

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: BMOBIBO



**Kateřina Krausová**

Imunitní reakce vyvolané infekcí SARS-CoV-2  
Immune reactions induced by SARS-CoV-2 infection

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Michal Šmahel, Ph.D.

Praha, 2021

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Michalovi Šmahelovi, Ph.D., za cenné komentáře, trpělivost a ochotu při zpracování této bakalářské práce.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 06. 05. 2021

Podpis: .....

Kateřina Krausová

## **Abstrakt**

Pandemie koronavirové nemoci 2019 (covid-19) vyvolaná nově objeveným koronavirem těžkého akutního respiračního syndromu 2 (SARS-CoV-2) způsobuje závažné zdravotní i ekonomické problémy po celém světě. Závažnost průběhu onemocnění covid-19 závisí především na imunitní odpovědi organismu na SARS-CoV-2. Tento virus využívá mnoho mechanismů, kterými dokáže uniknout hostitelskému imunitnímu systému. Mezi hlavní únikové mechanismy patří potlačení produkce interferonů v časně fázi infekce, vyčerpání přirozeně cytotoxických buněk a indukce cytokinové bouře. Po vrozené imunitní odpovědi se do boje s virem zapojí i mechanismy specifické imunity. Pacienti s vážným průběhem onemocnění mají značně redukované množství jak pomocných  $CD4^+$  T lymfocytů, tak cytotoxických  $CD8^+$  T lymfocytů. Oproti tomu hladina protilátek je u těchto pacientů zvýšená. Ačkoli se za rok od objevení viru SARS-CoV-2 podařilo nalézt mnoho poznatků o imunitních reakcích vyvolaných tímto virem, je zde stále mnoho neznámých. V krátké době byly vyvinuty vakcíny, které jsou úspěšné v prevenci covidu-19. Důležitou otázkou dalšího výzkumu však zůstává, jak dlouhodobá je imunitní paměť po vakcinaci či po prodělání covidu-19.

## **Klíčová slova**

SARS-CoV-2, covid-19, cytokinová bouře, T buňky, protilátky, ELISA, ELISPOT

## **Abstract**

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic caused by newly discovered Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causes severe health and economic problems all over the world. The disease severity depends mainly on the host's immune response to SARS-CoV-2. This virus uses many mechanisms for escape from the host's immune system. The major evasion mechanisms include suppression of interferon production at the early phase of infection, exhaustion of natural killer cells and induction of a cytokine storm. After the innate immune response, mechanisms of adaptive immunity join the defense against the virus. Patients with severe cases have a significant reduction in the amount of both helper CD4<sup>+</sup> T cells and cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. On the contrary, these patients have an increased level of antibodies. Even though there have been many findings about immune reactions to SARS-CoV-2 in the year after its discovery, there are still many unknowns. Vaccines, which are successful at preventing COVID-19, have been developed in a short time. However, an important remaining question for further research is the longevity of immune memory after vaccination or after suffering from COVID-19.

## **Key words**

SARS-CoV-2, COVID-19, cytokine storm, T cells, antibodies, ELISA, ELISPOT

## Seznam zkratek

<b>% LYM</b>	<i>% of lymphocytes in peripheral blood</i>	% lymfocytů v periferní krvi
<b>ACE2</b>	<i>angiotensin-converting enzyme 2</i>	enzym konvertující angiotenzin 2
<b>AIM</b>	<i>activation-induced marker</i>	markery indukované aktivací
<b>ARDS</b>	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>	syndrom akutní dechové tísně
<b>ASC</b>	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain</i>	protein asociovaný s apoptózou obsahující C-koncovou kaspázovou rekrutační doménu
<b>CCL</b>	<i>C-C motif ligand</i>	ligand s motivem C-C
<b>CCR</b>	<i>C-C motif receptor</i>	receptor s motivem C-C
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>	diferenciační antigen
<b>covid-19</b>	<i>Coronavirus disease 2019</i>	koronavirová nemoc 2019
<b>CXCL</b>	<i>C-X-C motif ligand</i>	ligand s motivem C-X-C
<b>CXCR</b>	<i>C-X-C motif receptor</i>	receptor s doménou C-X-C
<b>E</b>	<i>envelope protein</i>	obalový protein
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	enzymová imunosorbentní analýza
<b>ELISPOT</b>	<i>enzyme-linked immunospot</i>	enzymová imunoanalýza jednotlivých buněk
<b>ERGIC</b>	<i>endoplasmatic reticulum-Golgi intermediate compartment</i>	přechodný kompartment mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem
<b>GCSF</b>	<i>granulocyte colony stimulation factor</i>	faktor stimulující kolonie granulocytů
<b>HCoV</b>	<i>human coronavirus</i>	lidský koronavirus
<b>HLA</b>	<i>human leukocyte antigen</i>	lidský leukocytární antigen
<b>HR</b>	<i>heptad repeat</i>	heptadová repetice
<b>ICS</b>	<i>intracellular cytokine staining</i>	vnitrobuněčné barvení cytokinů
<b>IFN</b>	<i>interferon</i>	interferon
<b>Ig</b>	<i>immunoglobulin</i>	imunoglobulin
<b>IL</b>	<i>interleukin</i>	interleukin
<b>IRF</b>	<i>interferon regulatory factor</i>	interferonový regulační faktor
<b>ISG</b>	<i>interferon stimulated gene</i>	geny stimulované interferonem
<b>ISGF3</b>	<i>interferon stimulated gene factor 3</i>	genový faktor 3 stimulovaný interferonem
<b>JAK1</b>	<i>Janus kinase 1</i>	Janusova kináza 1
<b>JIP</b>		jednotka intenzivní péče
<b>LAMP1</b>	<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>	membránový protein 1 asociovaný s lysozomem
<b>M</b>	<i>membrane protein</i>	membránový protein
<b>MDA-5</b>	<i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>	diferenciační protein asociovaný s melanomem 5
<b>MERS</b>	<i>Middle East respiratory syndrome</i>	blízkovýchodní respirační syndrom
<b>MHC I</b>	<i>major histocompatibility complex I</i>	hlavní histokompatibilní komplex I
<b>MIS-C</b>	<i>Multisystem inflammatory syndrome in children</i>	dětský zánětlivý multisystémový syndrom
<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>	informační RNA
<b>N</b>	<i>nucleocapsid protein</i>	nukleokapsidový protein

<b>NK</b>	<i>natural killer cell</i>	přirozeně cytotoxické buňky
<b>NLR</b>	<i>NOD-like receptor</i>	<i>NOD-like</i> receptor
<b>NLRP3</b>	<i>NLR family pyrin domain-containing 3</i>	NLR obsahující pyrinovou doménu 3
<b>NOD</b>	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>	oligomerizační doména vázající nukleotid
<b>nsp</b>	<i>nonstructural protein</i>	nestrukturní protein
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i>	otevřený čtecí rámec
<b>OX40</b>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 4</i>	receptor 4 z nadčeledi TNF
<b>PAMP</b>	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>	molekulární vzory asociované s patogeny
<b>PBMC</b>	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>	mononukleární buňky získané z periferní krve
<b>PD-1</b>	<i>programmed cell death protein 1</i>	protein programované buněčné smrti 1
<b>PRR</b>	<i>pattern recognition receptor</i>	receptor rozpoznávající molekulární vzory
<b>RBD</b>	<i>receptor-binding domain</i>	doména vázající receptor
<b>RLR</b>	<i>RIG-I-like receptor</i>	<i>RIG-I-like</i> receptor
<b>rNP</b>	<i>recombinant N protein</i>	rekombinantní N protein
<b>S</b>	<i>spike protein</i>	<i>spike</i> protein
<b>SARS</b>	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>	těžký akutní respirační syndrom
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>	koronavirus těžkého akutního respiračního syndromu 2
<b>scRNA-seq</b>	<i>single-cell RNA sequencing</i>	sekvenování transkriptomů v jednolivých buňkách
<b>ssRNA</b>	<i>single strand RNA</i>	jednovláknová RNA
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>	přenašeč signálu a aktivátor transkripce
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i>	T-buněčný receptor
<b>TCRB</b>	<i>T cell receptor beta chain</i>	β-řetězec TCR
<b>Tfh</b>	<i>T follicular helper cell</i>	folikulární pomocná T buňka
<b>Th1</b>	<i>T helper cell 1</i>	pomocná T buňka 1
<b>TIM-3</b>	<i>T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>	imunoglobulin T buněk obsahující mucinovou doménu 3
<b>TLR</b>	<i>toll-like receptor</i>	<i>Toll-like</i> receptor
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>	faktor nádorové nekrózy
<b>TYK2</b>	<i>tyrosine kinase 2</i>	tyrosinová kináza 2
<b>UTR</b>	<i>untranslated region</i>	nepřekládaná oblast
<b>VSV</b>	<i>vesicular stomatitis virus</i>	virus vezikulární stomatitidy

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SARS-CoV-2</b> .....	<b>1</b>
2.1	Charakteristika .....	1
2.3	Životní cyklus .....	3
2.3.1	Vstup do buňky .....	3
2.3.2	Rozmnožení viru .....	3
2.4	Patogeneze .....	3
2.4.1	Projevy .....	4
2.4.2	Syndrom akutní dechové tísně .....	5
<b>3</b>	<b>Vrozená imunitní odpověď</b> .....	<b>6</b>
3.1	Receptory .....	6
3.1.1	TLR a RLR .....	6
3.1.2	NLR .....	6
3.2	Interferony .....	7
3.2.1	Exprese IFN-I a IFN-III .....	7
3.2.2	Odlišnosti od viru SARS-CoV .....	9
3.3	Cytokinová bouře .....	9
3.4	NK buňky .....	10
<b>4</b>	<b>Specifická imunitní odpověď</b> .....	<b>11</b>
4.1	Imunitní odpověď T buněk .....	11
4.1.1	Specifická odpověď CD4 <sup>+</sup> a CD8 <sup>+</sup> T buněk .....	11
4.1.2	Korelace s věkem a závažností onemocnění covid-19 .....	13
4.1.3	Zkřížená reaktivita s jinými HCoV .....	15
4.2	Imunitní odpověď B buněk .....	16
4.2.1	Neutralizační protilátky .....	18
4.2.2	Zkřížená reaktivita .....	19
4.2.3	Protilátková odpověď na virus SARS-CoV-2 u dětí .....	19
4.3	Imunitní paměť .....	20
4.3.1	Srovnání se SARS-CoV a MERS-CoV .....	21
<b>5</b>	<b>Vývoj léčiv a vakcín</b> .....	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>24</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>25</b>

# 1 Úvod

Většina lidských koronavirů způsobuje pouze běžné nachlazení. Oproti tomu koronavirová nemoc 2019 (covid-19), vyvolaná nově objeveným koronavirem těžkého akutního respiračního syndromu 2 (SARS-CoV-2), je závažné onemocnění, které se rychle rozšířilo po celém světě. Začátkem května 2021 bylo evidováno přes 150 milionů případů covidu-19 a přes 3 miliony úmrtí, přičemž tyto počty stále narůstají.

Jakmile organismus rozpozná virus, spustí sérii obranných reakcí. Jako první reagují buňky vrozené imunity, které následně aktivují specifickou imunitní odpověď. Virus se tedy snaží vyvinout takové mechanismy, aby imunitní odpovědi hostitele unikl a mohl se úspěšně pomnožit. Proto je porozumění těmto imunitním reakcím probíhajících po infekci virem SARS-CoV-2 klíčové pro predikci vývoje covidu-19.

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosud známé poznatky o imunitních reakcích vyvolaných SARS-CoV-2 a popsat, kterými metodami mohou být detekovány. Dále se zaměřuje i na dlouhodobost imunity, ale protože se SARS-CoV-2 šíří v populaci jen poměrně krátkou dobu, předkládá informace o dlouhodobosti imunity i u příbuzných koronavirů. V závěru se práce zaměřuje na uplatnění poznatků popsaných imunitních reakcí ve vývoji léčiv a vakcín.

## 2 SARS-CoV-2

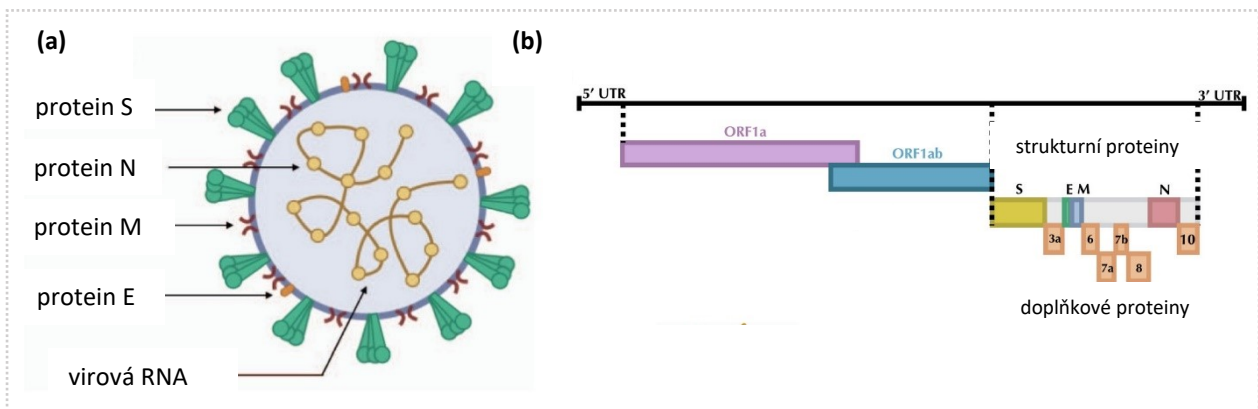
### 2.1 Charakteristika

Čeď *Coronaviridae*, do které se řadí SARS-CoV-2, je skupina obalených virů, jejichž genom tvoří jednovláknová RNA (ssRNA) s pozitivní polaritou a velikostí 26-32 kb (Masters and Perlman 2013). První lidský koronavirus (HCoV), zprvu pojmenovaný B814, byl izolován v roce 1965 (Tyrrell and Bynoe 1965). V současnosti je známo sedm HCoV. Všechny se řadí buď do rodu *Alpha-* nebo *Betacoronavirus*. Čtyři z nich, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 a HCoV-HKU1 způsobují nachlazení (Masters and Perlman 2013). Další tři mohou způsobit smrtelné onemocnění. V roce 2003 byl jako původce těžkého akutního respiračního syndromu (SARS) identifikován virus SARS-CoV (Ksiazek *et al.* 2003), který se rozšířil do 26 zemí světa, způsobil 8 096 známých případů SARS a 774 úmrtí (<https://www.who.int/publications/m/item/summary-of-probable-sars-cases-with-onset-of-illness-from-1-november-2002-to-31-july-2003>). V Saúdské Arábii byl roku 2012 vyizolován virus MERS-CoV způsobující blízkovýchodní respirační syndrom (MERS; Zaki *et al.* 2012),



kterým se k lednu 2020 nakazilo 2 519 lidí a 866 z nich zemřelo (<http://www.emro.who.int/pandemic-epidemic-diseases/mers-cov/mers-situation-update-january-2020.html>).

Koncem prosince 2019 byl ve Wu-chanu z bronchoalveolární tekutiny pacientů se zápallem plic vyizolován nový koronavirus, nejprve pojmenovaný jako 2019-nCoV. Sekvenací genomu kombinací metod Illumina a nanopórového sekvenování bylo zjištěno, že jeho struktura odpovídá rodu *Betacoronavirus* (Zhu *et al.* 2020a). Ukázalo se, že 2019-nCoV sdílí 88% sekvenční podobnost s netopýřími koronaviry, zhruba 79% sekvenční podobnost se SARS-CoV a zhruba 50% sekvenční podobnost s MERS-CoV (Lu *et al.* 2020). Proto byl 11. února 2020 Mezinárodním výborem pro klasifikaci virů přejmenován na SARS-CoV-2 ([https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)). Virion je sférický a jeho průměr se pohybuje od 60 do 140 nm (Obrázek 1a; Zhu *et al.* 2020a). Genomová RNA viru SARS-CoV-2 je 29,9 kb velká a obsahuje 5' čepičku, 3' polyadenylovaný konec, 5' a 3' nepřekládané oblasti (UTR), otevřené čtecí rámce 1a a 1ab (ORF1a, ORF1ab) a geny pro čtyři strukturální proteiny, spike (S), obalový (E), membránový (M) a nukleokapsidový (N) a doplňkové proteiny (Obrázek 1b; Chan *et al.* 2020).



Obrázek 1: Struktura virionu a genom viru SARS-CoV-2. (a) Virion viru SARS-CoV-2 obsahuje ssRNA asociovanou s proteinem N a proteiny S, M, E asociované s obalem. (b) Genom viru SARS-CoV-2 se skládá z 5' a 3' UTR, ORF1a a ORF1ab, strukturálních proteinů S, M, E, N a doplňkových proteinů ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8, ORF10. Převzato a upraveno podle Amor, Blanco, and Baker (2020).

## 2.3 Životní cyklus

### 2.3.1 Vstup do buňky

U koronavirů je vstup do hostitelské buňky zprostředkován proteinem S, který vytváří homotrimer. Každá ze tří shodných podjednotek se skládá z extracelulární N-terminální domény, transmembránové domény a krátké intracelulární C-terminální domény. K aktivaci proteinu S je potřeba hostitelský enzym transmembránová serinová proteáza 2, která štěpí extracelulární N-terminální doménu na dvě podjednotky S1 a S2 (Hoffmann *et al.* 2020). Podjednotka S1 se skládá z N-terminální domény a domény vázající receptor (RBD). Její funkcí je rozpoznat hostitelský receptor enzym konvertující angiotenzin 2 (ACE2). Podjednotka S2, která obsahuje konzervovaný fúzní peptid, heptadové repetice 1 (HR1) a 2 (HR2), transmembránovou doménu a cytoplazmatickou doménu, je velmi konzervovaná. Sdílí 99% sekvenční podobnost s podjednotkou S2 viru SARS-CoV (Chan *et al.* 2020). Rozpoznání ACE2 způsobí interakci HR1 a HR2 a vznikne svazek šesti alfa-helixů, který zprostředkuje fúzi viru s hostitelskou buňkou (Xia *et al.* 2020).

### 2.3.2 Rozmnožení viru

Po vstupu do buňky je virová RNA uvolněna a funguje jako informační RNA (mRNA). Hostitelskými ribozomy jsou nejprve translatovány ORF1a a ORF1ab a vznikají dva replikázové polyproteiny 1a a 1ab. Virové proteázy je štěpí na 16 nestrukturních proteinů (nsp). Gao *et al.* pomocí kryoelektronové mikroskopie ukázali, že nsp12, který se strukturně odlišuje od nsp12 viru SARS-CoV, funguje spolu s kofaktory nsp7 a nsp8 jako RNA dependentní RNA polymeráza (Gao *et al.* 2020). Replikace genomu probíhá přes ssRNA s negativní polaritou, která slouží jako templát pro vznik genomové RNA a subgenomových mRNA s pozitivní polaritou. Ze subgenomových mRNA jsou translatovány strukturní a doplňkové proteiny. Genomová RNA se váže na nukleokapsidový protein a společně s dalšími strukturními proteiny je transportována do přechodného kompartmentu mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho aparátem (ERGIC). V ERGIC dochází ke složení virionu. Složený virion opouští hostitelskou buňku pomocí exocytózy.

## 2.4 Patogeneze

Onemocnění způsobené SARS-CoV-2 bylo označeno jako covid-19. Při zkoumání délky inkubační doby byl stanoven medián na 5,1 dne, přičemž u 97,5 % nemocných se příznaky vyskytly do 11,5 dne (Lauer *et al.* 2020). Závažnost onemocnění je u pacientů různá, od bezpříznakové infekce po multiorgánové selhání a smrt, která nastává především v souvislosti s rozvinutím syndromu akutní dechové tísně (ARDS) vyvolané zápallem plic.

### 2.4.1 Projevy

Ze studií soustředících se na projevy onemocnění je patrné, že mezi nejčastější projevy se řadí horečka, kašel, únava a dušnost. Méně časté jsou bolesti svalů nebo hlavy a nevolnosti (srovnáno v Tabulce 1).

Tabulka 1: Srovnání příznaků nemoci covid-19 z jednotlivých studií. Ve sloupcích 3-7 jsou uvedeny počty pacientů s danými příznaky a procentuální vyjádření počtu pacientů s daným příznakem k celkovému počtu pacientů z dané studie po zaokrouhlení na celá procenta.

studie	počet pacientů	horečka	kašel	únava	dušnost	bolest svalů	bolest hlavy	nevolnost
Guan <i>et al.</i> 2020	1 099	975 (89 %)	745 (68 %)	419 (38 %)	205 (19 %)	164 (15 %)	150 (13 %)	55 (5 %)
Shi <i>et al.</i> 2020	416	334 (80 %)	144 (35 %)	55 (13 %)	117 (28 %)	19 (5 %)	9 (2 %)	-
Zhou <i>et al.</i> 2020	191	180 (94 %)	151 (79 %)	44 (21 %)	-	29 (15 %)	-	7 (4 %)
Wang <i>et al.</i> 2020a	138	136 (99 %)	82 (59 %)	96 (70 %)	43 (31 %)	48 (35 %)	9 (7 %)	14 (10 %)
Chen <i>et al.</i> 2020	99	82 (83 %)	81 (82 %)	-	31 (31 %)	11 (11 %)	8 (8 %)	1 (1 %)

Ukazuje se, že pohlaví hraje roli v závažnosti onemocnění covid-19. Např. ve studii 168 zemřelých pacientů v Číně bylo 126 z nich mužů (Xie *et al.* 2020). Vysvětlení této závislosti může souviset s hladinou ACE2 v plazmě, která je u mužů vyšší než u žen (Sama *et al.* 2020). Hladinu ACE2 snižuje u žen pohlavní hormon estrogen (Liu *et al.* 2010). Přesný mechanismus, kterým by se souvislost mezi pohlavím a závažností onemocnění covid-19 dala objasnit, však dosud nebyl popsán.

Mezi dalšími faktory, které mají vliv na horší průběh onemocnění a vyšší riziko úmrtí, byly dosud popsány věk a další chronické obtíže jako je vysoký tlak, cukrovka či ischemická choroba srdeční. Vztah mezi vyšším věkem a úmrtností byl zaznamenán např. ve studii z Itálie, kde bylo z 1 625 zemřelých na covid-19 1 428 osob starších 70 let (Onder, Rezza, and Brusaferro 2020). Vliv onemocnění srdce na mortalitu onemocnění covid-19 doložili Shi *et al.*, kdy z 57 zemřelých pacientů mělo 42 onemocnění srdce (Shi *et al.* 2020).

Různorodost průběhů a příznaků onemocnění souvisí také s variantami viru SARS-CoV-2, které vznikají přirozenou schopností viru mutovat. Např. u 44 pacientů z 251 byla detekována

delece 382 nukleotidů, která způsobila zkrácení ORF7b a odstranění transkripčně-regulační sekvence ORF8. Z nich bylo dále zkoumáno 29 pacientů, jejichž hodnoty byly porovnány s 92 pacienty s běžnou variantou viru. U pacientů s delecí byl průběh mírnější (srovnáno v Tabulce 2; Young *et al.* 2020). Byly však rozpoznány i mutace asociované s vážným průběhem onemocnění (Nagy, Pongor, and Györfy 2021).

Tabulka 2: Srovnání příznaků a projevů onemocnění covid-19 u pacientů s delecí ORF8 v genomu viru SARS-CoV-2 a u pacientů s běžnou variantou viru. Převzato a upraveno podle Young *et al.* (2020).

Příznaky/projevy	Pacienti s mutací (n = 29)	Pacienti s běžnou variantou (n = 92)
horečka	17 (59 %)	72 (78 %)
dušnost	1 (3 %)	15 (16 %)
hypoxie vyžadující terapii kyslíkem	0 (0 %)	26 (28 %)
nutnost hospitalizace na jednotce intenzivní péče	0 (0 %)	15 (16 %)
smrt	0 (0 %)	2 (2 %)

Proč delece ORF8 přispívá k mírnějšímu průběhu onemocnění zkoumali Zhang *et al.* Pomocí hmotnostní spektrometrie hledali proteiny, které interagují s proteinem ORF8. Zjistili, že ORF8 může zprostředkovávat transport hlavního histokompatibilního komplexu 1. třídy (MHC I) z endoplazmatického retikula do lysozomu, kde dochází k jeho degradaci. Virus SARS-CoV-2 tímto mechanismem uniká imunitnímu systému, protože bez prezentace virových peptidů na povrchu molekul MHC I nemůžou cytotoxické T lymfocyty rozpoznávat a degradovat virem infikované buňky (Zhang *et al.* 2020).

#### 2.4.2 Syndrom akutní dechové tísně

ARDS je akutní difúzní zánětlivé poškození plic, které vede ke zvýšené propustnosti plicních cév, nedostatečnému okysličení plicní tkáně a zvýšené hmotnosti plic v důsledku hromadění edémové tekutiny či krvácení. Diagnostika syndromu se řídí berlínskými kritérii. Ty zahrnují akutní respirační selhání související s nedostatkem kyslíku v arteriální krvi, které není způsobeno srdečním selháním, obtíže přetrvávající déle než týden nebo náhlé zhoršení stavu a oboustranný otok plic (Ranieri *et al.* 2012). Wu *et al.* ukázali, že k rozvoji ARDS a jeho těžkého průběhu vedoucího ke smrti jsou náchylnější lidé s covidem-19 ve vysokém věku, s vyšší hladinou neutrofilních granulocytů, poruchou srážení krve a nefunkčností orgánů (Wu *et al.* 2020).

## 3 Vrozená imunitní odpověď

### 3.1 Receptory

Při kontaktu buňky s patogenem se nejprve aktivuje vrozená imunitní odpověď. Přítomnost viru v hostitelské buňce je detekována receptory rozpoznávající molekulární vzory (PRR), které rozpoznávají molekulární vzory asociované s patogeny (PAMP) a molekulární vzory asociované s poškozením. Mezi významné PRRs patří *Toll-like* receptory (TLR), *RIG-I-like* receptory (RLR) a receptory obsahující oligomerizační doménu vázající nukleotid (*NOD-like* receptory, NLR).

#### 3.1.1 TLR a RLR

Mezi TLR, které rozpoznávají ssRNA, patří TLR7 a TLR8 (Heil *et al.* 2004). Tyto receptory spouští signální dráhu závislou na adaptorové molekule myeloidní diferenciací faktor 88, což vede k aktivaci nukleárního faktoru kappa b, mitogenem aktivované proteinkinázy a interferonových regulačních faktorů (IRF). Honda *et al.* zjistili, že IRF7 aktivovaný touto kaskádou, je nezbytný pro indukci interferonové odpovědi (Honda *et al.* 2005). Pomocí bioinformatické analýzy na virech SARS-CoV-2 a SARS-CoV bylo zjištěno, že genom SARS-CoV-2 obsahuje více ssRNA fragmentů než genom SARS-CoV. Z toho vyplývá, že imunitní odpověď vyvolaná touto cestou je silnější u viru SARS-CoV-2 (Moreno-Eutimio, López-Macías, and Pastelin-Palacios 2020).

Další receptory z rodiny TLR rozpoznávají virové glykoproteiny. Na ně byla zaměřena studie *in silico* využívající molekulárního dokování, která zkoumala interakce mezi proteinem S viru SARS-CoV-2 a různými TLR. Bylo ukázáno, že protein S má největší afinitu k TLR1, TLR4 a TLR6, přičemž nejsilněji interaguje s TLR4 (Choudhury and Mukherjee 2020).

Receptory diferenciací protein asociovaný s melanomem 5 (MDA-5) a RNA helikáza LGP2 z rodiny RLR rozpoznávají dsRNA, která vzniká jako intermediát při replikaci a transkripci viru SARS-CoV-2 (Yin *et al.* 2021).

#### 3.1.2 NLR

NLR jsou cytosolické PRR, které při rozpoznání PAMP formují proteinový komplex zvaný inflamazóm. Doplnkový protein ORF3a viru SARS-CoV-2 aktivuje NLR obsahující pyrinovou doménu 3 (NLRP3; Rodrigues *et al.* 2020, Xu *et al.* 2020). NLRP3 inflamazóm se skládá z receptoru NLRP3, proteinu asociovaného s apoptózou obsahujícího C-koncovou kaspázovou rekrutační doménu (ASC) a kaspázy 1.

Kaspáza 1 je aktivována proteolytickým štěpením a umožňuje sekreci prozánětlivých cytokinů interleukinu 1 beta (IL-1 $\beta$ ) a interleukinu 18 (IL-18) aktivací jejich neaktivních prekurzorů. Kaspáza 1 také štěpí protein gasdermin D, což vede k indukci pyroptózy a sekreci maturovaného IL-1 $\beta$  (He *et al.* 2015).

Pro úspěšné pomnožení viru v hostiteli jsou nezbytné mechanismy úniku před hostitelským imunitním systémem. Konkrétně u viru SARS-CoV-2 bylo ukázáno, že dva nestrukturní proteiny, nsp1 a nsp13, brání aktivaci kaspázy 1 a zároveň inhibují aktivaci NLRP3 inflamazómu (Kim, Kim, and Song 2021).

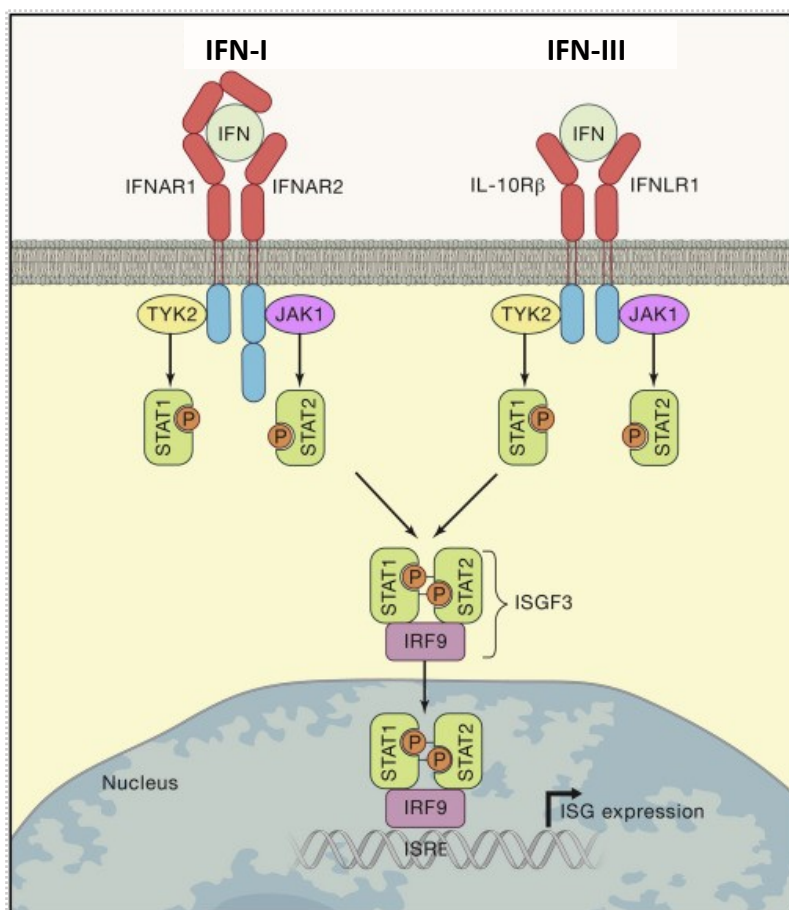
### 3.2 Interferony

Interferony (IFN) jsou důležité cytokiny, které byly objeveny v souvislosti s jejich antivirovou aktivitou (Isaacs and Lindenmann 1957). V současnosti jsou známy tři typy IFN (IFN-I, IFN-II a IFN-III). Mezi lidské IFN-I patří IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  a IFN- $\omega$ , IFN-II má jediného zástupce IFN- $\gamma$  a mezi IFN-III se řadí IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 a IFN- $\lambda$ 4.

Ihned po rozpoznání virové infekce PRR jsou však produkovány pouze IFN-I a IFN-III, které signalizují prostřednictvím heterodimerních receptorů. U IFN-I se jedná o receptor IFNAR složený z podjednotek IFNAR1 a IFNAR2 a IFN-III jsou rozpoznávány receptorem IFNLR tvořeným podjednotkami IFNLR1 a IL10-R $\beta$ . Oba receptory využívají shodnou signální dráhu, ve které Janusova kináza 1 (JAK1) a tyrosinová kináza 2 (TYK2) fosforylují transkripční faktory přenašeč signálu a aktivátor transkripce 2 (STAT2) a STAT1, které společně s faktorem IRF9 tvoří heterotrimerní komplex genový faktor 3 stimulovaný interferonem (ISGF3) spouštějící v jádře transkripci genů stimulovaných IFN (ISG; Obrázek 2; Lazear, Schoggins, and Diamond 2019).

#### 3.2.1 Exprese IFN-I a IFN-III

Blanco-Melo *et al.* zkoumali, jak na infekci virem SARS-CoV-2 reagují lidské bronchiální epiteliální buňky. Zjistili, že v buňkách chybí exprese IFN-I i IFN-III, ale zároveň jsou silně exprimovány chemokinový ligand 20 s motivem C-C (CCL20), chemokinový ligand 1 s motivem C-X-C (CXCL1), CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL2, CXCL16, IL-1 $\beta$ , IL-6, a faktor nádorové nekrózy (TNF) způsobující silnou zánětlivou odpověď. Nepřítomnost IFN-I i IFN-III a zvýšené hladiny jiných cytokinů a chemokinů prokázali i při studiu séra 24 pacientů s covidem-19 (Blanco-Melo *et al.* 2020).



Obrázek 2: Signální dráhy INF-I a INF-III. INF-I je rozpoznáván podjednotkami IFNAR1 a IFNAR2 a INF-III je rozpoznáván podjednotkami IL-10Rβ a IFNLR1. JAK1 a TYK2 fosforylují transkripční faktory STAT2 a STAT1, které společně s IRF9 tvoří heterotrimerní komplex ISGF3, který po přesunu do jádra aktivuje ISG. Převzato a upraveno podle Lazear, Schoggins, and Diamond (2019).

Detailněji se IFN-I zabývali Hadjadj *et al.*, kteří došli k trochu odlišným výsledkům. Provedli transkriptomickou analýzu bílých krvinek z periferní krve u 50 pacientů s covidem-19. Mezi 50 pacienty byly rovnoměrně zastoupeny všechny varianty průběhů onemocnění (30 % pacientů s lehkým až středním, 34 % pacientů s vážným a 36 % s kritickým průběhem). Ačkoli u kriticky nemocných pacientů odhalili zvýšenou expresi genů účastnících se JAK-STAT dráhy (IFNAR1, JAK1, TYK2), exprese ISG indukovaná touto signální kaskádou byla výrazně snižena. Hodnota koncentrace proteinu IFN-α byla snižena v séru pacientů s kritickým průběhem, zatímco přítomnost IFN-β nebyla zjištěna ani u jednoho pacienta (Hadjadj *et al.* 2020).

Galani *et al.* provedli obsáhlou studii, ve které pomocí enzymové imunisorbentní analýzy (ELISA) a multiplexové analýzy Luminex detekovali cytokiny a chemokiny ze sér pacientů získaných v předem daných časových intervalech. U 32 pacientů byly během prvních 6 dní po objevení příznaků onemocnění produkovány prozánětlivé cytokiny a chemokiny CCL3, IL-6, IL-8, IL-10, TNF. Teprve až za 7-10 dní po prvních příznacích byly detekovatelné hladiny

IFN- $\alpha$  a IFN- $\lambda$ , přičemž hodnota IFN- $\lambda$  byla vyšší u kriticky nemocných pacientů. Ale zároveň bylo u těchto pacientů přítomno v respiračním traktu méně virových částic. Dokonce ti, kteří měli vyšší hodnotu IFN- $\lambda$  než IFN- $\alpha$ , byli hospitalizováni na jednotce intenzivní péče (JIP) po kratší dobu (Galani *et al.* 2021). Ukázali tak, že produkce IFN v reakci na infekci SARS-CoV-2 není okamžitá, jak se předpovídalo, ale nastává až po silné zánětlivé odpovědi.

Za zpožděnou produkci IFN jsou zodpovědné proteiny kódované v genomu viru SARS-CoV-2. Konkrétně proteiny nsp13, nsp14, nsp15 a doplňkový protein ORF6 byly detekovány jako silné inhibitory produkce IFN (Yuen *et al.* 2020). Mu *et al.* ukázali, že strukturní protein N inhibuje fosforylaci transkripčních faktorů STAT1 a STAT2, čímž také brání produkci IFN (Mu *et al.* 2020).

### 3.2.2 Odlišnosti od viru SARS-CoV

Chu *et al.* ve své *ex vivo* studii odebrali dobrovolníkům vzorky plicní tkáně, které infikovali virem SARS-CoV a SARS-CoV-2 a porovnali, jak se od sebe liší infekce vyvolané těmito viry. Ačkoli virus SARS-CoV-2 generoval z plicní tkáně 3,2krát více infekčních částic než virus SARS-CoV, vrozená imunitní odpověď byla slabší. Infekce virem SARS-CoV se projevila zvýšenými hodnotami IFN-I, IFN-II i IFN-III, oproti tomu u viru SARS-CoV-2 nebyly detekovány zvýšené hladiny ani u jednoho typu IFN. Co se týče jiných cytokinů a chemokinů, vyhodnocovali expresi 4 klíčových prozánětlivých cytokinů a 9 chemokinů. U viru SARS-CoV detekovali zvýšenou expresi u 11 z nich, zatímco u SARS-CoV-2 byla zvýšená exprese detekována pouze u CCL2, CXCL1, CXCL5 a CXCL10 (Chu *et al.* 2020).

## 3.3 Cytokinová bouře

Poprvé bylo označení cytokinová bouře zmíněno v souvislosti s poškozením tkáně při reakci štěpu proti hostiteli (Antin and Ferrara 1992). Jedná se o jev, při kterém dochází k agresivní imunitní odpovědi a náhlému uvolnění velkého množství zánětlivých cytokinů. Cytokiny účastníci se této reakce jsou nejčastěji IL, TNF a IFN. Zvýšení hladiny cytokinů způsobí aktivaci makrofágů a dalších imunitních buněk v místě infekce, což vede k rozvoji zánětu a poškození tkání. Protože byla cytokinová bouře pozorována u pacientů se SARS (Huang *et al.* 2005), předpokládalo se, že by mohla souviset i s vážným průběhem nemoci covid-19. Huang *et al.* provedli rozbor plazmy u 41 hospitalizovaných pacientů s covidem-19 a těžkým zápallem plic. Hladiny IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CCL2, CCL3, CXCL10, faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF) a dalších cytokinů byly zvýšené bez ohledu na nutnost hospitalizace na JIP, přičemž pacienti vyžadující péči na JIP měli vyšší hladiny



IL-2, IL-7, IL-10, GCSF, CCL2, CCL3, CXCL10 a TNF- $\alpha$  než pacienti s mírnějším průběhem onemocnění (Huang *et al.* 2020). Další studie na 126 pacientech s covidem-19 (111 s normálním průběhem covidu-19, 16 s vážným průběhem) ukázala, že hladiny IL-6, IL-10 a IFN- $\gamma$  byly významně vyšší u skupiny pacientů s vážným průběhem covidu-19 než u pacientů s normálním průběhem onemocnění (Zhu *et al.* 2020b). Z uvedených výsledků vyplývá, že cytokinová bouře úzce souvisí s horším průběhem covidu-19.

### 3.4 NK buňky

Přirozeně cytotoxické buňky (NK) jsou důležitou součástí vrozené imunitní odpovědi. NK buňky jsou aktivovány celou řadou cytokinů, jako například IL-2, IL-12 a IL-15 (Vitale *et al.* 2002) a IFN-I (Gidlund *et al.* 1978). Jedním z markerů pro detekci NK buněk je CD56. NK buňky, které tento povrchový antigen exprimují více, se označují jako CD56<sup>bright</sup> a jejich funkcí je produkovat prozánětlivé cytokiny. Jako CD56<sup>dim</sup> NK buňky se označují ty, které CD56 exprimují méně a mají hlavně cytotoxickou funkci (Jacobs *et al.* 2001).

Wilk *et al.* osekvenovali pomocí sekvenování transkriptomů v jednotlivých buňkách (scRNA-seq) PBMC získané od 7 hospitalizovaných pacientů s covidem-19, z nichž 4 měli ARDS, a od 6 zdravých jedinců. Celkově osekvenovali 44 721 buněk, což odpovídá v průměru 3 194 buňkám na vzorek. Na základě exprese markeru CD56 zjistili, že hladiny CD56<sup>bright</sup> NK buněk byly nižší u všech pacientů s covidem-19 bez ohledu na závažnost onemocnění. Zatímco hladiny CD56<sup>dim</sup> NK buněk byly snižené hlavně u pacientů s vážným průběhem. Dále zjistili, že NK buňky neexprimovaly výrazné množství prozánětlivých cytokinů, což odpovídá sníženému množství CD56<sup>bright</sup> NK buněk (Wilk *et al.* 2020).

NK buňky jedinců infikovaných SARS-CoV-2 vykazovaly silnější expresi inhibičního receptoru NKG2A než NK buňky zdravých jedinců. Současně u pacientů s covid-19 naměřili Zheng *et al.* nižší hodnoty membránového proteinu 1 asociovaného s lysozomem (LAMP1), IFN- $\gamma$ , IL-2 a TNF- $\alpha$  produkovaných NK buňkami než u zdravých jedinců. Vybraných 5 pacientů podrobili antivirové terapii. Ukázalo se, že po léčbě došlo ke zvýšení počtu NK buněk, přičemž klesl počet NK buněk exprimujících receptor NKG2A (Zheng *et al.* 2020). Zda je snížení NK buněk v periferní krvi způsobeno jejich přesunem do místa infekce, nebo zda podléhají buněčné smrti zatím není známo.

## 4 Specifická imunitní odpověď

Správně regulovaná specifická imunitní odpověď je pro organismus klíčová k úspěšnému zvládnutí infekce. Mechanismy specifické imunitní odpovědi, které rozpoznávají a reagují na cizorodé molekuly, dělíme na buněčné a humorální. Buněčné mechanismy jsou zprostředkovány T lymfocyty a humorální jsou založené na protilátkách produkovaných B lymfocyty.

### 4.1 Imunitní odpověď T buněk

Klasifikace T lymfocytů je značně složitá. V této práci se budu věnovat T lymfocytům, které exprimují molekuly CD4 (koreceptor lidského leukocytárního antigenu 2. třídy; HLA II) nebo CD8 (koreceptor HLA I). Z virově specifických CD4<sup>+</sup> T buněk mohou vznikat např. pomocné T buňky 1 (Th1) nebo folikulární pomocné T buňky (Tfh). Th1 buňky produkují IFN- $\gamma$  a mají tak antivirový účinek (Braun *et al.* 2020). Funkcí Tfh buněk je pomáhat B buňkám tvořit protilátky (Schaerli *et al.* 2000). Během infekce SARS-CoV-2 jsou produkovány cirkulující Tfh buňky (Meckiff *et al.* 2020) rozpoznávané pomocí chemokinového receptoru 5 s doménou CXCR5, který se vyskytuje na jejich povrchu (Schaerli *et al.* 2000). Jejich tvorba je asociována s mírným průběhem nemoci covid-19 (Rydyznski Moderbacher *et al.* 2020).

U CD4<sup>+</sup> T buněk byla zaznamenána exprese cytokinu IL-22 (Rydyznski Moderbacher *et al.* 2020), který hraje důležitou roli při regulaci zánětu a obnově plicní tkáně (Besnard *et al.* 2011; Simonian *et al.* 2010). Z CD8<sup>+</sup> T buněk vznikají hlavně cytotoxické T buňky, jejichž hlavní schopností je zabíjet infikované buňky (Resch and Fischer 1971).

#### 4.1.1 Specifická odpověď CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk

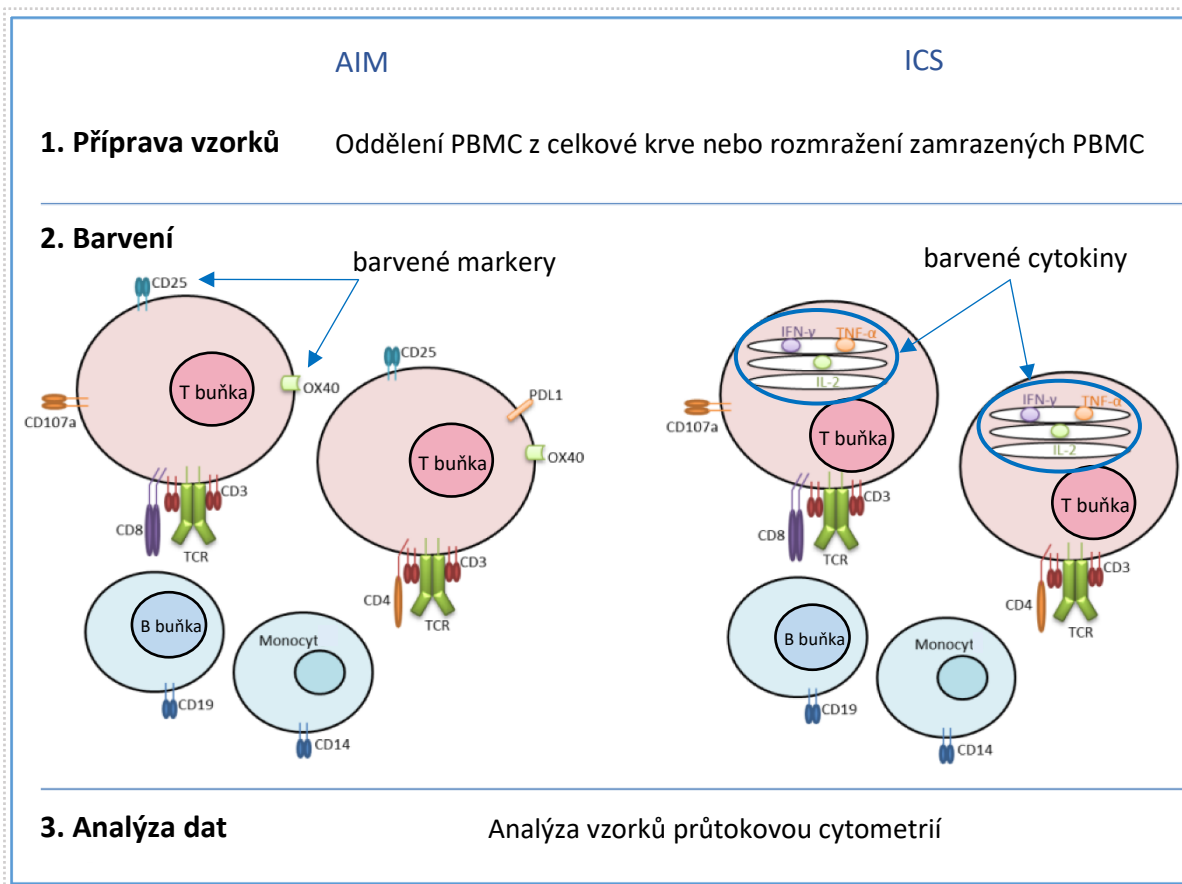
Často používanou metodou k identifikaci a kvantifikaci odpovědi CD4<sup>+</sup> T buněk je analýza pomocí markerů indukovaných aktivací (AIM). Jedná se o metodu značení vzorků pro průtokovou cytometrii, která je závislá na markerech indukovaných T-buněčnými receptory (TCR) jako např. diferenční antigen 25 (CD25) nebo receptor 4 z nadčeledi TNF (OX40; Havenar-Daughton *et al.* 2016).

K detekci odpovědi CD4<sup>+</sup> T buněk na infekci virem SARS-CoV-2 využili Grifoni *et al.* mononukleární buňky získané z periferní krve (PBMC) 10 pacientů vyléčených z covidu-19 a pro porovnání i z 11 zdravých jedinců nevystavených viru SARS-CoV-2. PBMC stimulovali dvěma soubory nasyntetizovaných peptidů, z nichž jeden obsahoval 253 překrývajících se patnáctimerů pokrývajících celý protein S viru SARS-CoV-2 a druhý odpovídal všem predikovaným epitopům CD4<sup>+</sup> T buněk pokrývajících zbytek proteomu. Využili AIM metodu

a jako markery zvolili OX40 a CD137. Odpověď  $CD4^+$  T buněk byla u všech 10 pacientů s covidem-19 zaznamenána jak proti S proteinu, tak proti ostatním virovým proteinům, zejm. M, N, nsp3, nsp4 a ORF8 (Grifoni *et al.* 2020).

U stejných vzorků měřili Grifoni *et al.* také imunitní odpověď  $CD8^+$  T buněk a využili kromě AIM metody také přístupu vnitrobuněčného barvení cytokinů (ICS). Při ICS jsou detekovány cytokiny, které jsou produkovány antigenně specifickými T buňkami, podobně jako povrchové proteiny u AIM. Oproti metodě AIM se ale přidává inhibitor proteinového transportu, aby nebyly cytokiny sekretovány ven z buňky a bylo možné je detekovat v buňkách (porovnáno v Obrázku 3; Gupta and Maecker 2015). Metodou AIM s markery CD69 a CD137 byla u 70 % pacientů s covidem-19 detekována specifická imunitní odpověď  $CD8^+$  T buněk, přičemž u většiny z nich byla ICS analýzou prokázána produkce IFN- $\gamma$ . Z těchto buněk navíc většina produkovala ještě i TNF- $\alpha$  (Grifoni *et al.* 2020).

Tarke *et al.* se ve své studii blíže zabývali, kterými konkrétními antigeny a jejich epitopy je vyvolána odpověď  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T buněk. Vzorky PBMC získané z 99 pacientů s covidem-19 stimulovali 1 925 různými peptidy pokrývajícími celý proteom viru SARS-CoV-2 a analyzovali jejich reaktivitu pomocí AIM s kombinací markerů OX40 a CD137 pro  $CD4^+$  T buňky a CD69 a CD137 pro  $CD8^+$  T buňky. Celkově identifikovali 280 epitopů  $CD4^+$  T buněk a 523 epitopů  $CD8^+$  T buněk. 83 % odpovědi  $CD4^+$  T buněk směřovalo proti 9 virovým proteinům (seřazeno sestupně podle frekvence odpovědi: S, M, N, nsp3, ORF3a, nsp12, nsp4, nsp13 a ORF8), přičemž u každého jedince  $CD4^+$  T buňky rozpoznaly v průměru 3,2 virových antigenů a na jeden antigen bylo rozpoznáno 5,9 epitopů  $CD4^+$  T buněk. U  $CD8^+$  T buněk směřovalo 81 % jejich odpovědi proti 8 virovým proteinům (seřazeno sestupně podle frekvence odpovědi: S, nsp3, N, M, ORF3a, nsp4, nsp12, nsp6), přičemž  $CD8^+$  T buňky rozpoznaly u každého jedince průměrně 2,7 virových antigenů a na 1 antigen bylo rozpoznáno 1,6 epitopů  $CD8^+$  T buněk. (Tarke *et al.* 2021).



Obrázek 3: Srovnání metod AIM a ICS. Po přípravě vzorků dochází k barvení a analýze dat. Vlevo značeno pomocí markerů CD25 a OX40 indukovaných TCR. Vpravo označování cytokinů IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  a IL-2, které se po přidání inhibitoru proteinového transportu hromadí uvnitř T buněk. Převzato a upraveno podle Flaxman and Ewer (2018).

#### 4.1.2 Korelace s věkem a závažností onemocnění covid-19

Úspěšná odpověď T buněk na novou infekci závisí především na rozmanitosti unikátních TCR. Qi *et al.* ukázali, že s přibývajícím věkem se různorodost TCR významně snižuje. Pomocí sekvenování technologií Illumina osekvenovali knihovny skládající se z komplementárních DNA k  $\beta$ -řetězci TCR (TCRB). K vypočtení různorodosti TCRB, která závisí na náhodném přesmyku segmentů TCRB, využili jen sekvence odpovídající V a J segmentu TCRB. U 4 jedinců ve věku 20-35 let detekovali 60-120 milionů různých genů pro TCRB u CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T buněk, zatímco u 5 jedinců ve věku 70-85 let našli pouze 8-57 milionů těchto genů (Qi *et al.* 2014).

Jak odpověď CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk na vir SARS-CoV-2 souvisí s věkem a závažností covidu-19 zkoumali Rydyznski Moderbacher *et al.* Pomocí metody AIM analyzovali imunitní odpověď CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk a zjistili, že koordinace odpovědi těchto buněk na vir SARS-CoV-2 je značně narušená u pacientů ve věku 65 let a starších. Korelační analýzou dále zjistili, že nízká frekvence CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk koreluje s věkem a závažností onemocnění. Nízké procento naivních CD8<sup>+</sup> T buněk v PBMC souviselo s těžším průběhem nemoci

covid-19 jak u 15 pacientů již vyléčených, tak u 24 pacientů prodávajících akutní infekci od mírného průběhu po fatální, zatímco procento naivních CD4<sup>+</sup> T buněk souviselo s rozvojem těžšího průběhu onemocnění pouze u akutních pacientů (Rydyznski Moderbacher *et al.* 2020).

Kuličkovou analýzou cytokinů, při které jsou protilátky specifické pro jednotlivé cytokiny navázány na kuličkách místo na kultivační destičce, jako je tomu u testu ELISA, dále zkoumali markery leukocytů v periferní krvi. U 24 pacientů s vážným průběhem byly zvýšené hodnoty markerů CXCL10, IL-8 a IL-6, přičemž množství CXCL10 bylo nepřímo úměrné k množství CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk specifických pro SARS-CoV-2. CXCL10 by tak mohl být markerem snížené odpovědi CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T buněk u pacientů s vážným průběhem covidu-19 (Rydyznski Moderbacher *et al.* 2020).

Sekine *et al.* ve své práci charakterizovali pomocí průtokové cytometrie fenotyp specifických T buněk u pacientů s vážným průběhem covidu-19 a u pacientů v rekonvalescenci. K detekci CD8<sup>+</sup> T buněk specifických pro predikované epitopy viru SARS-CoV-2 využili tetramery HLA I. Časná specifická odpověď CD8<sup>+</sup> T buněk byla charakterizována expresí proteinu Ki-67 (Sekine *et al.* 2020), který se využívá jako marker proliferujících buněk (Gerdes *et al.* 1983), expresí aktivačních molekul CD38, receptoru HLA-DR, inhibičních receptorů proteinu programované buněčné smrti 1 (PD-1) a imunoglobulinu T buněk obsahující mucinovou doménu 3 (TIM3) a také cytotoxických molekul granzymu B a perforinu. Oproti tomu v době rekonvalescence byly CD8<sup>+</sup> T buňky charakteristické expresí molekul CCR7, CD127, CD45RA a faktoru T buněk 1 typických pro časně diferencovanou imunitní paměť, zároveň exprese CCR7 a CD45RA byla přímo úměrná počtu dní od projevení infekce (Sekine *et al.* 2020).

Enzymová imunoanalýza jednotlivých buněk (ELISPOT) se používá pro kvantifikaci buněk sekretujících specifické cytokiny nebo protilátky. Principem této analýzy je kultivace buněk na jamkových destičkách potažených specifickou protilátkou, která zachytává cytokiny sekretované těmito buňkami. Zachycené cytokiny jsou poté označeny detekčními protilátkami a jednotlivé buňky produkující cytokin jsou kvantifikovány enzymaticky (Czerkinsky *et al.* 1983). Touto metodou zkoumali Tan *et al.* produkci IFN- $\gamma$  ve 12 vzorcích PBMC buněk stimulovaných epitopy SARS-CoV-2. Zjistili, že oproti pacientům s vážným průběhem covidu-19 je u pacientů s mírným průběhem onemocnění vysoká frekvence buněk produkujících IFN- $\gamma$  jak v časně fázi onemocnění (1-15 dní po projevení příznaků), tak v pozdější fázi mezi 15. a 30. dnem po objevení příznaků (Tan *et al.* 2021). Oproti tomu Wilk *et al.* ve vzorcích PBMC od 7 hospitalizovaných pacientů neobjevili pomocí scRNA-seq významnou expresi prozánětlivých cytokinů (Wilk *et al.* 2020).

S covidem-19 je také spojen patologický efekt zvaný lymfopenie, při kterém dochází ke snížení počtu lymfocytů v periferní krvi. Krevní rozbor provedli např. Qin *et al.*, kteří sníženou hladinu lymfocytů objevili u všech 44 pacientů s covidem-19, přičemž největší pokles byl u pacientů s vážným průběhem, u kterých dále pozorovali zvýšenou hladinu naivních Th buněk a snížené hladiny paměťových Th buněk a regulačních T buněk (Qin *et al.* 2020). Tan *et al.* ukázali, že procento počtu lymfocytů v periferní krvi může sloužit k predikci průběhu onemocnění. První měření prováděli 10-12 dní po projevení příznaků. U pacientů s více jak 20 % lymfocytů v periferní krvi (% LYM) byl klasifikován mírný průběh, u pacientů pod 20 % LYM byl predikován vážný průběh, ale bylo potřebné další rozdělení. To proběhlo 17-19 dní po projevení příznaků, kdy u pacientů s více jak 20 % LYM byl opět klasifikován mírný průběh, u pacientů s % LYM mezi 5 a 10 byl klasifikován vážný průběh a u pacientů pod 5 % LYM byl klasifikován kritický průběh s nutnou hospitalizací na JIP (Tabulka 3; Tan *et al.* 2020b).

Tabulka 3: Predikce průběhu covid-19 na základě počtu lymfocytů v periferní krvi. Převzato a upraveno podle Tan *et al.* (2020b).

% LYM	10-12 dní po projevení příznaků	17-19 dní po projevení příznaků
>20 %	mírný průběh	mírný průběh
5-20 %	vážný průběh	vážný průběh
<5 %	vážný průběh	kritický průběh

#### 4.1.3 Zkřížená reaktivita s jinými HCoV

Při zkoumání odpovědi CD4<sup>+</sup> T a CD8<sup>+</sup> T buněk pomocí stimulace PBMC antigeny viru SARS-CoV-2 (syntetickými peptidy odvozenými od proteinů N, nsp7 a nsp13) a následné ELISPOT analýze Le Bert *et al.* zjistili, že u 19 ze 37 jedinců, kteří nebyli vystaveni viru SARS-CoV-2, došlo ke specifické odpovědi IFN- $\gamma$ . U 4 z nich byla odpověď zaměřena pouze na epitop proteinu N, u 8 pouze na epitopy proteinů nsp7 a nsp13 a u 7 na epitopy všech tří proteinů. Pomocí průtokové cytometrie dále zkoumali vzorky 4 jedinců nevystavených ani viru SARS-CoV ani SARS-CoV-2. U 1 detekovali CD4<sup>+</sup> T buňky reaktivní na epitop proteinu N, který sdílel vysokou sekvenční podobnost s N proteinem virů MERS-CoV, HCoV-OC43 a HCoV-HKU1. U 1 dalšího prokázali CD4<sup>+</sup> T buňky reaktivní na epitop proteinu nsp7 a u 2 zbývajících CD8<sup>+</sup> T buňky reaktivní také na epitop proteinu nsp7. Tyto výsledky svědčí o možné zkřížené reaktivitě T buněk s jinými koronaviry (Le Bert *et al.* 2020).

Mateus *et al.* zkoumali, zda přítomnost T buněk reagujících na antigeny SARS-CoV-2 u jedinců nevystavených tomuto viru souvisí se zkříženou reaktivitou s jinými HCoV. Nejprve stimulovali vzorky PBMC získané od 18 jedinců nevystavených viru SARS-CoV-2 soubory syntetických peptidů a hledali epitopy viru SARS-CoV-2 rozpoznávané CD4<sup>+</sup> T buňkami. Celkově identifikovali 142 epitopů, z nichž 66 bylo z proteinu S a 76 ze zbytku virového proteomu. Pomocí fluorescenční metody FluoroSpot, která oproti metodě ELISPOT využívá k detekci buněk produkujících cytokiny fluorofory, vybrali jen epitopy s největší odpovědí CD4<sup>+</sup> T buněk (31 z proteinu S, 30 ze zbytku proteomu). Těmito vybranými epitopy stimulovali PBMC od jedinců nevystavených viru SARS-CoV-2. Získali tak linie T buněk reagující na 42 epitopů SARS-CoV-2 a pro ověření zkřížené reaktivity s jinými HCoV tyto linie dále stimulovali syntetickými peptidy odvozenými od HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 a HCoV-229E. Zkříženou reaktivitu prokázali u 24 % linií T buněk, přičemž byla asociována s epitopy proteinů S, N, nsp8, nsp12 a nsp13 viru SARS-CoV-2 (Mateus *et al.* 2020).

Možnou zkříženou reaktivitou CD8<sup>+</sup> T buněk mezi SARS-CoV-2 a viry SARS-CoV, HCoV-229E, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 a HCoV-OC43 se zabývali Lee *et al.* *In silico* přístupem zkonstruovali mapu 794 predikovaných epitopů SARS-CoV-2, z nichž 411 bylo unikátních pro SARS-CoV-2. Ze zbylých 383 epitopů sdílelo 379 z nich podobnost se SARS-CoV a pouze 21 z nich s některým z HCoV. Z těchto výsledků vyplývá, že křížová reakce CD8<sup>+</sup> T buněk je silná mezi viry SARS-CoV-2 a SARS-CoV, zatímco mezi SARS-CoV-2 a ostatními HCoV je minimální (Lee *et al.* 2020).

## 4.2 Imunitní odpověď B buněk

U předešlých koronavirů SARS-CoV a MERS-CoV byly jako hlavní antigeny pro vyvolání protilátek detekovány proteiny N a S (Du *et al.* 2009; Trivedi *et al.* 2018), proto se i studie zabývající se produkcí protilátek proti SARS-CoV-2 soustředí právě na tyto dva proteiny. Hashem *et al.* zkoumali kinetiku tvorby protilátek imunoglobulinu M (IgM) a IgG proti proteinům S a N viru SARS-CoV-2 (S-IgM, S-IgG, N-IgM, N-IgG). Přítomnost těchto protilátek v séru 87 pacientů s covidem-19 detekovali metodou nepřímá ELISA za použití sekundárních protilátek značených křenovou peroxidázou a rozpoznávajících lidské IgM nebo IgG. U většiny pacientů detekovali S-IgG, S-IgM, N-IgG a N-IgG hned při prvním odběru prováděném mezi 4. a 70. dnem od projevení příznaků. Výjimkou byl 1 pacient s mírným průběhem onemocnění, u kterého nebyly detekovatelné protilátky S-IgG ani N-IgG. Nejvyšší hodnoty S-IgG a N-IgG byly detekovány mezi 20 a 40 dny po projevení nemoci kromě dvou

případů s vážným průběhem, u kterých mezi 20. a 30. dnem nedetekovali žádné S-IgG (Hashem *et al.* 2020).

Sun *et al.* se dále zabývali tím, jak se liší kinetika protilátek v závislosti na hospitalizaci na JIP. Ze vzorků sér získaných od 38 pacientů s covidem-19 (z nichž 11 bylo hospitalizováno na JIP) detekovali protilátky proti stejným antigenům jako v předchozí studii. U nehospitalizovaných pacientů byly v prvním týdnu od projevení příznaků hodnoty S-IgG, S-IgM, N-IgG a N-IgG podobné, zatímco v dalším týdnu pozorovali náhlé zvýšení N-IgM a S-IgM. U některých pacientů byly ve druhém a třetím týdnu od objevení prvních příznaků vyšší hladiny N-IgG než IgM, což naznačuje, že u těchto pacientů došlo k izotypovému přesmyku. Množství protilátek S-IgM u nehospitalizovaných pacientů korelovalo s množstvím protilátek S-IgG, ale mezi protilátkami N-IgM a N-IgG nebyl pozorován žádný vztah. Oproti tomu u hospitalizovaných pacientů nebyla mezi žádnými hodnotami jednotlivých protilátek objevena žádná korelace. Zatímco 63,6 % pacientů na JIP mělo po 4 týdny od prvních příznaků nízké hladiny N-IgM, u ostatních pacientů na JIP byly naopak zvýšené. Ve 2. týdnu od prvních příznaků převýšily hladiny N-IgG u 81,8 % pacientů na JIP hladiny N-IgM. O týden později převýšily i hladiny S-IgG hladiny S-IgM u většiny pacientů na JIP (Sun *et al.* 2020a).

Jak souvisí produkce protilátek N-IgG a N-IgM se závažností onemocnění covid-19 bylo zjišťováno analýzou vzorků plazmy od 11 pacientů s mírným průběhem a 12 s těžkým průběhem covidu-19 opět pomocí metody ELISA. U pacientů s mírným průběhem docházelo jen ke slabé odpovědi protilátek N-IgM na virus SARS-CoV-2, zatímco u pacientů s vážným průběhem byla odpověď silnější s nejvýraznějším nárůstem 1 až 2 týdny po objevení prvních příznaků a klesat začala postupně po 4 týdnech. Vysoké hladiny protilátek N-IgG byly detekovány 10 až 15 dní po objevení prvních příznaků neohledě na závažnost onemocnění a u většiny pacientů přetrvávaly nejméně 6 týdnů po objevení prvních příznaků (Wang *et al.* 2020c).

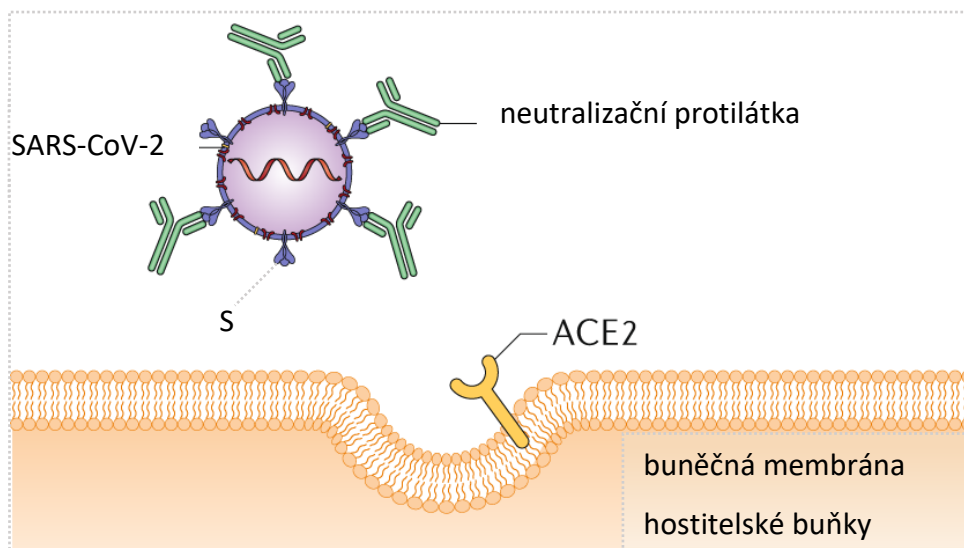
Long *et al.* hledali vztahy mezi vývojem protilátek IgG a IgM. Pomocí magnetické chemiluminiscenční enzymové analýzy našli jak S-IgG a N-IgG, tak S-IgM a N-IgM protilátky do 20 dní od prvních příznaků onemocnění ve všech 26 jimi analyzovaných vzorcích sér od pacientů s covidem-19. Přitom u 9 pacientů došlo k rozvoji S-IgG a N-IgG zároveň s S-IgM a N-IgM, u 7 pacientů se nejprve objevily protilátky S-IgM a N-IgM a u 10 pacientů se naopak dříve objevily protilátky S-IgG a N-IgG (Long *et al.* 2020). V jiné studii na 41 pacientech s covid-19 za použití shodné metody prokázali, že protilátky IgG se vytváří dříve (medián 11 dní po projevení prvních příznaků), než IgM protilátky (medián 14 dní po projevení



prvních příznaků; Qu *et al.* 2020). Podobný výsledek byl zaznamenán i v minulosti u viru SARS-CoV, u kterého byl imunofluorescenční protilátkovou analýzou a analýzou ELISA detekován rozvoj protilátek IgG 1 den před protilátkami IgM (Hsueh *et al.* 2004).

#### 4.2.1 Neutralizační protilátky

Hlavním cílem neutralizačních protilátek při infekci virem SARS-CoV-2 je navázat se na protein S a zabránit tak viru vstoupit přes receptor ACE2 do buňky (Obrázek 4; Iwasaki and Yang 2020). Piccoli *et al.* pomocí magnetických kuliček zjistili, že hlavním cílovým místem neutralizačních protilátek přítomných v plazmě jedinců vyléčených z covidu-19 je doména RBD. Prokázali to tak, že nejprve pomocí neutralizačního testu založeného na pseudotypovaném viru vezikulární stomatitidy (VSV) změřili hladinu neutralizačních protilátek ve 21 vzorcích plazmy. Do těchto vzorků následně přidali kuličky obalené RBD. Ty poté odstranili a provedli další měření, které ukázalo pokles hladiny neutralizačních protilátek v plazmě v průměru o 90 % (Piccoli *et al.* 2020). Princip zmíněného neutralizačního testu spočívá v detekci luminescence v buňkách infikovaných modifikovaným VSV, který má gen G nahrazen reportérovým genem kódujícím luciferázu a do jeho obalu je začleněn protein S viru SARS-CoV-2. Pokud jsou neutralizační protilátky přítomny, nemůže pseudovirus vstoupit do buněk a luminescence není detekovatelná (Nie *et al.* 2020)



Obrázek 4: Neutralizace viru protilátkou. Neutralizační protilátka se váže na protein S viru SARS-CoV-2, čímž brání navázání viru na receptor ACE2 na hostitelské buňce. Převzato a upraveno podle Iwasaki and Yang (2020).

Přítomnost neutralizačních protilátek v plazmě 44 pacientů s covidem-19 byla kvantifikována testem zaměřeným na redukci koncentrace neutralizačních protilátek. Principem toho testu je měření zvýšení virové aktivity v přítomnosti snižujících se neutralizačních protilátek. Redukce spočívá v ředění vzorků sér s protilátkami, které se poté inkubují společně s virem. Zjišťuje se,

jaké ředění protilátek v séru (tzv. titr) ještě úspěšně brání viru ve vstupu do buňky. Přítomnost neutralizačních protilátek zjistili u 40 pacientů po 6 dnech od potvrzení infekce virem SARS-CoV-2 pomocí PCR (Suthar *et al.* 2020).

Souvislost neutralizačních protilátek se závažností covidu-19 byla vyhodnocována neutralizačním testem založeným na pseudotypovaném VSV zmíněném výše a neutralizačním testem přímo se SARS-CovV-2. Oběma testy byla u 19 pacientů s vážným průběhem zjištěna vyšší koncentrace neutralizačních protilátek než u 16 pacientů s mírným průběhem onemocnění. Dokonce byla prokázána korelace mezi hladinou neutralizačních protilátek a hladinou protilátek proti proteinu S stanovenou pomocí metody ELISA (Wang *et al.* 2020b).

#### 4.2.2 Zkřížená reaktivita

Pomocí metody *Western blot* zkoumali Guo *et al.* zkříženou reaktivitu rekombinantního N proteinu (rNP) viru SARS-CoV-2 s protilátkami IgG proti HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-HKU1 a SARS-CoV ve vzorcích lidské plazmy (Guo *et al.* 2020). Přítomnost těchto protilátek ověřovali pomocí metody kompetitivní ELISA (Gao *et al.* 2015), která je založená na kompetiční vazbě imobilizovaného antigenu s protilátkou ve vzorku a s přidanou značenou protilátkou. Zkříženou reakci rNP viru SARS-CoV-2 prokázali pouze u plazmy s protilátkami IgG proti SARS-CoV, nikoli s protilátkami proti jiným HCoV (Guo *et al.* 2020).

V další studii zaměřené na zkříženou reaktivitu protilátek využili Long *et al.* jiné metody. Pomocí magnetické chemiluminiscenční enzymové analýzy detekovali protilátky IgG a IgM v 5 vzorcích sér pacientů s covidem-19. Do vzorků sér přidali magnetické částice nesoucí rekombinantní antigeny N proteinu nebo peptid z S1 podjednotky viru SARS-CoV. Navázané IgG a IgM byly detekovány pomocí chemiluminiscence. U IgG a IgM protilátek v séru pacientů s covidem-19 nezaznamenali žádnou zkříženou reakci s S1 podjednotkou, zatímco s proteinem N ano (Long *et al.* 2020).

#### 4.2.3 Protilátková odpověď na virus SARS-CoV-2 u dětí

U dětských pacientů nakažených virem SARS-CoV-2 může na rozdíl od dospělých dojít k rozvoji závažného zánětlivého multisystémového syndromu (MIS-C), při kterém dochází k poruše funkce orgánů (Whittaker *et al.* 2020). Weisberg *et al.* zkoumali, jak tento syndrom souvisí s protilátkovou odpovědí na SARS-CoV-2 a jak se tato odpověď liší mezi dětmi a dospělými. Vzorky plazmy získali od 19 dospělých pacientů s mírným průběhem, 13 dospělých pacientů s těžkým průběhem covidu-19 s rozvinutým ARDS, 16 dětí

hospitalizovaných s MIS-C syndromem a 31 dětí infikovaných virem SARS-CoV-2 bez MIS-C. K detekci virově specifických protilátek využili metodu ELISA. Zjistili, že hladina N-IgG protilátek u dětí byla výrazně snižena oproti dospělým pacientům, a to nehledě na rozvinutí MIS-C syndromu. U dospělých taktéž nepozorovali rozdíl mezi skupinou s mírným covidem-19 a skupinou s ARDS, z čehož vyplývá, že produkce N-IgG protilátek je závislá na věku, ale nesouvisí s projevy onemocnění covid-19 (Weisberg *et al.* 2021).

### 4.3 Imunitní paměť

Mezi hlavní buňky podílející se na imunitní paměti patří paměťové CD4<sup>+</sup> T buňky, paměťové CD8<sup>+</sup> T buňky a paměťové B buňky. Protože byl vir SARS-CoV-2 objeven teprve před rokem, studie zabývající se imunitní pamětí jsou značně limitované.

Imunitní paměť T buněk studovali Zuo *et al.* na vzorcích odebraných 6 měsíců po prodělání nemoci covid-19. U 90 z 95 pacientů, z nichž ani jeden nebyl v průběhu onemocnění hospitalizován, detekovali metodou ELISPOT odpověď T buněk na alespoň 1 virový protein. Pomocí ICS dále zjistili, že přetrvávající specifická odpověď CD4<sup>+</sup> T buněk na virus SARS-CoV-2 byla dvakrát častější než specifická odpověď CD8<sup>+</sup> T buněk (Zuo *et al.* 2021).

Ve větší studii, do které bylo zahrnuto 188 jedinců od bezpříznakových až po ty s vážným průběhem onemocnění covid-19, byly analyzovány vzorky krve odebrané mezi 6. a 240. dnem od projevení se prvních příznaků (jednorázový odběr u 137 pacientů, opakovaný odběr u 51 pacientů). Po 6 měsících od projevení infekce analyzovali 36 vzorků. V 92 % případů detekovali pomocí AIM virově specifické CD4<sup>+</sup> T buňky a pouze v 50 % případů našli virově specifické CD8<sup>+</sup> T buňky. Shodných 36 vzorků využili i pro detekci paměťových B buněk. PBMC obarvili směsí sond tvořených komplexem biotinylovaných rekombinantních proteinů S, N a RBD a fluorescenčně značeného streptavidinu a takto obarvené buňky analyzovali průtokovou cytometrií. Specifickou odpověď B buněk na S protein detekovali u 24 z nich, přičemž 10–30 % této odpovědi byla zacílena na RBD doménu. Objevili i paměťové B buňky proti N proteinu, přičemž nejvyšší hladinu paměťových B buněk proti oběma proteinům včetně domény RBD detekovali mezi 4. a 5. měsícem od projevení onemocnění a poté se hladina ustálila (Dan *et al.* 2021).

Otázkou, jak dlouho vydrží virově specifické protilátky u pacientů, kteří prodělali covid-19, se zabývali např. Wang *et al.* Pomocí chemiluminiscenční analýzy prokazovali přítomnost IgM a IgG protilátek ve 445 vzorcích sér, které získali od 114 hospitalizovaných pacientů s covidem-19 (z nich 36 s vážným průběhem). Ve třetím týdnu od projevení se prvních příznaků

dekovali nejvíce vzorků s IgM (92 %) a až do osmého týdne se počet vzorků s IgM držel nad 81 %. Poté začal počet vzorků s IgM strmě klesat a ve 12. týdnu od první detekce bylo méně než 30 % testovaných vzorků séropozitivních. Oproti tomu počty vzorků s IgG byly vyšší. Ve druhém týdnu od projevení se prvních příznaků se počet vzorků séropozitivních na IgG dostal nad 96 % a s mírnými výchyly ve 4. a 11. týdnu se od 3. do 13. týdne držel na 100 %. Poté se počet vzorků s IgG postupně snižoval na 75 % séropozitivních vzorků ve 14. týdnu od první detekce (Wang *et al.* 2021).

#### 4.3.1 Srovnání se SARS-CoV a MERS-CoV

U viru SARS-CoV byly prokázány paměťové T buňky i několik let od prodělání onemocnění SARS. Na malé studii o 3 pacientech detekovali pomocí metod ELISPOT a ICS u 1 pacienta  $CD4^+$  T buňky 9 let po prodělání SARS, u 1 pacienta  $CD4^+$  a  $CD8^+$  T buňky 9 let po prodělání SARS a u 1 pacienta  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T buňky po 11 letech po prodělání SARS (Ng *et al.* 2016). Dokonce i po 17 letech od onemocnění SARS byla shodnými metodami detekovatelná odpověď  $CD4^+$  i  $CD8^+$  T buněk na N protein tohoto viru (Le Bert *et al.* 2020).

Pozitivně vyšla i přítomnost neutralizačních protilátek v séru, které byly neutralizačním testem prokázány ve všech vzorcích sér získaných od 10 pacientů 17 let po onemocnění SARS (Tan *et al.* 2020a). Oproti tomu paměťové B buňky nebyly pomocí metody ELISPOT nalezeny ve vzorcích PBMC získaných od 23 jedinců po 6 letech od infekce virem SARS-CoV (Tang *et al.* 2011).

Poznatky o přetrvání imunitní odpovědi na SARS-CoV z 25 studií ukazují, že specifické IgM protilátky se začínají vytrácet mezi 2. a 3. týdnem po vypuknutí infekce a do roka vymizí úplně. Za to specifická odpověď IgG protilátek přetrvává 1-2 roky a teprve poté začíná pomalu klesat (O Murchu *et al.* 2021).

O imunitní paměti na MERS-CoV je známo méně, než je tomu u viru SARS-CoV. Přítomnost neutralizačních protilátek v séru byla mikroneutralizačním testem prokázána u 6 ze 7 pacientů po necelých 3 letech od prodělání onemocnění MERS (konkrétně po 34 měsících). Cílem tohoto testu bylo zjistit, jaké největší zředění séra kompletně ochrání linii Vero buněk před cytopatickým efektem MERS-CoV v alespoň jedné ze tří paralelních jamek na kultivační mikroděstičce (Payne *et al.* 2016). Co se týče přítomnosti T buněk, po 2 letech od infekce virem MERS-CoV byly v PBMC od většiny z 18 jedinců detekovány jak specifické  $CD4^+$  T buňky, tak  $CD8^+$  T buňky reaktivní na proteiny S, M, N a E. Pomocí průtokové cytometrie a markerů CDR45RA a CCR7 zjistili, že  $CD4^+$  byly buňky paměťové ( $CD45RA^-CCR7^+$ ), kdežto mezi

CD8<sup>+</sup> T buňkami byly i buňky efektorové (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>; Zhao *et al.* 2017). Dlouhodobost IgG protilátek byla po 1 rok studována u 11 pacientů s MERS (z toho 5 s vážným průběhem) pomocí metody ELISA. Výrazné ubývání IgG protilátek bylo zaznamenáno během prvních 6 měsíců od projevení onemocnění a během dalších 6 měsíců už k žádnému výraznému poklesu nedošlo (Choe *et al.* 2017).

## 5 Vývoj léčiv a vakcín

Poznatky o imunitních reakcích vyvolaných virem SARS-CoV-2 se využívají při návrhu a vývoji léčiv a vakcín. Jak bylo zmíněno výše, u pacientů ve vážném stavu dochází k nadprodukcí cytokinů IL-1 $\beta$  a IL-6 a dalších, proto je snaha vyvinout léky, které by inhibovaly tyto molekuly nebo alespoň blokovaly jejich účinky. Huet *et al.* zkoumali, zda syntetický peptid anakinra, působící jako antagonist IL-1 receptoru, má pozitivní vliv na průběh covidu-19. Celkově sledovali 96 pacientů hospitalizovaných s covidem-19 a oboustranným zápallem plic, z nichž 52 podávali tento inhibitor. U této skupiny pozorovali zhoršení průběhu nebo smrt ve 25 % případů, kdežto u skupiny, které nebyl inhibitor podáván, v 73 % případů (Huet *et al.* 2020). Účinek monoklonální protilátky tocilizumab namířené proti receptoru IL-6 byl zkoumán na 249 pacientech s covidem-19 a zápallem plic a výsledky byly porovnány se 128 pacienty, kterým bylo podáno placebo. Po podání tocilizumabu se během 28 dní stav pacientů zhoršil nebo došlo ke smrti u méně případů než u pacientů po podání placeba. Když však vyhodnocovali pouze úmrtnost, tak na ni nemělo podání protilátky vliv (Salama *et al.* 2021). Podobných výsledků bylo dosaženo i při podání monoklonální protilátky sarilumab namířené také proti IL-6 receptoru (Della-Torre *et al.* 2020). Použití ani jednoho z těchto léků se neuplatňuje v klinické praxi a vyžaduje další výzkum.

Jednou z využívaných metod léčby covidu-19 je transfúze plazmy od jedinců, kteří covid-19 prodělali a jsou u nich přítomné specifické neutralizační protilátky. Zatímco studie na 228 pacientech (porovnáváno s podáním placeba 105 pacientům), kterým byla podávána plazma s IgG protilátkami, neprokázala žádné změny v klinickém stavu (Simonovich *et al.* 2021), tak u menší studie pozorovali zlepšení stavu u všech 5 kriticky nemocných pacientů s covidem-19 a rozvinutým ARDS (Shen *et al.* 2020). K prokázání účinnosti této terapie je potřeba dalších studií na větším vzorku pacientů.

Mimo léků se výzkum soustředí i na vakcíny proti covidu-19, kterých je vyvíjeno více než 200 (Parker, Shrotri, and Kampmann 2020). Z výše popsaných imunitních reakcí vyplývá, že ideální vakcína by měla indukovat jak specifickou odpověď T buněk, tak protilátkovou

odpověď schopnou neutralizovat virus. Obě tyto imunitní odpovědi byly detekovatelné proti proteinu S, proto všechny již používané vakcíny cílí právě na něj. Sun *et al.* zkoumali, zda by i ostatní strukturní proteiny M, E a N mohly být potenciálním cílem vakcín. Využili k tomu speciálně modifikovaných myší senzitivních na SARS-CoV-2. Nejprve pomocí syntetických peptidů odvozených od všech 4 strukturních proteinů stimulovali imunitní buňky získané z plic nakažených myší a zjistili, že specifické T buňky reagují hlavně na epitopy proteinů N a S. Dále zkoumali pomocí neutralizačního testu protilátkovou odpověď v myších sérech. Zjistili, že jediný protein, který úspěšně vyvolal protilátkovou odpověď, byl protein S (Sun *et al.* 2020b).

Zatím nejvyšší úspěšnost v prevenci covidu-19, 95 %, byla zaznamenána u RNA vakcíny BNT162b2 od firem BioNTech a Pfizer. Z 21 720 jedinců naočkovaných touto vakcínou se minimálně po 7 dnech od druhé dávky potvrdil covid-19 u 8 lidí, zatímco ze skupiny 21 728 lidí, kterým bylo aplikováno placebo, onemocnělo 162 lidí (Polack *et al.* 2020).

Jaké protilátky se vytvoří 3 týdny po první dávce vakcíny BNT162b2 zkoumali Bradley *et al.* u 36 pečovatелů, u kterých byla 30 až 60 dní před vakcinací potvrzena infekce SARS-CoV-2 a u 152 zdravých pečovatелů, u kterých infekce potvrzena nebyla. Pomocí multiplexové kuličkové analýzy měřili hladiny IgG proti S1 a S2 podjednotce, doméně RBD a proteinu N. Zjistili, že u lidí, kteří covid-19 prodělali, je vyšší hladina protilátek reagujících s podjednotkami S1, S2 a doménou RBD než u lidí nevystavených SARS-CoV-2 (Bradley *et al.* 2021). Dokonce bylo zjištěno, že u 100 lidí, kteří v minulosti covid-19 prodělali, byla hladina neutralizačních protilátek 10 dní po první dávce vakcíny vyšší než 10 dní po druhé dávce u 62 lidí nevystavených SARS-CoV-2 (Anichini *et al.* 2021).

Pomocí metody ELISPOT Sahin *et al.* zjišťovali, zda po vakcinaci dochází k indukci odpovědi T buněk. U 40 ze 42 pacientů po druhé dávce vakcíny BNT162b1 detekovali odpověď CD4<sup>+</sup> T buněk na RBD doménu a u 32 i odpověď CD8<sup>+</sup> T buněk (Sahin *et al.* 2020).

## 6 Závěr

Získání poznatků o imunitních reakcích vyvolaných virem SARS-CoV-2 by nebylo možné bez vhodných detekčních metod. Pro aktivaci protivirové odpovědi *in vitro* se nejčastěji využívají syntetické peptidy odvozené od proteinů SARS-CoV-2. Detekce jednotlivých imunitních buněk, jejich fenotypování, počítání a třídění se provádí pomocí průtokové cytometrie. Koncentrace sekretovaných cytokinů, chemokinů a protilátek se zjišťuje zejména metodou ELISA. Pro detekci velkého množství cytokinů a chemokinů najednou se používá multiplexová kuličková analýza. Ke zjištění přítomnosti neutralizačních protilátek se využívají neutralizační testy. Ke kvantifikaci paměťových T a B lymfocytů je možné využít kromě průtokové cytometrie také ELISPOT.

V časně fázi infekce brání proteiny SARS-CoV-2 produkci interferonů, cytokinů důležitých pro antivirovou obranu. Zároveň dochází k produkci prozánětlivých cytokinů, jejichž nadprodukce souvisí s rozvojem cytokinové bouře, která je asociována s horším průběhem covidu-19. Při této infekci dochází také k redukci NK buněk podílejících se na odstraňování poškozených infikovaných buněk. Později značná část proteinů SARS-CoV-2 aktivuje specifické T buňky. Pokud je těchto buněk aktivováno málo, průběh covidu-19 je závažnější. Slabá odpověď specifických T buněk je silně asociována s vyšším věkem, proto je třeba zvláště starší osoby chránit před možnou nákazou virem SARS-CoV-2. U pacientů s mírným průběhem onemocnění dochází k slabší odpovědi neutralizačních protilátek než u pacientů s vážným průběhem.

Ačkoli o vlivu imunitních reakcí na závažnost onemocnění bylo zjištěno mnohé, tak podle mého názoru pracovali mnohé ze studií s malým a nereprezentativním vzorkem pacientů a bylo by dobré v budoucích studiích zahrnout větší počet pacientů s různými charakteristikami.

Z dosud zjištěných informací o imunitní paměti buněk na SARS-CoV-2 vyplývá, že již po 6 měsících od prodělání infekce není u některých jedinců detekovatelná přítomnost specifických T buněk. Během 3 měsíců od infekce klesá i množství specifických protilátek. To naznačuje, že po prodělání covidu-19 a možná ani po vakcinaci nedojde k doživotní imunitě. Navíc na nové varianty viru SARS-CoV-2 nemusí v současnosti vyvíjené vakcíny fungovat. Proto by studium imunitní paměti a vlivu variant na účinnost vakcín mělo být klíčovým bodem dalšího výzkumu, aby bylo možné vyvíjet co nejúčinnější vakcíny a ochránit tak co nejvíce lidí před nebezpečnou infekcí.

## 7 Seznam použité literatury

Přehledové články označeny \*

- \*Amor, S., L. Fernández Blanco, and D. Baker. 2020. “Innate Immunity during SARS-CoV-2: Evasion Strategies and Activation Trigger Hypoxia and Vascular Damage.” *Clinical & Experimental Immunology* 202 (2): 193–209.
- Anichini, Gabriele, Chiara Terrosi, Claudia Gandolfo, Gianni Gori Savellini, Simonetta Fabrizi, Giovanni B Miceli, and M Grazia Cusi. 2021. “SARS-CoV-2 Antibody Response in Persons with Past Natural Infection.” *The New England Journal of Medicine*, April, NEJMc2103825.
- Antin, JH, and JL Ferrara. 1992. “Cytokine Dysregulation and Acute Graft-versus-Host Disease.” *Blood* 80 (12): 2964–68.
- Bert, Nina Le, Anthony T. Tan, Kamini Kunasegaran, Christine Y.L. Tham, Morteza Hafezi, Adeline Chia, Melissa Hui Yen Chng, *et al.* 2020. “SARS-CoV-2-Specific T Cell Immunity in Cases of COVID-19 and SARS, and Uninfected Controls.” *Nature* 584 (7821): 457–62.
- Besnard, Anne Gaele, Robert Sabat, Laure Dumoutier, Jean Christophe Renauld, Monique Willart, Bart Lambrecht, Mauro M. Teixeira, *et al.* 2011. “Dual Role of IL-22 in Allergic Airway Inflammation and Its Cross-Talk with IL-17A.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183 (9): 1153–63.
- Blanco-Melo, Daniel, Benjamin E. Nilsson-Payant, Wen Chun Liu, Skyler Uhl, Daisy Hoagland, Rasmus Møller, Tristan X. Jordan, *et al.* 2020. “Imbalanced Host Response to SARS-CoV-2 Drives Development of COVID-19.” *Cell* 181 (5): 1036-1045.e9.
- Bradley, Todd, Elin Grundberg, Rangaraj Selvarangan, Cas LeMaster, Elizabeth Fraley, Dithi Banerjee, Bradley Belden, *et al.* 2021. “Antibody Responses after a Single Dose of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine.” *New England Journal of Medicine*, March, NEJMc2102051.
- Braun, Julian, Lucie Loyal, Marco Frentsch, Daniel Wendisch, Philipp Georg, Florian Kurth, Stefan Hippenstiel, *et al.* 2020. “SARS-CoV-2-Reactive T Cells in Healthy Donors and Patients with COVID-19.” *Nature* 587 (7833): 270–74.
- Chan, Jasper Fuk-Woo, Kin-Hang Kok, Zheng Zhu, Hin Chu, Kelvin Kai-Wang To, Shuofeng Yuan, and Kwok-Yung Yuen. 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): 221–36.
- Chen, Nanshan, Min Zhou, Xuan Dong, Jieming Qu, Fengyun Gong, Yang Han, Yang Qiu, *et al.* 2020. “Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study.” *The Lancet* 395 (10223): 507–13.
- Choe, Pyoeng Gyun, R. A.P.M. Perera, Wan Beom Park, Kyoung Ho Song, Ji Hwan Bang, Eu Suk Kim, Hong Bin Kim, *et al.* 2017. “MERS-CoV Antibody Responses 1 Year after Symptom Onset, South Korea, 2015.” *Emerging Infectious Diseases* 23 (7): 1079–84.
- Choudhury, Abhigyan, and Suprabhat Mukherjee. 2020. “In Silico Studies on the Comparative Characterization of the Interactions of SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein with ACE-2 Receptor Homologs and Human TLRs.” *Journal of Medical Virology* 92 (10): 2105–13.



- Chu, Hin, Jasper Fuk-Woo Chan, Yixin Wang, Terrence Tsz-Tai Yuen, Yue Chai, Yuxin Hou, Huiping Shuai, *et al.* 2020. “Comparative Replication and Immune Activation Profiles of SARS-CoV-2 and SARS-CoV in Human Lungs: An Ex Vivo Study With Implications for the Pathogenesis of COVID-19.” *Clinical Infectious Diseases* 71 (6): 1400–1409.
- Czerkinsky, Cecil C., Lars Åke Nilsson, Håkan Nygren, Örjan Ouchterlony, and Andrej Tarkowski. 1983. “A Solid-Phase Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) Assay for Enumeration of Specific Antibody-Secreting Cells.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 109–21.
- Dan, Jennifer M., Jose Mateus, Yu Kato, Kathryn M. Hastie, Esther Dawen Yu, Caterina E. Faliti, Alba Grifoni, *et al.* 2021. “Immunological Memory to SARS-CoV-2 Assessed for up to 8 Months after Infection.” *Science* 371 (6529): eabf4063.
- Della-Torre, Emanuel, Corrado Campochiaro, Giulio Cavalli, Giacomo De Luca, Angela Napolitano, Salvatore La Marca, Nicola Boffini, *et al.* 2020. “Interleukin-6 Blockade with Sarilumab in Severe COVID-19 Pneumonia with Systemic Hyperinflammation: An Open-Label Cohort Study.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 79 (10): 1277–85.
- \*Du, Lanying, Yuxian He, Yusen Zhou, Shuwen Liu, Bo Jian Zheng, and Shibo Jiang. 2009. “The Spike Protein of SARS-CoV - A Target for Vaccine and Therapeutic Development.” *Nature Reviews Microbiology* 7 (3): 226–36.
- \*Flaxman, Amy, and Katie Ewer. 2018. “Methods for Measuring T-Cell Memory to Vaccination: From Mouse to Man.” *Vaccines* 6 (3): 43.
- Galani, Ioanna Evdokia, Nikoletta Rovina, Vicky Lampropoulou, Vasiliki Triantafyllia, Maria Manioudaki, Eleftherios Pavlos, Evangelia Koukaki, *et al.* 2021. “Untuned Antiviral Immunity in COVID-19 Revealed by Temporal Type I/III Interferon Patterns and Flu Comparison.” *Nature Immunology* 22 (1): 32–40.
- Gao, Xin, Hongli Zhou, Chao Wu, Yan Xiao, Lili Ren, Gláucia Paranhos-Baccalà, Li Guo, and Jianwei Wang. 2015. “Antibody against Nucleocapsid Protein Predicts Susceptibility to Human Coronavirus Infection.” *Journal of Infection* 71 (5): 559–602.
- Gao, Yan, Liming Yan, Yucen Huang, Fengjiang Liu, Yao Zhao, Lin Cao, Tao Wang, *et al.* 2020. “Structure of the RNA-Dependent RNA Polymerase from COVID-19 Virus.” *Science* 368 (6492): 779–82.
- Gerdes, Johannes, Ulrich Schwab, Hilmar Lemke, and Harald Stein. 1983. “Production of a Mouse Monoclonal Antibody Reactive with a Human Nuclear Antigen Associated with Cell Proliferation.” *International Journal of Cancer* 31 (1): 13–20.
- Gidlund, Magnus, Anders Örn, Hans Wigzell, Anna Senik, and Ion Gresser. 1978. “Enhanced NK Cell Activity in Mice Injected with Interferon and Interferon Inducers.” *Nature* 273 (5665): 759–61.
- Grifoni, Alba, Daniela Weiskopf, Sydney I. Ramirez, Jose Mateus, Jennifer M. Dan, Carolyn Rydzynski Moderbacher, Stephen A. Rawlings, *et al.* 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.e15.
- Guan, Wei-jie, Zheng-yi Ni, Yu Hu, Wen-hua Liang, Chun-quan Ou, Jian-xing He, Lei Liu, *et al.* 2020. “Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China.” *New England Journal of Medicine* 382 (18): 1708–20.

- Guo, Li, Lili Ren, Siyuan Yang, Meng Xiao, De Chang, Fan Yang, Charles S Dela Cruz, *et al.* 2020. “Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19).” *Clinical Infectious Diseases* 71 (15): 778–85.
- Gupta, Sheena, and Holden Maecker. 2015. “Intracellular Cytokine Staining (ICS) on Human Lymphocytes or Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs).” *Bio-protocol* 5 (7).
- Hadjadj, Jérôme, Nader Yatim, Laura Barnabei, Aurélien Corneau, Jeremy Boussier, Nikaïa Smith, Hélène Péré, *et al.* 2020. “Impaired Type I Interferon Activity and Inflammatory Responses in Severe COVID-19 Patients.” *Science* 369 (6504): 718–24.
- Hashem, Anwar M., Abdullah Algaissi, Sarah A. Almahboub, Mohamed A. Alfaleh, Turki S. Abujamel, Sawsan S. Alamri, Khalid A. Alluhaybi, *et al.* 2020. “Early Humoral Response Correlates with Disease Severity and Outcomes in COVID-19 Patients.” *Viruses* 12 (12): 1390.
- Havenar-Daughton, Colin, Samantha M. Reiss, Diane G. Carnathan, Jennifer E. Wu, Kayla Kendric, Alba Torrents de la Peña, Sudhir Pai Kasturi, *et al.* 2016. “Cytokine-Independent Detection of Antigen-Specific Germinal Center T Follicular Helper Cells in Immunized Nonhuman Primates Using a Live Cell Activation-Induced Marker Technique.” *The Journal of Immunology* 197 (3): 994–1002.
- He, Wan Ting, Haoqiang Wan, Lichen Hu, Pengda Chen, Xin Wang, Zhe Huang, Zhang Hua Yang, Chuan Qi Zhong, and Jiahuai Han. 2015. “Gasdermin D Is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1 $\beta$  Secretion.” *Cell Research* 25 (12): 1285–98.
- Heil, Florian, Hiroaki Hemmi, Hubertus Hochrein, Franziska Ampenberger, Carsten Kirschning, Shizuo Akira, Grayson Lipford, Hermann Wagner, and Stefan Bauer. 2004. “Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNA via Toll-like Receptor 7 and 8.” *Science* 303 (5663): 1526–29.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, *et al.* 2020. “SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor.” *Cell* 181 (2): 271–80.
- Honda, Kenya, Hideyuki Yanai, Hideo Negishi, Masataka Asagiri, Mitsuharu Sato, Tatsuaki Mizutani, Naoya Shimada, *et al.* 2005. “IRF-7 Is the Master Regulator of Type-I Interferon-Dependent Immune Responses.” *Nature* 434 (7034): 772–77.
- Hsueh, P.-R., L.-M. Huang, P.-J. Chen, C.-L. Kao, and P.-C. Yang. 2004. “Chronological Evolution of IgM, IgA, IgG and Neutralisation Antibodies after Infection with SARS-Associated Coronavirus.” *Clinical Microbiology and Infection* 10 (12): 1062–66.
- Huang, Chaolin, Yeming Wang, Xingwang Li, Lili Ren, Jianping Zhao, Yi Hu, Li Zhang, *et al.* 2020. “Clinical Features of Patients Infected with 2019 Novel Coronavirus in Wuhan, China.” *The Lancet* 395 (10223): 497–506.
- Huang, Kao-Jean, Ih-Jen Su, Michel Theron, Yi-Chun Wu, Shu-Kuan Lai, Ching-Chuan Liu, and Huan-Yao Lei. 2005. “An Interferon- $\gamma$ -Related Cytokine Storm in SARS Patients.” *Journal of Medical Virology* 75 (2): 185–94.
- Huet, Thomas, Hélène Beaussier, Olivier Voisin, Stéphane Jouveshomme, Gaëlle Dauriat, Isabelle Lazareth, Emmanuelle Sacco, *et al.* 2020. “Anakinra for Severe Forms of COVID-19: A Cohort Study.” *The Lancet Rheumatology* 2 (7): e393–400.

- Isaacs, A, and J Lindenmann. 1957. "Virus Interference. I. The Interferon." *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 147 (927): 258–67.
- \*Iwasaki, Akiko, and Yexin Yang. 2020. "The Potential Danger of Suboptimal Antibody Responses in COVID-19." *Nature Reviews Immunology* 20 (6): 339-41.
- Jacobs, Roland, Gabriele Hintzen, Almut Kemper, Katrin Beul, Sandra Kempf, Georg Behrens, Karl Walter Sykora, and Reinhold E. Schmidt. 2001. "CD56bright Cells Differ in Their KIR Repertoire and Cytotoxic Features from CD56dim NK Cells." *European Journal of Immunology* 31 (10): 3121–27.
- Kim, Na-Eun, Dae-Kyum Kim, and Yoon-Jae Song. 2021. "SARS-CoV-2 Nonstructural Proteins 1 and 13 Suppress Caspase-1 and the NLRP3 Inflammasome Activation." *Microorganisms* 9 (3): 494.
- Ksiazek, Thomas G., Dean Erdman, Cynthia S. Goldsmith, Sherif R. Zaki, Teresa Peret, Shannon Emery, Suxiang Tong, *et al.* 2003. "A Novel Coronavirus Associated with Severe Acute Respiratory Syndrome." *New England Journal of Medicine* 348 (20): 1953-66.
- Lauer, Stephen A., Kyra H. Grantz, Qifang Bi, Forrest K. Jones, Qulu Zheng, Hannah R. Meredith, Andrew S. Azman, Nicholas G. Reich, and Justin Lessler. 2020. "The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (CoVID-19) from Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application." *Annals of Internal Medicine* 172 (9): 577–82.
- \*Lazear, Helen M., John W. Schoggins, and Michael S. Diamond. 2019. "Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons." *Immunity* 50 (4): 907-23.
- Lee, Chloe H., Mariana Pereira Pinho, Paul R. Buckley, Isaac B. Woodhouse, Graham Ogg, Alison Simmons, Giorgio Napolitani, and Hashem Koohy. 2020. "Potential CD8<sup>+</sup> T Cell Cross-Reactivity Against SARS-CoV-2 Conferred by Other Coronavirus Strains." *Frontiers in Immunology* 11: 2878.
- Liu, Jun, Hong Ji, Wei Zheng, Xie Wu, Janet J. Zhu, Arthur P. Arnold, and Kathryn Sandberg. 2010. "Sex Differences in Renal Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Activity Are 17 $\beta$ -Oestradiol-Dependent and Sex Chromosome-Independent." *Biology of Sex Differences* 1 (1): 1–11.
- Long, Quan Xin, Bai Zhong Liu, Hai Jun Deng, Gui Cheng Wu, Kun Deng, Yao Kai Chen, Pu Liao, *et al.* 2020. "Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients with COVID-19." *Nature Medicine* 26 (6): 845–48.
- Lu, Roujian, Xiang Zhao, Juan Li, Peihua Niu, Bo Yang, Honglong Wu, Wenling Wang, *et al.* 2020. "Genomic Characterisation and Epidemiology of 2019 Novel Coronavirus: Implications for Virus Origins and Receptor Binding." *The Lancet* 395 (10224): 565-74.
- \*Masters, Paul S., and Stanley Perlman. 2013. "Fields Virology-Coronaviridae." In: *Fields Virology*. 6th ed. Philadelphia, 825-858. ISBN: 978-1-4511-0563-6
- Mateus, Jose, Alba Grifoni, Alison Tarke, John Sidney, Sydney I. Ramirez, Jennifer M. Dan, Zoe C. Burger, *et al.* 2020. "Selective and Cross-Reactive SARS-CoV-2 T Cell Epitopes in Unexposed Humans." *Science* 370 (6512): 89–94.
- Meckiff, Benjamin J., Ciro Ramírez-Suástegui, Vicente Fajardo, Serena J. Chee, Anthony Kusnadi, Hayley Simon, Simon Eschweiler, *et al.* 2020. "Imbalance of Regulatory and Cytotoxic SARS-CoV-2-Reactive CD4<sup>+</sup> T Cells in COVID-19." *Cell* 183 (5): 1340-



- 19) in Wuhan, China.” *Clinical Infectious Diseases* 71 (15): 762–68.
- Qu, Jiuxin, Chi Wu, Xiaoyong Li, Guobin Zhang, Zhaofang Jiang, Xiaohe Li, Qing Zhu, and Lei Liu. 2020. “Profile of Immunoglobulin G and IgM Antibodies Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2).” *Clinical Infectious Diseases* 71 (16): 2255–58.
- Ranieri, V. Marco, Gordon D. Rubinfeld, B. Taylor Thompson, Niall D. Ferguson, Ellen Caldwell, Eddy Fan, Luigi Camporota, and Arthur S. Slutsky. 2012. “Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition.” *Journal of the American Medical Association* 307 (23): 2526–33.
- Resch, K., and H. Fischer. 1971. “Cell-Mediated Immune Reactions in Vitro: Cytotoxicity of Lymphocytes Activated by Phytohemagglutinin and Anti-Immunoglobulin Serum.” *European Journal of Immunology* 1 (4): 271–75.
- Rodrigues, Tamara S., Keyla S.G. de Sá, Adriene Y. Ishimoto, Amanda Becerra, Samuel Oliveira, Leticia Almeida, Augusto V. Gonçalves, *et al.* 2020. “Inflammasomes Are Activated in Response to SARS-Cov-2 Infection and Are Associated with COVID-19 Severity in Patients.” *Journal of Experimental Medicine* 218 (3): e20201707.
- Rydzynski Moderbacher, Carolyn, Sydney I. Ramirez, Jennifer M. Dan, Alba Grifoni, Kathryn M. Hastie, Daniela Weiskopf, Simon Belanger, *et al.* 2020. “Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity.” *Cell* 183 (4): 996-1012.e19.
- Sahin, Ugur, Alexander Muik, Evelyn Derhovanessian, Isabel Vogler, Lena M. Kranz, Mathias Vormehr, Alina Baum, *et al.* 2020. “COVID-19 Vaccine BNT162b1 Elicits Human Antibody and TH1 T Cell Responses.” *Nature* 586 (7830): 594–99.
- Salama, Carlos, Jian Han, Linda Yau, William G. Reiss, Benjamin Kramer, Jeffrey D. Neidhart, Gerard J. Criner, *et al.* 2021. “Tocilizumab in Patients Hospitalized with Covid-19 Pneumonia.” *New England Journal of Medicine* 384 (1): 20–30.
- Sama, Iziah E, Alice Ravera, Bernadet T Santema, Harry van Goor, Jozine M ter Maaten, John G F Cleland, Michiel Rienstra, *et al.* 2020. “Circulating Plasma Concentrations of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Men and Women with Heart Failure and Effects of Renin–Angiotensin–Aldosterone Inhibitors.” *European Heart Journal* 41 (19): 1810–17.
- Schaerli, Patrick, Katharina Willimann, Alois B. Lang, Martin Lipp, Pius Loetscher, and Bernhard Moser. 2000. “CXC Chemokine Receptor 5 Expression Defines Follicular Homing T Cells with B Cell Helper Function.” *Journal of Experimental Medicine* 192 (11): 1553–62.
- Sekine, Takuya, André Perez-Potti, Olga Rivera-Ballesteros, Kristoffer Strålin, Jean Baptiste Gorin, Annika Olsson, Sian Llewellyn-Lacey, *et al.* 2020. “Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19.” *Cell* 183 (1): 158-168.e14.
- Shen, Chenguang, Zhaoqin Wang, Fang Zhao, Yang Yang, Jinxiu Li, Jing Yuan, Fuxiang Wang, *et al.* 2020. “Treatment of 5 Critically Ill Patients with COVID-19 with Convalescent Plasma.” *Journal of the American Medical Association* 323 (16): 1582–89.
- Shi, Shaobo, Mu Qin, Bo Shen, Yuli Cai, Tao Liu, Fan Yang, Wei Gong, *et al.* 2020. “Association of Cardiac Injury with Mortality in Hospitalized Patients with COVID-19 in

- Wuhan, China.” *JAMA Cardiology* 5 (7): 802–10.
- Simonian, Philip L., Fabian Wehrmann, Christina L. Roark, Willi K. Born, Rebecca L. O’Brien, and Andrew P. Fontenot. 2010. “T $\delta$  T Cells Protect against Lung Fibrosis via IL-22.” *Journal of Experimental Medicine* 207 (10): 2239–53.
- Simonovich, Ventura A., Leandro D. Burgos Pratz, Paula Scibona, María V. Beruto, Marcelo G. Vallone, Carolina Vázquez, Nadia Savoy, *et al.* 2021. “A Randomized Trial of Convalescent Plasma in Covid-19 Severe Pneumonia.” *New England Journal of Medicine* 384 (7): 619–29.
- Sun, Baoqing, Ying Feng, Xiaoneng Mo, Peiyan Zheng, Qian Wang, Pingchao Li, Ping Peng, *et al.* 2020a. “Kinetics of SARS-CoV-2 Specific IgM and IgG Responses in COVID-19 Patients.” *Emerging Microbes and Infections* 9 (1): 940–48.
- Sun, Jing, Zhen Zhuang, Jian Zheng, Kun Li, Roy Lok Yin Wong, Donglan Liu, Jicheng Huang, *et al.* 2020b. “Generation of a Broadly Useful Model for COVID-19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment.” *Cell* 182 (3): 734-743.e5.
- Suthar, Mehul S., Matthew G. Zimmerman, Robert C. Kauffman, Grace Mantus, Susanne L. Linderman, William H. Hudson, Abigail Vanderheiden, *et al.* 2020. “Rapid Generation of Neutralizing Antibody Responses in COVID-19 Patients.” *Cell Reports Medicine* 1 (3): 100040.
- Tan, Anthony T., Martin Linster, Chee Wah Tan, Nina Le Bert, Wan Ni Chia, Kamini Kunasegaran, Yan Zhuang, *et al.* 2021. “Early Induction of Functional SARS-CoV-2-Specific T Cells Associates with Rapid Viral Clearance and Mild Disease in COVID-19 Patients.” *Cell Reports* 34 (6): 108728.
- Tan, Chee Wah, Wan Ni Chia, Xijian Qin, Pei Liu, Mark I.C. Chen, Charles Tiu, Zhiliang Hu, *et al.* 2020a. “A SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Based on Antibody-Mediated Blockage of ACE2–Spike Protein–Protein Interaction.” *Nature Biotechnology* 38 (9): 1073–78.
- Tan, Li, Qi Wang, Duanyang Zhang, Jinya Ding, Qianchuan Huang, Yi Quan Tang, Qiongshu Wang, and Hongming Miao. 2020b. “Lymphopenia Predicts Disease Severity of COVID-19: A Descriptive and Predictive Study.” *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5 (1): 33.
- Tang, Fang, Yan Quan, Zhong-Tao Xin, Jens Wrasmert, Mai-Juan Ma, Hui Lv, Tian-Bao Wang, *et al.* 2011. “Lack of Peripheral Memory B Cell Responses in Recovered Patients with Severe Acute Respiratory Syndrome: A Six-Year Follow-Up Study.” *The Journal of Immunology* 186 (12): 7264–68.
- Tarke, Alison, John Sidney, Conner K. Kidd, Jennifer M. Dan, Sydney I. Ramirez, Esther Dawen Yu, Jose Mateus, *et al.* 2021. “Comprehensive Analysis of T Cell Immunodominance and Immunoprevalence of SARS-CoV-2 Epitopes in COVID-19 Cases.” *Cell Reports Medicine* 2 (2): 100204.
- Trivedi, Suvang, Congrong Miao, Mohammad M. Al-Abdallat, Aktham Haddadin, Sultan Alqasrawi, Ibrahim Iblan, Mohannad A. Nsour, *et al.* 2018. “Inclusion of MERS-Spike Protein ELISA in Algorithm to Determine Serologic Evidence of MERS-CoV Infection.” *Journal of Medical Virology* 90 (2): 367–71.
- Tyrrell, D. A.J., and M. L. Bynoe. 1965. “Cultivation of a Novel Type of Common-Cold Virus

- in Organ Cultures.” *British Medical Journal* 1 (5448): 1467-70.
- Vitale, Marco, Alessandra Bassini, Paola Secchiero, Prisco Mirandola, Cristina Ponti, Loris Zamai, Adriana R. Mariani, Mirella Falconi, and Giacomo Azzali. 2002. “NK-Active Cytokines IL-2, IL-12, and IL-15 Selectively Modulate Specific Protein Kinase C (PKC) Isoforms in Primary Human NK Cells.” *The Anatomical Record* 266 (2): 87–92.
- Wang, Dawei, Bo Hu, Chang Hu, Fangfang Zhu, Xing Liu, Jing Zhang, Binbin Wang, *et al.* 2020a. “Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China.” *Journal of the American Medical Association* 323 (11): 1061–69.
- Wang, Pengfei, Lihong Liu, Manoj S. Nair, Michael T. Yin, Yang Luo, Qian Wang, Ting Yuan, *et al.* 2020b. “SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Responses Are More Robust in Patients with Severe Disease.” *Emerging Microbes and Infections* 9 (1): 2091-93.
- Wang, Yanan, Jingjing Li, Huijun Li, Ping Lei, Guanxin Shen, and Chunguang Yang. 2021. “Persistence of SARS-CoV-2-Specific Antibodies in COVID-19 Patients.” *International Immunopharmacology* 90: 107271.
- Wang, Yanqun, Lu Zhang, Ling Sang, Feng Ye, Shicong Ruan, Bei Zhong, Tie Song, *et al.* 2020c. “Kinetics of Viral Load and Antibody Response in Relation to COVID-19 Severity.” *Journal of Clinical Investigation* 130 (10): 5235–44.
- Weisberg, Stuart P., Thomas J. Connors, Yun Zhu, Matthew R. Baldwin, Wen Hsuan Lin, Sandeep Wontakal, Peter A. Szabo, *et al.* 2021. “Distinct Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Children and Adults across the COVID-19 Clinical Spectrum.” *Nature Immunology* 22 (1): 25–31.
- Whittaker, Elizabeth, Alasdair Bamford, Julia Kenny, Myrsini Kaforou, Christine E. Jones, Priyen Shah, Padmanabhan Ramnarayan, *et al.* 2020. “Clinical Characteristics of 58 Children with a Pediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporally Associated with SARS-CoV-2.” *Journal of the American Medical Association* 324 (3): 259–69.
- Wilk, Aaron J., Arjun Rustagi, Nancy Q. Zhao, Jonasel Roque, Giovanny J. Martínez-Colón, Julia L. McKechnie, Geoffrey T. Ivison, *et al.* 2020. “A Single-Cell Atlas of the Peripheral Immune Response in Patients with Severe COVID-19.” *Nature Medicine* 26 (7): 1070–76.
- Wu, Chaomin, Xiaoyan Chen, Yanping Cai, Jia’an Xia, Xing Zhou, Sha Xu, Hanping Huang, *et al.* 2020. “Risk Factors Associated With Acute Respiratory Distress Syndrome and Death in Patients With Coronavirus Disease 2019 Pneumonia in Wuhan, China.” *JAMA Internal Medicine* 180 (7): 934.
- Xia, Shuai, Yun Zhu, Meiqin Liu, Qiaoshuai Lan, Wei Xu, Yanling Wu, Tianlei Ying, *et al.* 2020. “Fusion Mechanism of 2019-NCoV and Fusion Inhibitors Targeting HR1 Domain in Spike Protein.” *Cellular & Molecular Immunology* 17 (7): 765-67.
- Xie, Jianfeng, Zhaohui Tong, Xiangdong Guan, Bin Du, and Haibo Qiu. 2020. “Clinical Characteristics of Patients Who Died of Coronavirus Disease 2019 in China.” *JAMA Network Open* 3 (4): e205619.
- Xu, Huanzhou, Siddhi A. Chitre, Ibukun A. Akinyemi, Julia C. Loeb, John A. Lednicky, Michael T. McIntosh, and Sumita Bhaduri-McIntosh. 2020. “SARS-CoV-2 Viroporin Triggers the NLRP3 Inflammatory Pathway.” *BioRxiv*. DOI: 10.1101/2020.10.27.357731

- Yin, Xin, Laura Riva, Yuan Pu, Laura Martin-Sancho, Jun Kanamune, Yuki Yamamoto, Kouji Sakai, *et al.* 2021. “MDA5 Governs the Innate Immune Response to SARS-CoV-2 in Lung Epithelial Cells.” *Cell Reports* 34 (2): 108628.
- Young, Barnaby E., Siew Wai Fong, Yi Hao Chan, Tze Minn Mak, Li Wei Ang, Danielle E. Anderson, Cheryl Yi Pin Lee, *et al.* 2020. “Effects of a Major Deletion in the SARS-CoV-2 Genome on the Severity of Infection and the Inflammatory Response: An Observational Cohort Study.” *The Lancet* 396 (10251): 603–11.
- Yuen, Chun Kit, Joy Yan Lam, Wan Man Wong, Long Fung Mak, Xiaohui Wang, Hin Chu, Jian Piao Cai, *et al.* 2020. “SARS-CoV-2 Nsp13, Nsp14, Nsp15 and Orf6 Function as Potent Interferon Antagonists.” *Emerging Microbes and Infections* 9 (1): 1418–28.
- Zaki, Ali M., Sander van Boheemen, Theo M. Bestebroer, Albert D.M.E. Osterhaus, and Ron A.M. Fouchier. 2012. “Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia.” *New England Journal of Medicine* 367 (19): 1814-20.
- Zhang, Yiwen, Junsong Zhang, Yingshi Chen, Baohong Luo, Yaochang Yuan, Feng Huang, Tao Yang, *et al.* 2020. “The ORF8 Protein of SARS-CoV-2 Mediates Immune Evasion through Potently Downregulating MHC-I.” *BioRxiv*. DOI: 10.1101/2020.05.24.111823
- Zhao, Jingxian, Abeer N. Alshukairi, Salim A. Baharoon, Waleed A. Ahmed, Ahmad A. Bokhari, Atef M. Nehdi, Laila A. Layqah, *et al.* 2017. “Recovery from the Middle East Respiratory Syndrome Is Associated with Antibody and T Cell Responses.” *Science Immunology* 2 (14): 5393.
- Zheng, Meijuan, Yong Gao, Gang Wang, Guobin Song, Siyu Liu, Dandan Sun, Yuanhong Xu, and Zhigang Tian. 2020. “Functional Exhaustion of Antiviral Lymphocytes in COVID-19 Patients.” *Cellular and Molecular Immunology* 17 (5): 533-35.
- Zhou, Fei, Ting Yu, Ronghui Du, Guohui Fan, Ying Liu, Zhibo Liu, Jie Xiang, *et al.* 2020. “Clinical Course and Risk Factors for Mortality of Adult Inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Cohort Study.” *The Lancet* 395 (10229): 1054–62.
- Zhu, Na, Dingyu Zhang, Wenling Wang, Xingwang Li, Bo Yang, Jingdong Song, Xiang Zhao, *et al.* 2020a. “A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019.” *New England Journal of Medicine* 382 (8): 727-33.
- Zhu, Zhe, Ting Cai, Lingyan Fan, Kehong Lou, Xin Hua, Zuoan Huang, and Guosheng Gao. 2020b. “Clinical Value of Immune-Inflammatory Parameters to Assess the Severity of Coronavirus Disease 2019.” *International Journal of Infectious Diseases* 95: 332–39.
- Zuo, Jianmin, Alexander C. Dowell, Hayden Pearce, Kriti Verma, Heather M. Long, Jusnara Begum, Felicity Aiano, *et al.* 2021. “Robust SARS-CoV-2-Specific T Cell Immunity Is Maintained at 6 Months Following Primary Infection.” *Nature Immunology* 22: 620–26.