedenle, asemptomatik COVID-19 hastalarında koruyucu bağışıklığın ne kadar iyi kurulduğunun belirlenmesi, sürü bağışıklığının anlaşılması ve virüsün ikincil enfeksiyonlarıyla mücadele stratejilerinin tasarımı için değerli bilgiler sağlayacaktır

Sonuçlar

Hem semptomatik hem de asemptomatik hastalarda bellek T hücresi bağışıklığı



- 72 semptomatik ve 18 asemptomatik COVID-19 hastasından alınan PBMC'ler
- Bellek T hücre havuzlarının boyutları, nitelikleri ve proliferasyon kapasiteleri

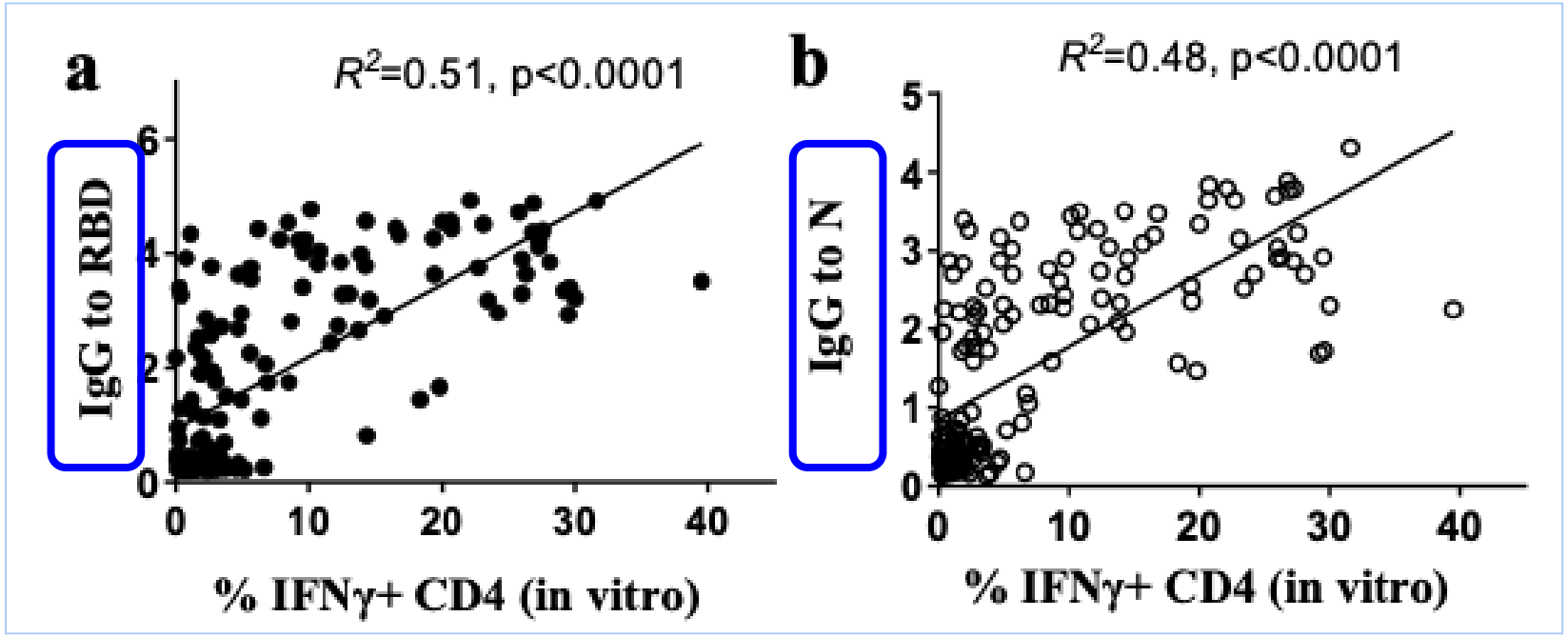


Asemptomatik hastaların SARS-CoV-2'ye özgül T hücre bağışıklığında hafifçe azalmış bir çoğalma kapasitesini göstermektedir (p <0.0001)

In vitro peptit uyarımı ve genişlemesi, CD8+ T hücrelerinin saptanabilir seviyelere kadar çoğaldığını göstermektedir

Sonuçlar

- Bu amaçla, asemptomatik ve semptomatik COVID-19 hastaları arasındaki T-hafıza bağışıklık seviyelerini karşılaştırılmış ve hafıza havuzlarının boyutlarının ve kalitesinin karşılaştırılabilir olduğunu gösterilmiştir



Bellek CD4+ T hücresi tepkileri,
SARS-CoV-2'nin N proteinine ve RBD'sine karşı
IgG titreleri ile ilişkilidir

Sonuçlar

- CD4+ bellek T hücrelerinin in vitro genişlemesinin büyüklüğünün, anti-RBD ve anti-N'nin IgG titreleriyle korele olduğunu gösterdiğinden, asemptomatik bireylerin antikor üretiminin semptomatik bireylerden daha düşüktür
- Bu gözlem, asemptomatik hastalarda anti-SARS-CoV-2 antikorlarında hızlı bir azalma olduğu bulgularıyla uyumludur

Tartışma

- COVID-19 hastaları, çok çeşitli klinik fenotipler sergiler
- CD8+ T belleğinin oluşumu, virüsle enfekte olmuş konakçı hücrelerde üretilen viral antijenleri işleyen endojen yolla sağlanır
- Muhtemelen, yakın temaslıların konakçı hücreleri içinde, bireylerin çoğunda CD8+ T belleği ile sonuçlanan sağlam bir CD8+ tepkisini indüklemek için yetersiz viral antijenler vardır

Tartışma

- Buna karşılık, CD4+ T belleğinin oluşumu çoğunlukla replikatif olmayan viral partiküllerden veya çözünür viral proteinlerden türetilen ekzojen viral antijenlerin endositozu ve/veya fagositozunu içerir

- Bu nedenle, CD4+ T hücre hafızasına, enfeksiyonu olmayan kişilerde daha kolay ulaşılabilir

Tartışma

- Sağlıklı donörlerde tespit edilen SARS-CoV-2-reaktif T hücreleri farklılıklar göstermektedir
- Farklı metodolojilerin kullanılması nedeniyle olma ihtimali yüksektir
- Bu nedenle, daha kapsamlı bir araştırmalara ihtiyaç vardır

Tartışma

- Özetle, önemli sayıda klinik örnek incelenerek klinik semptomları olan COVID-19 hastalarında SARS-CoV-2'ye özgü bellek T hücre bağışıklığını belirlenmiştir
- Bazı ince farklılıklara rağmen, hastaların çoğunda ölçülebilir miktarlarda SARS-CoV-2'ye özgül CD4+ ve CD8+ bellek T hücrelerinin geliştiği ve bunların nekahat döneminden 48-86 gün sonra stabil olarak korunduğunu gösterilmiştir

- Daha da önemlisi, yakın temaslılarda önemli düzeyde SARS-CoV-2'ye özgül bellek T hücresi bağışıklığının varlığına ilişkin bulgular elde edilmiştir
- Çapraz reaktif bellek T hücreleri, SARS-CoV-2'ye hiç maruz kalmamış sağlıklı donörlerde mevcut olmasına rağmen, çoğalmaları zor olduğundan, konakçı korumadaki rollerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması gerekmektedir

Teşekkürler