

Citováno podle (1)

 [sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004222017515](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004222017515)

 [Zobrazit PDF](#)

Svazek 25, vydání 12 , 22. prosince 2022 ,
105479

iScience



Článek

Rozšířená posilovací vakcinace SARS-CoV-2 RBD indukuje humorální a buněčnou imunitní toleranci u myši

Pod licencí Creative Commons

Otevřený přístup

Zvýraznění

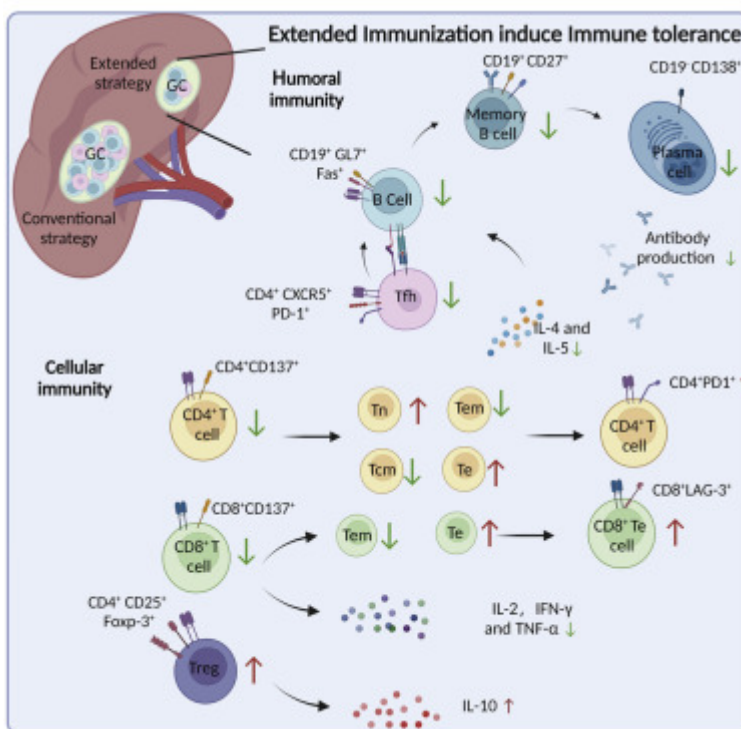
- Prodloužená imunizace narušila sérovou neutralizační aktivitu
- Prodloužená imunizace potlačila tvorbu zárodečných center
- Prodloužená imunizace inhibovala aktivaci CD8⁺ T buněk

souhrn

Opakované aplikace boosterů vakcín byly vzneseny tváří v tvář neustálému výskytu variant SARS-CoV-2 s neutralizačními únikovými mutacemi, ale jejich ochranná účinnost a potenciální nežádoucí účinky zůstávají do značné míry neznámé. Zde jsme

porovnali humorální a buněčné imunitní odpovědi prodlouženého průběhu posilovačů vakcíny s rekombinantní receptorovou vazebnou doménou (RBD) s těmi z konvenční imunizační strategie na myším modelu Balb/c. Vícenásobné boostery vakcíny po konvenční vakcinaci významně snížily titry RBD-specifických protilátek a sérovou neutralizační účinnost proti variantám Delta a Omicron a hluboce zhoršily $CD4^+$ a $CD8^+$ Aktivace T buněk a zvýšená exprese PD-1 a LAG-3 v těchto T buňkách. Mechanicky jsme potvrdili, že prodloužená vakcinace posilovači RBD převrátila ochranné imunitní vzpomínky podporou adaptivní imunitní tolerance. Naše zjištění prokazují potenciální rizika při neustálém používání posilovačů vakcín proti SARS-CoV-2, což má bezprostřední důsledky pro globální strategie posílení očkování proti COVID-19.

Grafický abstrakt



Oblasti předmětu

Imunitní reakce

Mikrobiologie

Úvod

Vakcíny hrají ústřední roli v ochranné strategii proti COVID-19. Většina vakcín proti COVID-19 s povolením pro nouzové použití od Světové zdravotnické organizace obsahuje minimum receptorové vazebné domény (RBD) proteinu SARS-CoV-2 Spike. Konvenční cykly těchto vakcín se ukázaly s pokročilými přínosy proti SARS-CoV-2, ale jejich neutralizační účinnost byla neustále zpochybňována častým výskytem mutačních variant ([Chakrabarti et al., 2022](#) ; [Thiruvengadam et al., 2022](#) ; [Zhou et al. al., 2021](#)). Od konce roku 2021 varianta SARS-CoV-2 Omicron překonala globální dominanci a epidemiologické studie identifikovaly značné úrovně průlomových infekcí a reinfekcí vakcínou ([Atmar a kol., 2022](#) ; [Walls a kol., 2022](#)). Vzhledem k těmto problémům bylo povoleno použití přeočkování pro dospělé po dokončení základního očkování ([Tanne, 2022](#)). Hromadné důkazy ukázaly, že použití první posilovací dávky vakcíny bylo bezpečné a účinné a mohlo produkovat vysoké titry neutralizačních protilátek se zlepšenou účinností proti variantám Omicron ([Cerqueira-Silva et al., 2022](#) ; [Elliott et al., 2022](#)). Ukázalo se však, že sérová ochrana po jedné posilovací vakcinaci s časem klesá, což opět způsobilo, že imunizované osoby jsou náchylné k trvalému riziku nově vzniklých variant SARS-CoV-2. Bylo tak odhaleno podání druhé posilovací vakcíny nebo případně rutinní očkování posilovacími dávkami, o kterých bylo dostupných málo informací. K řádnému řešení relevantních otázek v praktické oblasti profylaxe COVID-19 bylo zapotřebí více informací, jako je doporučená podmínka pro použití dalších posilovacích vakcín, navrhovaný počet posilovacích dávek, které je třeba podat, a potenciální nežádoucí účinky pokračujícího podávání posilovací vakcíny.

Po subkutánní nebo intramuskulární injekci budou rozpustné antigeny vakcín prezentovány aktivačním B buňkám za vzniku zárodečných center a dále se diferencují na plazmatické buňky a

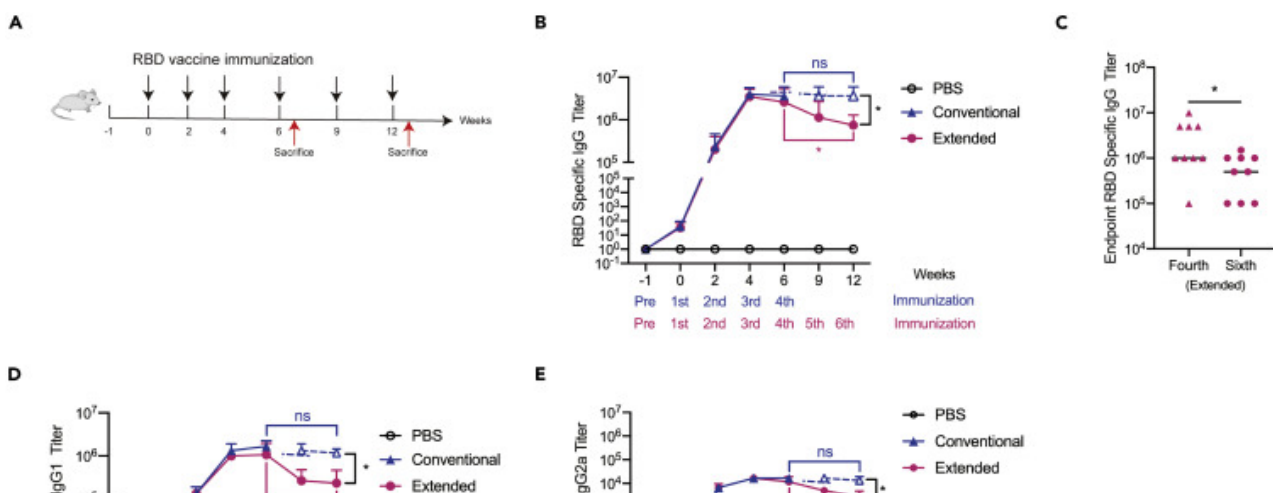
paměťové buňky vylučující antigen specifické protilátky ([Lederer et al., 2022](#) ; [Young a Brink, 2021](#)). Mezitím jsou zpracované T buněčné epitopy na vakcínách prezentovány molekulami MHC-I povrchovým receptorům T buněk (TCR) a aktivují T buňky, které se mohou diferencovat na efektorové T buňky a uplatňovat ochrannou buněčnou imunitu s produkcí molekul toxicity ([Fahrner et al., 2022](#) ; [Naranbhai et al., 2022](#)). Jedním z hlavních problémů spojených s kontinuální imunizací posilovacími vakcínami je relativně omezené okno odezvy systematické imunity na stejné podněty. Bylo publikováno, že stimulace cizím antigenem může vyvolat imunitní toleranci, která se projevuje jako neschopnost nebo nízká účinnost produkovat antigen-specifické protilátky a aktivovat efektorové T buňky ([Lin et al., 1998](#) ; [Rizzuto et al., 2022](#)) ([Han et al., 2013](#)). V současné době není jasné, zda prodloužené podávání boosterů vakcíny RBD může obnovit ochrannou imunitu nebo je náchylné k navození imunitní tolerance.

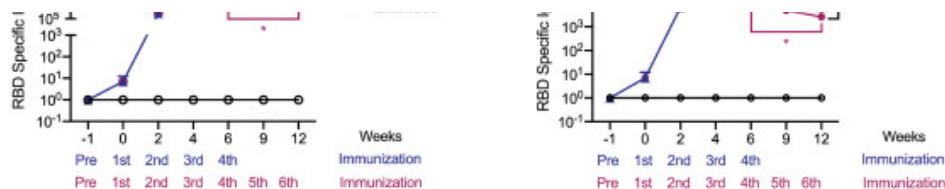
Zde jsme provedli podélné a laterální hodnocení imunitních odpovědí na prodloužený průběh posilovací vakcíny s rekombinantním proteinem RBD na myším modelu Balb/c. Zjistili jsme, že konvenční imunizační kurz by mohl stimulovat trvalé hladiny neutralizačních protilátek a podporovat antigenově specifické CD4⁺ a CD8⁺Reaktivita T buněk. Pokračující vakcinace však podpořila vytvoření prominentní adaptivní imunitní tolerance a hluboce narušila zavedenou imunitní odpověď s konvenčním průběhem, o čemž svědčí významné snížení antigenně specifické protilátky a odpovědi T buněk, ztráta imunitní paměti a forma imunopresivního mikroprostředí. . Naše zjištění prokázala potenciální rizika spojená s prodlouženým posilovacím cyklem očkování proti SARS-CoV-2 s bezprostředními důsledky pro strategické použití homologních posilovacích vakcín.

Výsledek

Rozšířená imunizace nezvýšila produkci RBD specifických protilátek u myší

Aby se zjistilo, zda posilovací dávky vakcíny mohou vyvolat příznivé účinky, byly šestitýdenním samičkám myši Balb/c podány další dávky vakcíny RBD (rozšířená skupina) podle konvenční strategie (konvenční skupina) čtyřnásobné imunizace vysoce purifikovaným SARS-CoV-2 RBD rekombinačním proteinem (obrázek 1A). Jak již bylo dříve uvedeno (Gao et al., 2021), zjistili jsme, že hladiny RBD-specifických IgG protilátek byly zvýšeny v závislosti na dávce s dávkovacím intervalem 2–3 týdnů (obrázek 1 B). Konkrétně byla při čtvrté imunizaci pozorována stabilní hladina produkce protilátek, která se udržela po dobu následujících 6 týdnů (obrázek 1B). Následná imunizace však postupně snižovala titer RBD-specifických IgG protilátek a významný rozdíl mohl být detekován po druhé injekci RBD booster vakcín (obrázky 1 B a 1C). Protože distribuce podtříd IgG v séru ukazuje na zkreslenou imunitu Th1 nebo Th2 (pomocné buňky T, Th), analyzovali jsme protilátkové odpovědi podtřídy IgG vyvolané vakcínou RBD. Výsledky ELISA ukázaly, že jak RBD-specifické IgG1, tak IgG2a byly detekovány v séru z imunizovaných myší. Titr IgG1 byl významně vyšší než titer IgG2a, což ukazuje, že vakcína RBD vyvolala reakci podobnou Th2 přednostním zesílením sérové protilátky IgG1 (obrázky 1D a 1E). IgG1 titer u myší imunizovaných více posilovacími dávkami byl významně nižší než titer bez posilovací dávky. Tyto výsledky naznačují, že vakcína RBD by mohla stimulovat produkci RBD-specifických protilátek s dominancí typu Th2, zatímco přidání RBD booster vakcín nezvýšilo produkci RBD specifických protilátek u myší.





Obrázek 1 . Rozšířená imunizace nezvýšila produkci RBD specifických protilátek u myší

(A) Konvenční nebo rozšířená strategie imunizace vakcínou RBD. Černé šipky představují injekci 50 μ g RBD. Červené šipky představují usmrčené myši sedmý den po poslední imunizaci. Periferní krev z ocasní žíly byla myším odebrána 10. ^{den} po každé imunizaci. Periferní krev byla odebrána sedmý den před první imunizací jako negativní kontrola.

(B) Titry RBD-specifických IgG protilátek byly testovány pomocí ELISA v myších sérech odebraných 10 dní po každé injekci. (N = 3).

(C) Titry IgG protilátek vázající RBD byly testovány pomocí ELISA v myších sérech odebraných 10 dnů po čtvrté a šesté imunizaci. Body představují jednotlivé myši. Data byla prezentována jako průměr \pm SEM.

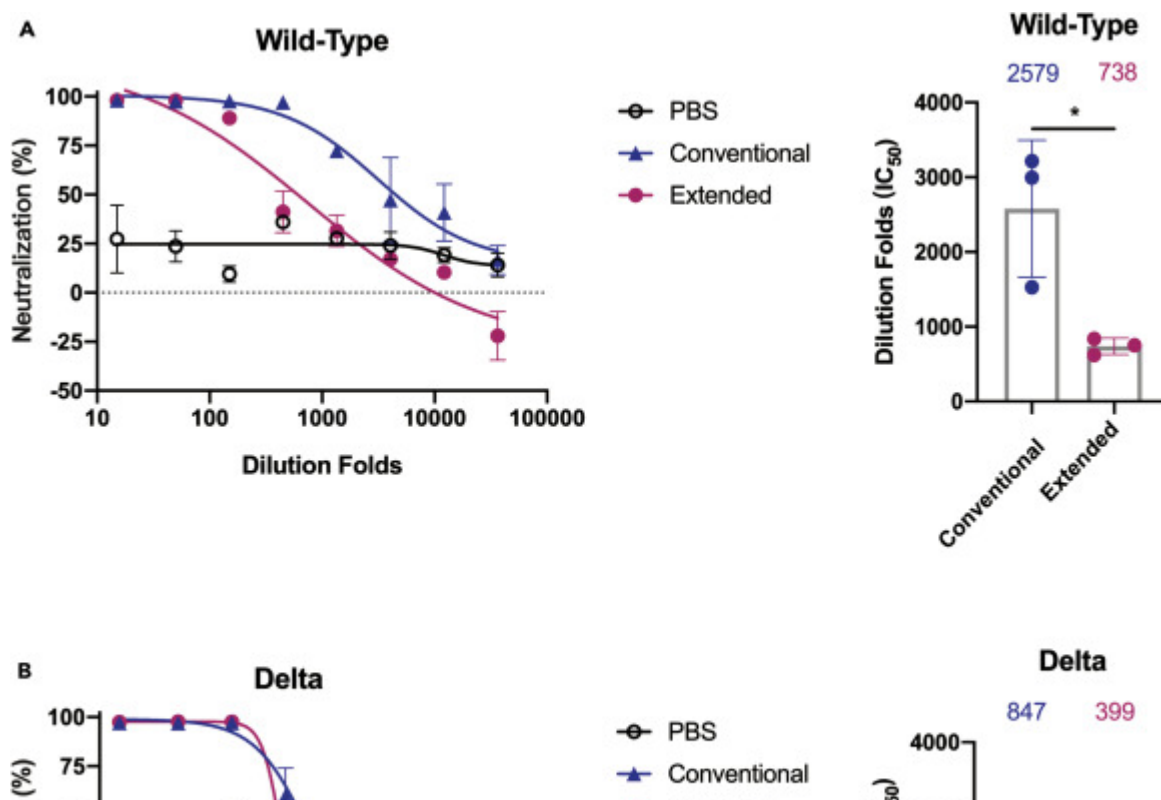
(D) Titry RBD-specifických IgG₁ protilátek byly testovány pomocí ELISA v myších sérech odebraných 10 dní po každé vakcinaci. (N = 3).

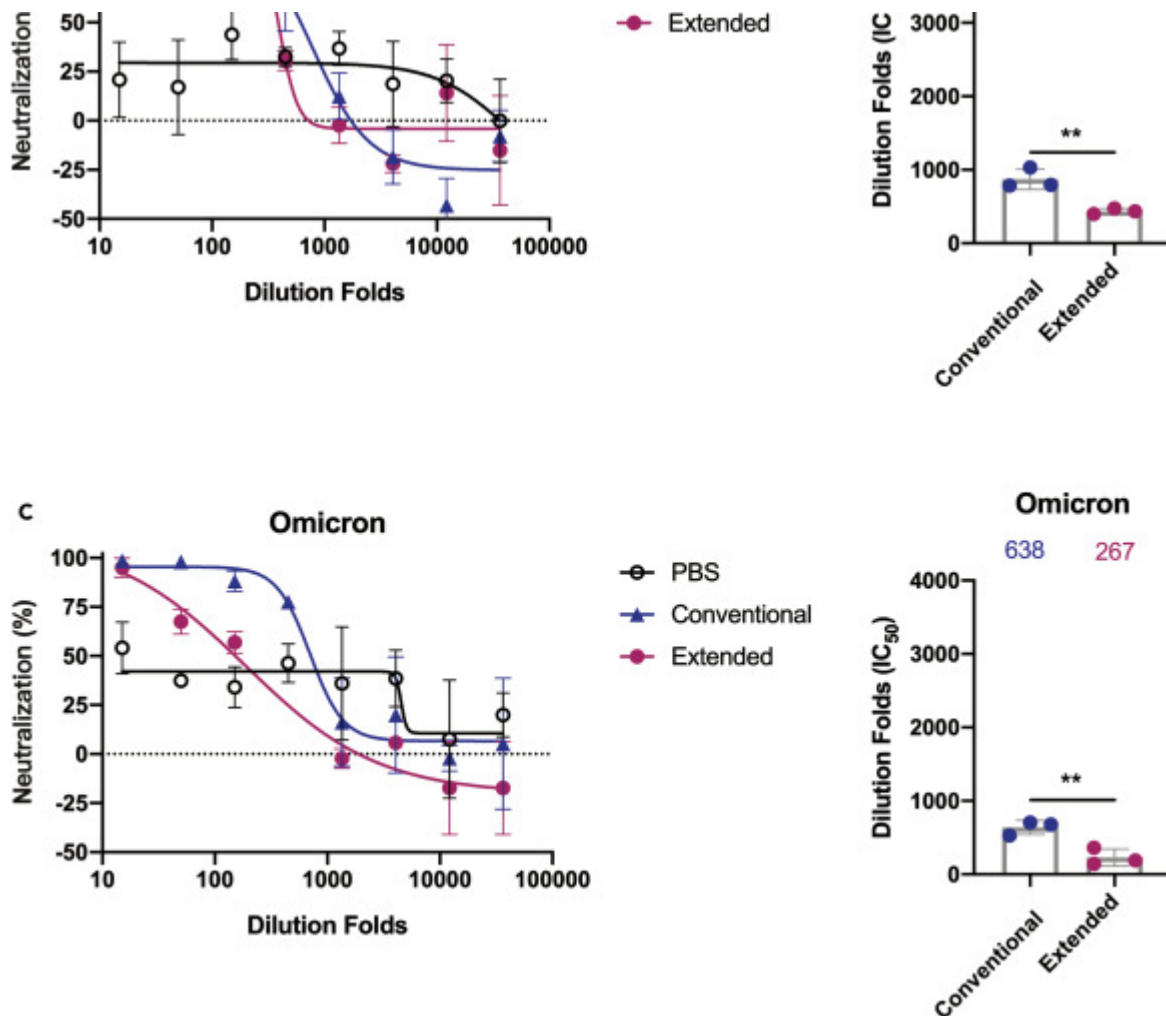
(E) Titry RBD-specifických IgG_{2a} protilátek byly testovány pomocí ELISA v myších sérech odebraných 10 dní po každé imunizaci. (N = 3). *p < 0,05. ns představoval nevýznamný. **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. ns představoval nevýznamný.

Prodloužená imunizace snížila odezvy sérových neutralizačních protilátek

Dále jsme stanovili neutralizační potenciál těchto RBD-specifických IgG protilátek z imunizovaného myšího séra. Výsledky z kompetitivní ELISA ukázaly, že sérum z myší imunizovaných RBD vykazovalo kompetitivní účinnost oproti hACE2 (obrázek S1 A). Ačkoli sérum z

obou skupin mohlo dosáhnout téměř 100% kompetitivní vazby na RBD při vysokých koncentracích, prodloužená imunizace významně snížila inhibiční účinek při vyšších násobcích ředění ve srovnání s konvenční vakcinační skupinou (obrázek S1A). Dále jsme hodnotili aktivitu neutralizačních protilátek séra imunizovaných myší RBD proti pseudovirům SARS-CoV-2 a jeho nově vzniklým mutačním variantám. Pozorovali jsme, že sérum obou imunizovaných skupin vykazovalo neutralizační účinnost, jak je ukázáno z výsledků experimentů neutralizace pseudovirů (obrázky 2 A–2C, S1 B a S1C). Zjistili jsme rozsah 2,5 až 4násobného snížení geometrického průměru titrů proti Delta a Omicron ve srovnání s pseudoviry divokého typu (obrázky 2 A–2C). Je třeba poznamenat, že došlo k významnému snížení neutralizační schopnosti myšího séra z rozšířené skupiny proti všem třem typům pseudovirů, jak naznačuje nižší IC_{50} odpovídající každému testu (obrázky 2 A–2C). Výše uvedené výsledky společně naznačují, že imunizace rekombinantním proteinem RBD by mohla přinést neutralizační protilátkovou odpověď u myší Balb/c proti SARS-CoV-2 a jeho variantám, což by mohlo být vážně ovlivněno prodlouženým podáváním posilovačů vakcín.





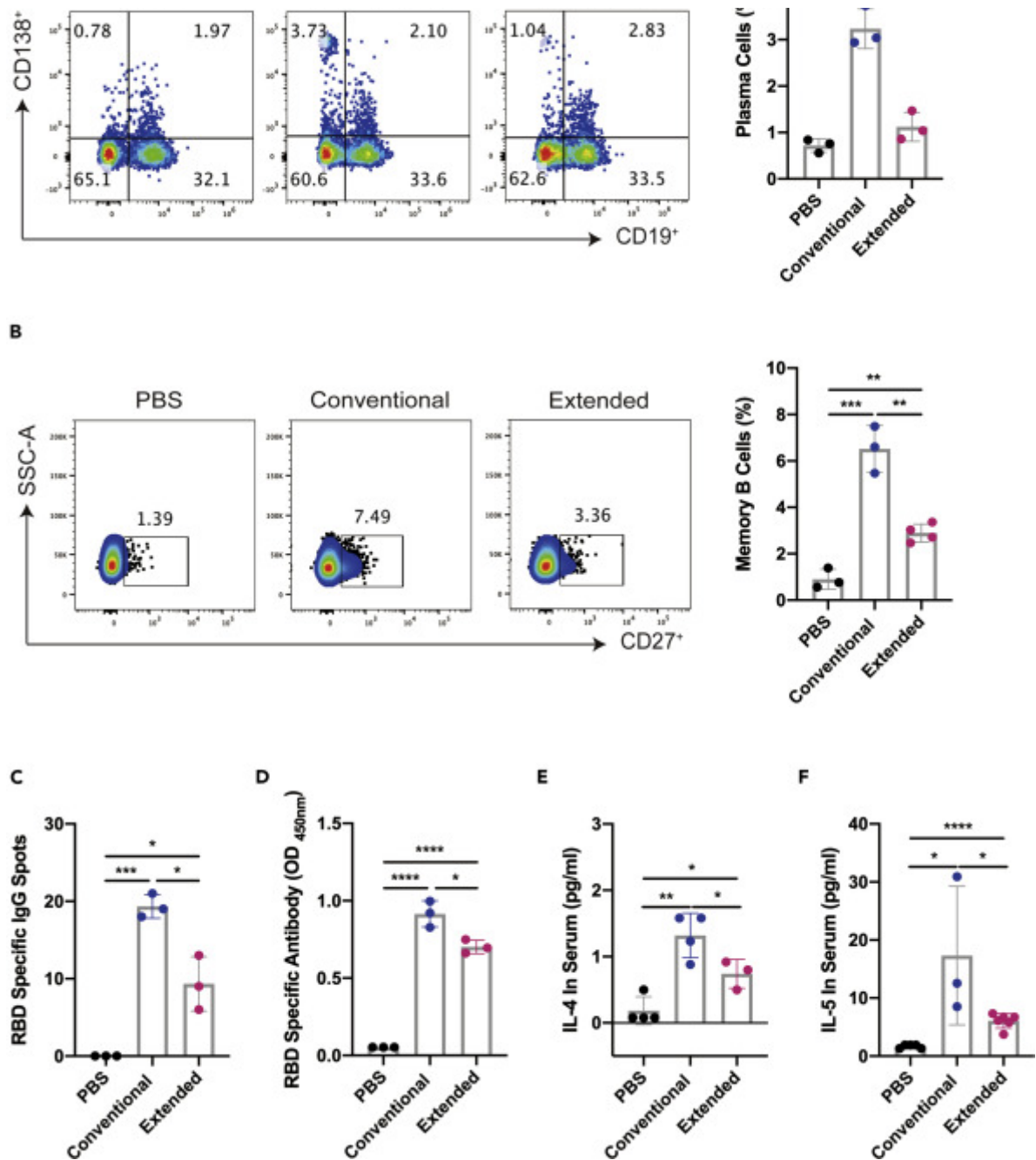
Obrázek 2 . Prodloužená imunizace snížila odezvy sérových neutralizačních protilátek

Neutralizační křivky pseudovirů pro kmeny SARS-CoV-2 (divokého typu) (A), Delta (B) a Omicron (C) v myších sérech odebraných 10 dní po poslední dávce konvenční skupiny nebo prodloužené vakcinace RBD. Porovnání neutralizačních titrů mezi SARS-CoV-2 (divokého typu) a dvěma variantními kmeny pro konvenční a rozšířené vakcinační sérum: pro analýzu byl použit Wilcoxonův párový znaménkový test a byly vypočteny dvoustranné hodnoty p; průměrné hodnoty byly uvedeny nad každým sloupcem. Body představují jednotlivé myši v (A), (B) a (C). Data byla prezentována jako průměr ± (SEM). Byla ukázána reprezentativní data ze dvou nezávislých experimentů. *p < 0,05, **p < 0,01. ns představoval nevýznamný.

Rozšířená imunizace inhibovala produkci RBD-specifických paměťových B buněk

Pro prozkoumání potenciálních mechanismů neutralizačních protilátek ovlivněných prodlouženým podáváním byla provedena průtoková cytometrická analýza s celkovými lymfocyty z krve imunizovaných myší jeden týden po poslední injekci každé skupiny. Výsledky odhalily, že podíly plazmatických buněk $CD19^- CD138^+$ byly významně zvýšené v obou skupinách, zatímco při prodloužení imunizační kúry bylo pozorováno výrazné snížení (obrázek 3, A). Také podíl paměti B v den 7 po poslední imunizaci byl stanoven průtokovou cytometrickou analýzou se vzorky myší sleziny. Zjistili jsme, že populace $CD19^+ CD27^+$ B buňky byly významně zvětšeny v obou dvou imunizovaných skupinách ve srovnání s PBS kontrolou, zatímco u rozšířené skupiny bylo detekováno výrazné snížení podílu paměťových B buněk ve srovnání s konvenčními vakcinačními vzorky (obrázek 3, B). Paměťové B buňky mohou být indukovány diferenciací na plazmatické buňky prostřednictvím kostimulace s agonistou TLR receptoru R848 a IL-2. Protilátky secernované paměťovými B buňkami byly detekovány testem ELISPOT a ELISA, v daném pořadí. V souladu s tím výsledky z ELISPOT a testu ELISA prokázaly, že jak konvenční, tak rozšířená imunizace by mohla účinně indukovat produkci RBD-specifických paměťových B buněk s posledně jmenovanými na významně nižší úrovni (obrázky 3, C, 3D a S1D). Protože proliferace a diferenciaci B buněk jsou podporovány IL-4 a IL-5, analyzovali jsme také hladiny těchto cytokinů v séru imunizovaných myší pomocí ELISA. Výsledky ukázaly, že RBD rekombinantní proteiny mohou podporovat významné zvýšení produkce IL-4 a IL-5, zatímco sérové hladiny buď IL-4 nebo IL-5 byly při prodloužené vakcinaci srovnatelně nižší (obrázky 3, E a 3F). Výše uvedené informace prokázaly, že další RBD booster vakcíny mohou vést ke ztrátě RBD-specifické humorální imunity a podporovat imunitní toleranci.





Obrázek 3 . Rozšířená imunizace inhibovala produkci RBD-specifických paměťových B buněk

(A) Poměr CD19⁻ CD138⁺ plazmatických buněk lymfocytů byl detekován průtokovou cytometrií v krvi sedmý den po poslední imunizaci.

(B) Procenta CD19⁺ CD27⁺ paměťových B buněk (gated na CD19⁺ B buňkách) ze splenocytů byla detekována průtokovou cytometrií sedmý den po poslední imunizaci.

(C) R848 (2 µg/ml) v kombinaci se 100 U/ml myšího IL-2 byly stimulovány k indukci paměťových B buněk k diferenciaci na

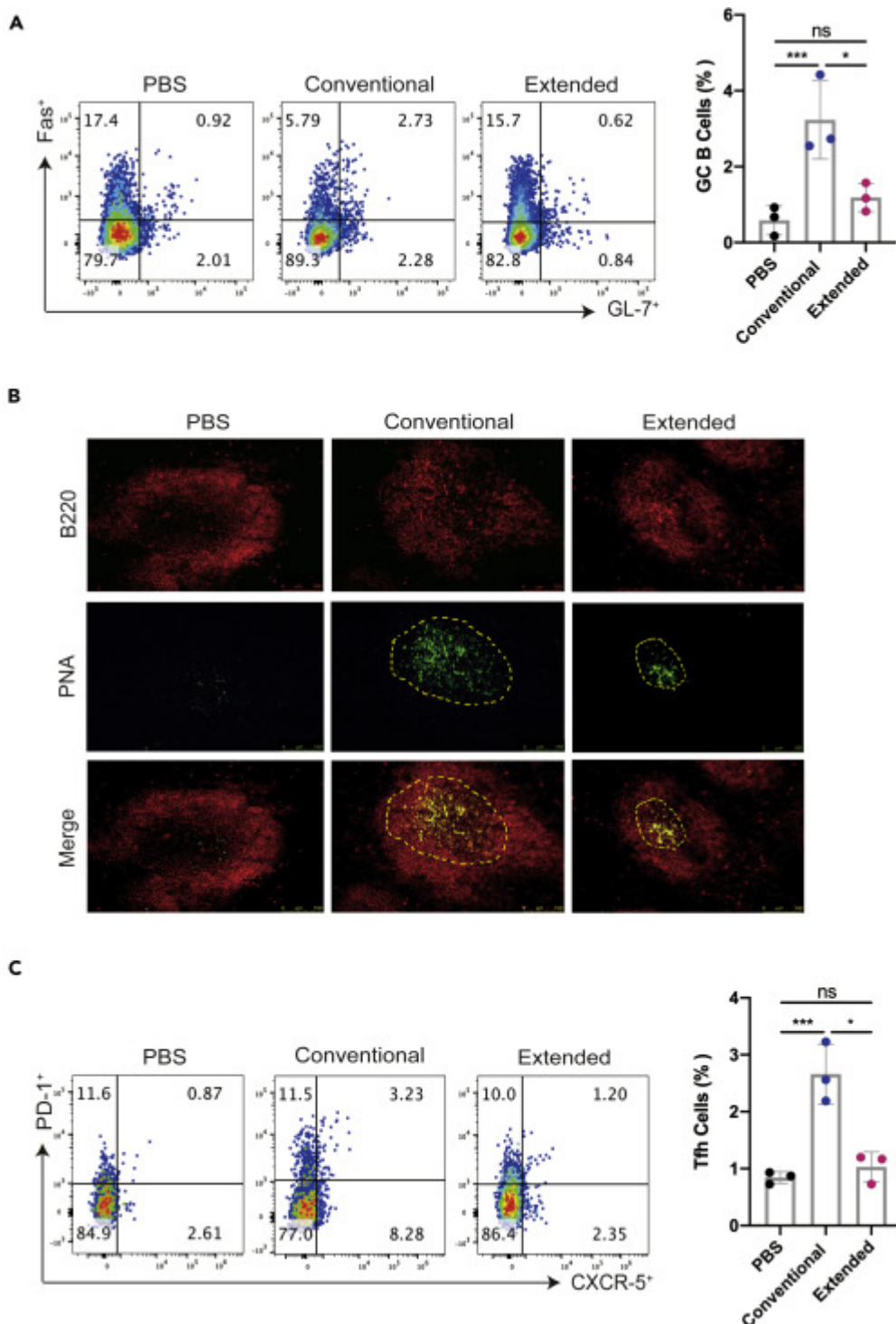
plazmatické buňky, 7. den po poslední imunizaci. Výsledky ELISPOT byly ukázány jako počty RBD-specifických IgG bodů na 5×10^5 splenocytů každé myši odečtené od odpovídajících DMSO skupin. Jako negativní kontrola byla provedena stimulace stejným objemem média. Data byla reprezentativní ze dvou nezávislých experimentů.

(D) RBD-specifické IgG protilátky v supernatantu 5×10^5 splenocytů na ml byly detekovány pomocí ELISA. IL-4 (E) a IL-5 (F) v séru byly detekovány testem ELISA sedmý den po poslední imunizaci. Data byla prezentována jako průměr \pm SEM Byla ukázána reprezentativní data ze dvou nezávislých experimentů. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. ns představoval nevýznamný.

Prodloužená imunizace potlačila tvorbu zárodečného centra

Po expozici antigenu aktivované antigen-specifické B buňky indukují některé dříve aktivované T buňky, aby se diferencovaly na Tfh buňky, které exprimují vysoké hladiny chemokinového receptoru CXCR5, jsou vtaženy do lymfoidních folikulů a hrají kritickou roli při tvorbě a funkci zárodečných center. . Další výzkum s tvorbou germinálního centra byl proveden za účelem vyhodnocení účinnosti diferenciací GC B buněk na paměťové B buňky a plazmatické buňky, které udělují hostiteli účinnou dlouhotrvající humorální imunitu po antigenní stimulaci. Průtoková cytometrická analýza vzorků myši sleziny identifikovala významné zvýšení podílu CD19⁺ GL7⁺ Fas⁺ B buněk v konvenčně imunizované skupině (obrázek 4 A). Jak se očekávalo, reakce zárodečného centra byla prodlouženou imunizací zrušena na úroveň téměř podobnou jako kontrola PBS (obrázek 4 A). Paralelně byla pomocí imunofluorescenčního barvení detekována exprese germinálního centra B buněčného markeru PNA. Zjistili jsme, že pozitivně obarvené B buňky myši sleziny byly v rozšířené skupině výrazně sníženy, na rozdíl od těch od zvířat s konvenční vakcínou, což potvrzuje, že tvorba GC byla narušena dvěma dávkami posilovací vakcíny. (Obrázek 4 B). Analyzovali jsme také podíl CD4⁺ CXCR5⁺

PD-1⁺Tfh buňky ve slezině imunizovaných myši a zjistili, že prodloužená imunizace snížila populaci těchto Tfh buněk na úroveň jako u PBS kontroly, na rozdíl od významně zvýšených Tfh populací z konvenční skupiny (obrázek 4 C). Souhrnně tyto výsledky potvrdily, že zahrnutí RBD booster vakcíny po normálním průběhu imunizace nemohlo vyvolat a zvýšit reakce germinálních center v myši slezině, což naznačuje, že více boosterů by mohlo vyvolat toleranci spíše než imunitní reakce.



Obrázek 4 . Prodloužená imunizace potlačila tvorbu zárodečného centra

(A) Procenta Fas⁺ GL-7⁺ B buněk (gated CD19⁺ B buňky) ze splenocytů sedmý den po poslední imunizaci byla detekována průtokovou cytometrií.

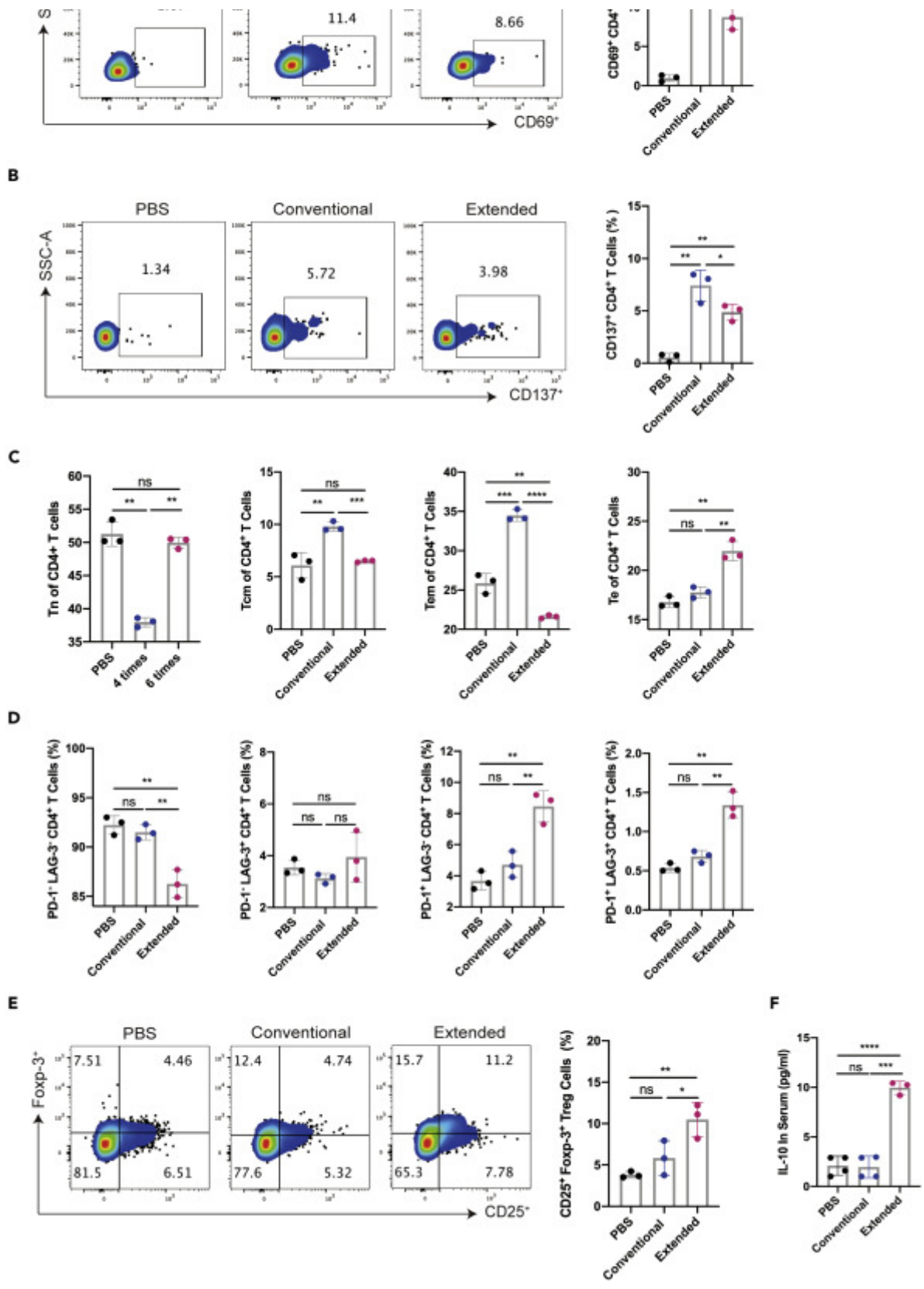
(B) Sedmý den po poslední imunizaci byly zmrazené tkáně myších slezin obarveny PNA (zelená) a B220 (červená). Měřítko představovalo 75 μ m a obrázky byly analyzovány softwarem ImageJ.

(C) Procenta PD-1⁺ CXCR5⁺ Tfh buněk ze splenocytů byla detekována průtokovou cytometrií a ukázána v gated CD4⁺ T buňkách. Body představují jednotlivé myši v (A) a (C). Data byla prezentována jako průměr \pm SEM * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. ns představuje nevýznamné.

Rozšířená imunizace inhibovala aktivaci imunitních odpovědí CD4⁺ T buněk

S pozorovanými nevýhodami v humorální imunitě způsobené prodlouženou imunizací jsme přešli ke stanovení, zda existují nějaké rozdíly v buněčných imunitních odpovědích na dvě vakcíny. Aktivace CD4⁺ T buněk byla analyzována průtokovou cytometrickou analýzou odpovídajících markerů. Obě imunizační cykly mohly významně zvýšit podíly CD69⁺ nebo CD137⁺ CD4⁺ T buněk, zatímco prodloužená vakcinace způsobila více než 40% snížení aktivace CD4⁺ T buněk ve slezině (obrázky_5 A a 5B). Podrobná studie podskupin T buněk v CD4⁺T buňky odhalily, že podíl efektorových paměťových T buněk (Tem) a centrálních paměťových T buněk (Tcm) v CD4⁺ T buňkách v rozšířené skupině byl ostře snížen ve srovnání s normální skupinou, spolu s relativně zvýšeným počtem naivních T buněk. (Tn) populace. Speciálně jsme pozorovali, že frekvence CD4⁺ Te buněk významně stoupá v rozšířené skupině. (Obrázky_5 C a S2 A).





Obrázek 5 . Rozšířená imunizace inhibovala aktivaci imunitních odpovědí CD4⁺ T buněk

Expresse CD69 (A) a CD137 (B) (gated na CD4⁺ T buňkách) byla detekována průtokovou cytometrií sedmý den po poslední imunizaci.

(C) Poměr Tn (CD62L⁺ CD44⁻), Te (CD62L⁻ CD44⁻), Tem

(CD62L⁻ CD44⁺) a Tcm (CD62L⁺ CD44⁺) CD4⁺ T buněk byl detekován průtokovou cytometrií v den 7 po poslední imunizaci.

(D) Expres PD-1 a LAG-3 (gated na CD4⁺ T buňkách) byla detekována průtokovou cytometrií v den 7 po poslední imunizaci.

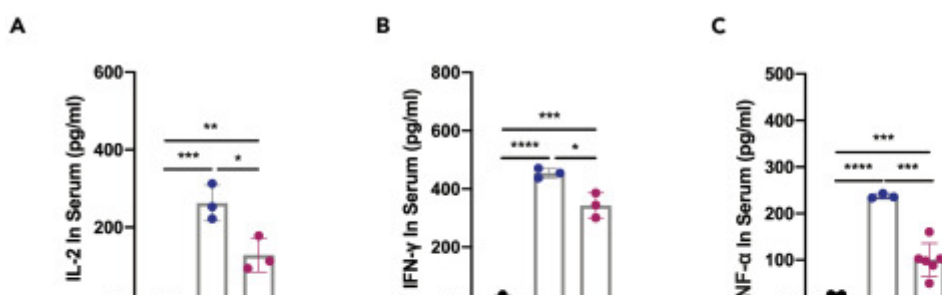
(E) Poměr Treg (gated on CD4⁺) byl detekován průtokovou cytometrií sedmý den po poslední imunizaci. IL-10 (F) v imunizovaném séru byly detekovány sedmý den po poslední imunizaci. Data byla prezentována jako průměr ± SEM *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. ns představoval nevýznamný.

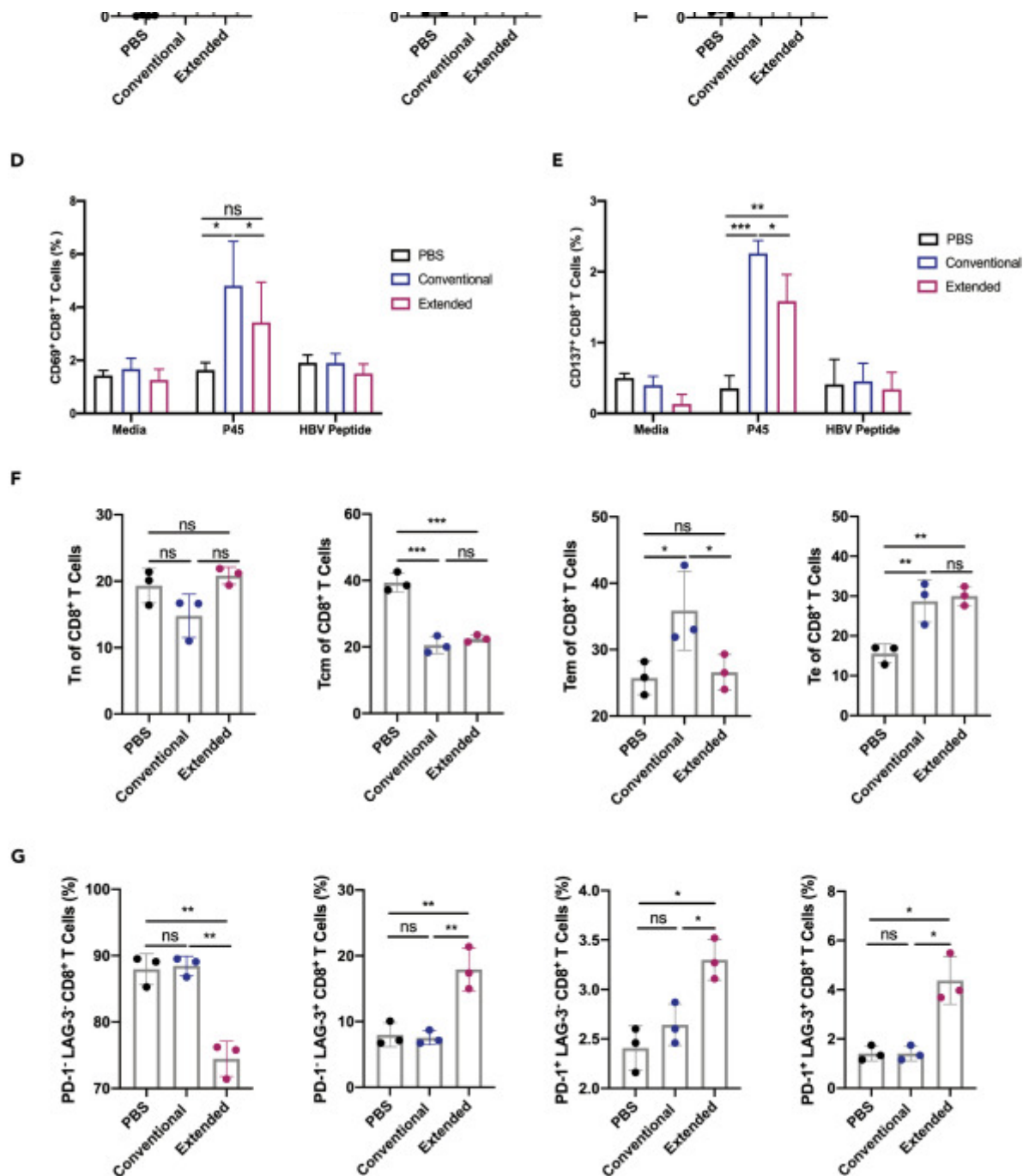
Kromě toho jsme hodnotili exprese markerů vyčerpání v CD4⁺ T buňkách v myších splenocytech v den 7 po poslední imunizaci. Výsledky průtokové cytometrie ukázaly, že podíly PD-1⁻ LAG-3⁻ CD4⁺ T buněk byly významně sníženy při prodloužené imunizaci ve srovnání s konvenční vakcínou, zatímco druhá skupina nevykazovala žádný zjevný rozdíl od kontrolní skupiny PBS (obrázky_5 D a S2 B). Navíc jsme zjistili, že prodloužená imunizace významně indukovala procenta PD-1⁺ CD4⁺ T buněk ve srovnání s konvenční vakcínou nebo kontrolou PBS (obrázky_5D a S2 B). ^U PD-1⁻ LAG-3⁺ CD4⁺ T buněk nebyly mezi všemi skupinami detekovány žádné zjevné variace (obrázky_5 D a S2 B). Kromě toho jsme potvrdili, že zvýšená povrchová exprese jak PD-1, tak LAG-3 byla přímo úměrná zvýšenému podílu Te CD4⁺ T buněk ve skupině s rozšířenou imunizací (obrázky_S2 C a S2D). Tato data naznačují, že další posilovací dávky vakcíny ke konvenčnímu imunizovanému cyklu by mohly podporovat CD4⁺ Vyčerpání T buněk. Abychom prozkoumali zapojení populace regulačních T buněk (Treg) do snížené buněčné imunity spojené s rozšířenou imunizací, stanovili jsme podíl Treg buněk v myších splenocytech týden po poslední imunizaci. Výsledky analýzy průtokovou cytometrií ukázaly, že ve skupině s rozšířenou vakcínou bylo detekováno vyšší procento CD4⁺ CD25⁺ foxp-3⁺ Treg buněk ve srovnání s normální skupinou a kontrolní skupinou

PBS (obrázek 5E). Dále jsme testovali sérovou hladinu IL-10, který byl vylučován hlavně Treg buňkami. Výsledky ELISA ukázaly, že ve vzorcích ze skupiny s rozšířenou vakcinací bylo detekováno vyšší množství IL-10 než v ostatních dvou skupinách, což bylo v souladu se zvýšeným percentilem buněk Treg (obrázek 5 F). Tato data naznačují, že Treg buňky mohou hrát důležitou roli v imunitních tolerancích vůči prodloužené imunizaci vakcínami RBD.

Rozšířená imunizace inhibovala imunitní odpověď zprostředkovanou CD8⁺ T buňkami

Abychom prozkoumali účinek boosterů vakcíny na CD8⁺ T buňky, studovali jsme secernované hladiny efektorových cytokinů jeden týden po poslední imunizaci. Sérové koncentrace IL-2, IFN- γ a TNF- α byly významně zvýšeny oběma imunizačními cykly, což ukazuje na funkční aktivaci CD8⁺ T buněk (obrázky 6 A–6C). Rozšířená vakcinace však výrazně snížila sekreci všech tří cytokinů než konvenční imunizace (obrázky 6 A–6C). K potvrzení těchto pozorování byly výsledkem specifické reakce SARS-CoV-2 RBD CD8⁺T lymfocyty jsme aplikovali krátký peptid obsahující sekvenci odpovídající 9 aminokyselinové oblasti (pojmenované P45), která byla nedávno identifikována jako HLA-A*24:02 CD8⁺ T buněčný epitop (25), který může být křížově rozpoznán myšími CD8⁺ T buňkami. Splenocyty izolované z imunizovaných myší byly stimulovány peptidem P45 po dobu 24 hodin, než byly podrobeny vyšetření na aktivaci T buněk. Analýza průtokovou cytometrií ukázala, že P45 zvýšil profil exprese CD69 i CD137 v CD8⁺ T buňkách, zatímco splenocyty z rozšířené skupiny vykazovaly pozoruhodně nižší úroveň exprese obou aktivačních markerů než ty z konvenční vakcinační skupiny (obrázek 6 D, 6E, S3A a S3B).





1. Stáhnout : Stáhnout obrázek ve vysokém rozlišení (687KB)
2. Stáhnout : Stáhnout obrázek v plné velikosti

Obrázek 6 . Rozšířená imunizace inhibovala imunitní odpověď zprostředkovanou CD8⁺ T buňkami

IL-2 (A), IFN- γ (B) a TNF- α (C) v imunizovaném séru byly detekovány sedmý den po poslední imunizaci. Expresce CD69 (D) a CD137 (E) ve splenocytech (gated na CD8⁺ T buňkách) byly detekovány průtokovou cytometrií po stimulaci 10 μ g/ml RBD nebo HBV peptidem po dobu 24 hodin, jako negativní kontrola byla použita konvenční média.

(F) Poměr Tn (CD62L⁺ CD44⁻), Te (CD62L⁻ CD44⁻), Tem (CD62L⁻ CD44⁺) a Tcm (CD62L⁺ CD44⁺) CD8⁺ T buněk 7. den po poslední imunizaci.

(G) Expres PD-1 a LAG-3 (gated na CD8⁺ T buňkách) byla detekována v den 7 po poslední imunizaci. Data byla prezentována jako průměr ± (SEM). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001. ns představoval nevýznamný.

Dále jsme studovali podtypy CD8⁺ T buněk spojené s různými imunizačními cykly. Ve srovnání se skupinou PBS bylo procento Tem v rozšířené skupině významně sníženo, spolu s významným nárůstem v subpopulaci Te a téměř žádnými změnami v podílech Tn a Tcm (obrázky 6 F a S3 C). Konkrétně došlo k více než 50% snížení populace Tem u myši ze skupiny s rozšířenou vakcinací než u konvenční skupiny, bez zjevných rozdílů v percentilu jiných podtypů CD8⁺ T buněk (obrázek 6 F).

Bylo popsáno, že opakovaná stimulace antigenem vyvolává vyčerpání CD8⁺ T buněk; proto jsme testovali, zda existují nějaké rozdíly v hladinách markerů vyčerpání mezi dvěma imunizačními cykly. Zjistili jsme, že povrchové exprese PD-1 a LAG-3 na CD8⁺ T buňkách z myších splenocytů byly evidentně vyšší ve skupině s rozšířenou vakcinací, ve srovnání buď s konvenční skupinou, nebo s kontrolou PBS (obrázek 6 G a S3 D) . . Současně byl podíl PD-1⁻ LAG-3⁻ CD8⁺ T buněk v rozšířené skupině významně nižší než v ostatních skupinách (obrázek 6G). Expres PD-1 a LAG-3 na Te podskupinách CD8⁺ T buněk byly dále analyzovány a zjistili jsme, že nejvyšší hladina LAG-3 byla exprimována v Te podskupinách CD8⁺ T buněk ze vzorků s prodlouženou imunizací . (Obrázky S3E a S3F). Tato data naznačují, že pokračující podávání RBD booster vakcín by mohlo vést ke snížené aktivaci CD8⁺ T buněk se zvýšeným vyčerpáním. Celkově naše zjištění prokázala potenciální riziko

adaptivní imunitní tolerance z prodlouženého průběhu imunizace s homologními booster vakcínami a navrhla, že aplikacím více booster vakcín s ochranným záměrem je třeba předcházet opatrně.

Diskuse

V současné době je celosvětově podporováno očkování proti COVID-19, i když trvalá ochrana proti nově vzniklým variantním kmenům SARS-CoV-2 je neustále zpochybňována. Klinické důkazy prokázaly, že zahrnutí další posilovací vakcíny může znovu stimulovat ochrannou imunitní odpověď ([Cheng et al., 2022](#) ; [Gruell et al., 2022](#)). Je zpochybňováno, zda by takové obnovení imunitní odpovědi vyvolané vakcínou bylo možné opakovat pokračující aplikací boosterů, ale v současnosti je to z velké části neznámé. Zde jsme porovnávali účinky opakovaných boosterů vakcíny RBD s konvenčním imunizačním cyklem s účinky s rozšířenou vakcinační strategií na modelu myši Balb/c. Zjistili jsme, že ochranné účinky humorální imunity a buněčné imunity vytvořené konvenční imunizací byly oba hluboce narušeny během prodlouženého vakcinačního cyklu. Konkrétně prodloužená vakcinace nejen plně narušila množství a neutralizační účinnost sérových RBD-specifických protilátek, ale také zkrátila dlouhodobou humorální paměť. To je spojeno s imunitní tolerancí v reakci zárodečných center, spolu se sníženým počtem B a Tfh buněk germinálního centra sleziny. Navíc jsme prokázali, že prodloužená imunizace snížila funkční odpovědi CD4⁺ a CD8⁺ T buňky, omezily populaci paměťových T buněk a up-regulovaly expresi PD-1 a LAG-3 v buňkách podtypu T_e. Byl také pozorován zvýšený percentil Treg buněk, doprovázený významným zvýšením produkce IL-10. Společně jsme poskytli zásadní důkaz, že opakované podávání RBD booster vakcín může negativně ovlivnit imunitní odpověď vytvořenou konvenčním vakcinačním kurzem a podporovat adaptivní imunitní toleranci.

V naší nedávné studii třídávkový cyklus vakcín RBD úspěšně přinesl jak humorální, tak buněčnou imunitní ochranu po dobu 4 měsíců v modelu myši Balb/c ([Gao et al., 2021](#)). V současné studii jsme zjistili, že následné čtvrté podání stejné vakcíny pokračovalo ve stimulaci produkce RBD-specifických neutralizačních protilátek, jejichž sérové hladiny byly udržovány po dobu nejméně 6 týdnů. Tato zjištění byla v souladu s hlášeným neutralizačním účinkem čtvrté dávky vakcíny Pfizer na mutanty SARS-CoV-2 ([Tanne, 2022](#)). Když jsme však podali další dávky stejné posilovací dávky vakcíny, s pokusem vyvolat podobně zesílenou nebo alespoň trvalou imunitní odpověď, pozorovali jsme zjevné snížení celkových imunitních odpovědí. Jak titr RBD-specifických protilátek, tak sérová neutralizační schopnost proti pseudovirům SARS-CoV-2 byly vážně ovlivněny, s více než dvojnásobným poklesem IC₅₀ proti nejnovějším variantám SARS-CoV-2, včetně mutantů Delta a Omicron. To naznačuje, že opakované podávání RBD booster vakcín může aktivně podporovat humorální imunitní toleranci namísto funkční humorální imunity. Nedávná nezávislá zpráva přinesla podobné pozorování, že jedna další přeočkování inaktivovanou vakcínou SARS-CoV-2 u člověka významně snížila titr RBD-specifických protilátek, když byla podána v době, kdy již byla pozorována ztráta ochranné účinnosti ([Perez-Then et al. ., 2022](#)). Naznačuje, že u posilovacích vakcín vyvinutých zaměřených na SARS-CoV-2 RBD divokého typu mohou být dávky nebo průběh imunizace klíčovým faktorem, který by mohl být negativně ovlivněn imunitní tolerancí. Před jakýmkoli prodlouženým očkováním může být důležité monitorovat sérové hladiny protilátek.

Prokázaná imunitní tolerance z opakovaného podávání homologních boosterů v naší studii naznačuje, že při optimalizaci rozšířeného plánu pro booster očkování proti SARS-CoV-2 je třeba postupovat opatrně. Místo kontinuálního dávkování homologních primárních vakcín může střední přechod na heterologní přeočkování nabídnout šanci na zlepšení pozorované energie proti mutantům Omicron ([Reynolds et al., 2022](#)). Taková vakcinační strategie může využívat

jinak neuspokojivou imunitní odpověď v důsledku fenoménu séra nazývaného imprinting protilátek nebo původní antigenní hřích (OAS), který se objevuje v očkování proti SARS-CoV-2, zejména u dětí ([Lavinder a Ippolito, 2022](#)). Narazíme-li na heterologní boostery, imunitní paměťová odpověď ovládaná OAS by mohla generovat rychlejší a silnější neutralizační ochranu před preferenční aktivací existujících klonů B buněk protilátkami rozpoznávajícími epitopy kmene divokého typu. To by mohlo poskytnout příležitost pro dostatečný čas a akumulaci heterologních antigenů, které by mohly vyvolat správný nábor nových naivních B buněk pro vytvoření další primární nebo sekundární reakce na nové prezentované epitopy. Je rozumné spekulovat, že taková variantně specifická imunitní adaptace může zvýšit trvanlivost a/nebo účinnost pro vyvíjející se potřebu ochrany. V takovém rámci mohou být přizpůsobené mRNA vakcíny dobrou volbou pro obcházení ztráty účinné humorální a buněčné imunity z konvenčních vakcín vyvinutých s divokým typem viru.

Ve snaze vysvětlit mechanismus humorální imunitní tolerance spojené s naším prodlouženým imunizačním kurzem jsme analyzovali mechanismy zapojené do produkce RBD-specifických protilátek. Při prodloužené posilovací vakcinaci u myši jsme pozorovali významně snížený počet elementárních faktorů a pomocných T buněk, které by byly nutné pro zrání a aktivaci B buněk, ve srovnání s konvenčním průběhem imunizace. Nedostatečná dostupnost T_{fh} buněk by mohla bránit konvenčnímu procesu funkční diferenciaci B buněk a snížené množství sérového IL-4 by mohlo bránit aktivaci B buněk. Tyto předpoklady byly podpořeny skutečností, že v germinálním centru byl detekován významně nižší počet aktivních B buněk u myši ze skupiny s rozšířenou imunizací ve srovnání se zvířaty, kterým byla podána konvenční vakcinace. Pozoruhodně jsme zjistili, že podíl paměťových B buněk byl výrazně snížen ve skupině s rozšířenou imunizací, spolu se známkami imunitní tolerance B buněk, což naznačuje, že opakované očkování posilovacích injekcí sdílelo podobné

mechanismy, jako je vidět z humorální imunitní tolerance opakované expozice antigenu, jako při chronických virových infekcích (Han a kol., 2013).

Kromě humorálních imunitních odpovědí byla pozorována buněčná imunitní tolerance během prodlouženého cyklu posilovací vakcinace RBD. V séru rozšířené skupiny byly nalezeny omezené úrovně aktivace antigen-specifických paměťových T buněk a hluboce snížená sekrece IL-2 a IFN- γ , na rozdíl od trvalých buněčných imunitních odpovědí po 4 dávkách vakcín RBD. Bylo hlášeno, že chronická infekce virem HBV by mohla vést k antigen-specifické buněčné imunitní toleranci, která se projevila jako částečná nebo úplná neschopnost vyvolat aktivní imunitní odpověď z antigen-specifického CD8⁺ T buňky a významné zvýšení povrchových expresí inhibičních receptorů, včetně PD-1, Tim-3 a CTLA-4. Podobně jsme zjistili, že prodloužené podávání RBD booster vakcín zjevně zvýšilo hladiny PD-1 a LAG-3, doprovázené významným snížením paměťových CD8⁺ T buněk (Han et al., 2013). To je zvláště důležité, protože se ukázalo, že paměťová CD8⁺ T buněčná odpověď hraje převládající roli pro účinnou reakci proti nově vzniklým variantám SARS-CoV-2, které značně zpochybnily humorální imunitu kolektivními neutralizačními únikovými mutacemi (Tarke et al., 2022 ; Naranbhai a kol., 2022 ; Swadling a kol., 2022). Proto nadměrná stimulace stejnou posilovací vakcínou nebo reinfekce po vakcinaci může vážně narušit buněčnou imunitní odpověď nastolenou konvenčním očkovacím cyklem, což spolu s provokovanými humorálními imunitními reakcemi může vést k prodlouženému trvání onemocnění a/nebo zhoršení příznaků u příjemců .

Nadměrná vakcinace může navíc vytvářet imunosupresivní mikroprostředí, které je také důležitým činitelem imunitní tolerance. Prokázali jsme, že jak procento CD25⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ Treg buněk, tak hladiny imunosupresivních cytokinů IL-10 byly up-regulovány po prodloužené booster vakcinaci RBD vakcínou. To může mít za následek sníženou aktivaci a diferenciaci B buněk při stimulaci

antigenem, stejně jako funkční inhibici buněk prezentujících antigen (APC) a následné snížení aktivace CD8⁺ T buněk (Damo a Joshi, 2019 ; Field et al., 2020 Turner a kol., 2020). Ve skutečnosti jsme pozorovali humorální i buněčnou imunitní toleranci při dávkách prodloužených přeočkování, což umožnilo bezpečně spekulovat, že přeočkování může vážně ovlivnit imunitní ochrannou účinnost stanovenou konvenční imunizací SARS-CoV-2 a pravděpodobně zvýšit závažnost onemocnění. pro nové pacienty COVID-19 nebo reinfekce.

Ačkoli RBD podjednotkové vakcíny nemohou zcela reprezentovat inaktivované nebo mRNA vakcíny, zejména ve způsobu dodání antigenu. Nedávná zpráva v The New England Journal of Medicine prokázala, že čtvrtá vakcinace mRNA zdravých mladých zdravotnických pracovníků vykazuje pouze okrajové výhody (Reev-Yochay et al., 2022). Zda prodloužená vakcinace jinými vakcínami COVID-19 založenými na sekvenci SARS-CoV-2 divokého typu vyvolá imunitní toleranci, jsou zapotřebí další výzkumy.

V souhrnu jsme charakterizovali komplexní účinky prodloužené imunizace posilovacími vakcínami RBD na myším modelu balb/c. Naše zjištění odhalila, že opakované dávkování po ustavení odpovědi na vakcínu nemusí dále zlepšit antigen-specifickou reaktivitu; místo toho by to mohlo způsobit systematickou toleranci a neschopnost vytvářet účinné humorální a buněčné imunitní reakce na současné varianty SARS-CoV-2. Naše studie poskytuje včasné informace pro prevenci COVID-19. Zařazuje do debaty prodloužený imunizační kurz se dvěma nebo více boostery vakcíny na bázi RBD a varuje před budoucími aplikacemi posilovačů vakcín bez řádného vyhodnocení titerů sérových protilátek a funkcí T buněk.

Omezení studia

V této studii jsme místo primátů použili zvířecí model hlodavců. Ačkoli skutečná kinetika imunitní reaktivity mezi myši a lidmi není plně objasněna, ukázalo se, že model myši Balb/c sdílí hluboké

podobnosti s lidmi v reakci na infekce SARS-CoV-2 ([Halfmann et al., 2022](#)). Pozorovaná adaptivní imunitní tolerance spojená s prodlouženou posilovací vakcinací tedy může představovat důležitou referenční hodnotu, zejména pro příjemce homologních vakcín. Náš publikovaný výzkum uvedl, že titr protilátek v séru imunizovaných myši začal klesat tři až čtyři týdny po poslední injekci vakcíny ([Gao et al., 2021](#)). Proto byl třítydenní interval mezi posilovacími dávkami v této studii o něco kratší. Dalším omezením této studie je to, že jsme testovali prodlouženou kúru vakcinace, ve které byly vakcíny podávány v rutinním časovém intervalu, místo aby byly podávány v pozdní době, kdy imunitní reakce slábly, jak je vidět u očkovaných. Naše výsledky odhalily potenciální nežádoucí účinky spojené s běžnými vakcínami zvyšujícími SARS-CoV-2 a zdůraznily složitost systematického imunitního stavu v době očkování, který by mohl být významně ovlivněn adaptivní tolerancí. Na podporu našeho zjištění nedávná nezávislá studie na kohortě 38 očkovaných prokázala podobný pokles humorální imunity, když byla podána druhá posilovací dávka inaktivovaného viru SARS-CoV-2 v době oslabené imunitní odpovědi ([Wang et al., 2022](#)). Navzdory nedostatku přímých důkazů o změnách v aktivaci slezinných CD8⁺ T buněk pozorovaný pokles exprese CD137 a CD69 v CD8⁺ T buňkách odvozených ze sleziny stimulovaných peptidem P45 spolu se snížením sérových hladin efektorových molekul IL-2, IFN- γ a TNF- α , podpořily, že prodloužená imunizace podjednotkových vakcín RBD narušila aktivaci P45-specifické CD8⁺ buněčné imunity. Souhrnně tyto výsledky naznačují, že je třeba opatrnosti při opakovaném přeočkování proti SARS-CoV-2 v masové populaci.

STAR★Methods

Tabulka klíčových zdrojů

REAGENT nebo
RESOURCE

ZDROJ

IDENTIFIKÁTOR

Protilátky

REAGENT nebo RESOURCE	ZDROJ	IDENTIFIKÁTOR
APC anti-myš CD19	BioLegend	Cat#152409; AB_2629838
PE anti-myší CD138	BioLegend	Cat#142503; AB_10915989
FITC anti-myší/kryší/lidský CD27	BioLegend	Cat#124207; AB_1236463
PE/Cyanine7 anti-myší CD4	BioLegend	Cat#100421; AB_312706
APC/Cyanine7 anti-myší CD185 (CXCR5)	BioLegend	Cat#145525; AB_2566798
PE anti-myší CD279 (PD-1)	BioLegend	Cat#135205; AB_1877232
FITC anti-myší/lidský GL7 antigen	BioLegend	Cat#144603; AB_2561696
PerCP/Cyanine5.5 anti-myší CD95 (Fas)	BioLegend	Cat#152609; AB_2632904
Anti-myší/lidská CD45R/B220 protilátka Alexa Fluor® 647	BioLegend	Cat#103229; AB_492875
Alexa Fluor 700 proti myši CD3	BioLegend	Cat#100216; AB_493697
PE anti-myší CD8a	BioLegend	Cat#162303; AB_2894434
Brilliant Violet 605™ proti myším CD69	BioLegend	Cat#104529; AB_11203710
APC anti-myš CD137	BioLegend	Cat#106109; AB_2564296
APC anti-myš CD279	BioLegend	Cat#109111; AB_10613470
PE anti-myší CD223	BioLegend	Cat#125208; AB_2133343
Brilliant Violet 605™ proti myším/lidským CD44	BioLegend	Cat#103047; AB_2562451
Brilliant Violet 421™ proti myši CD62L	BioLegend	Cat#104435; AB_10900082
Alexa Fluor® 488 proti myši FOXP3	BioLegend	Cat#136803; AB_10946412
Kozí anti-myší IgG H&L sekundární protilátka konjugovaná s HRP	Abcam	Cat#ab6789; AB_955439

REAGENT nebo RESOURCE	ZDROJ	IDENTIFIKÁTOR
Kozí anti-myší IgG1 H&L konjugovaný s HRP	Bethyl	Cat#A90-105P; AB_67150
Kozí anti-myší IgG2a H&L konjugovaný s HRP	Bethyl	Cat#A90-107P; AB_67155
Kozí anti-myší IgG-ALP	MabTech	Cat#3310-4; AB_2890180
Bakteriální a virové kmeny		
SARS-COV-2-S	GenBank	QVE75681.1
SARS-CoV-2-S ^{B.1.617.2}	GenBank	EPI_ISL_4299998
SARS-COV-2-S ^{Omicron}	GenBank	EPI_ISL_7263803
Biologické vzorky		
RBD rekombinační protein	Uloženo v laboratoři	N/A
Chemikálie, peptidy a rekombinantní proteiny		
RBD-jeho protein	Sinobiologické	Cat#40592-V05H
RBD-mfc protein	Sinobiologické	Cat#40592-V05H
ACE2-jeho protein	Sinobiologické	Cat#10108-H08H
Kritické komerční testy		
LIVE/DEADTM fixovatelná sada na skvrny od mrtvých buněk	Invitrogen	Cat#L34976
Souprava pro stanovení cytokinů u myší a potkanů	Bio-RAD	Kočka#10014905
Experimentální modely: Buněčné linie		
HEK 293T	ATCC	N/A
293F buňky	ATCC	N/A
Experimentální modely: Organismy/kmeny		
Balb/c myši; samice	Experimentální zvířecí centrum Chongqing Medical University	N/A
Software a algoritmy		
Graphpad Prism 8	Graphpad Prism 8	N/A

REAGENT nebo RESOURCE	ZDROJ	IDENTIFIKÁTOR
Flow jo verze 10.5.2.	Flow jo verze 10.5.2.	N/A
jiný		
6-jamkové destičky pro kultivaci buněk	Thermo Fisher	Cat#140675
Corning CellBIND Povrch 100 mm Kultivační miska	Corning	Cat#3296
Souprava pro detekci myších cytokinů Bio-plex	Bio-práce	Kat#M60000007A
Desky ELISPOT	Thermo Fisher	Cat#AB2384B

Dostupnost zdrojů

Vedoucí kontakt

Požadavky na zdroje a reagentie směřujte na vedoucí kontaktní osobu A.-SJ (aishunjin@cqmu.edu.cn).

Dostupnost materiálů

Všechna činidla a materiály budou k dispozici na vyžádání po dokončení dohody o převodu materiálů.

Experimentální model a detaily předmětu

Buněčné linie

Získali jsme buňky HEK 293T a 293F z AmericanType Culture Collection (ATCC). Buňky Daudi a buňky ACE2-HEK 293T byly uchovávány v naší laboratoři. Buňky HEK 293T a HACE2-293T byly kultivovány v Dulbecco modifikovaném Eagle médiu (Gibco™, USA) doplněném 10% fetálním bovinním sérem (Gibco, USA), 100 mg/ml streptomycinu a 100 U/ml penicilinu při 37 °C a 5% CO₂. Buňky Daudi byly kultivovány v médiu DMEM doplněném 10% fetálním bovinním sérem (Gibco™, USA), 100 mg/ml streptomycinu a 100 U/ml penicilinu při 37 °C a 5% CO₂.

Plazmidy

- *pWPXL*, *pMD2.G* a *pSPAX2* v této studii byly uloženy do Centra pro imunologický výzkum Lékařské univerzity v Chongqing.

- Restrikční místo EcoRI vektoru *pMD2.G* bylo syntetizováno a klonováno do SARS-COV-S s 19 aminokyselinami chybějícími na uhlíkovém konci.

- Luciferázový reportérový vektor *pWPXL* (*pWPXL*-luciferáza) zkonstruovaný N. Landauem poskytl Prof. Chiguo Cai z Wuhan University (Wuhan, Čína).

- Plazmid *pMD2.G* exprimující VSV-G poskytl Prof. Ding Xue z Tsinghua University (Peking, Čína).

- Expresní plazmid lidského ACE2 byl získán od GeneCopoeia (Guangzhou, Čína).

Produkce a čištění RBD proteinu

Ersi1919-514 aa byl klonován do savčího expresního vektoru pcDNA 3.4, který exprimuje divoký typ SARS-CoV-2 RBD proteinu (zbytek 334-526), který se nachází proti směru signálního peptidu myšního IgG, AviTag a 6× Jeho štítek. Rekombinantní protein SARS-CoV-2 RBD byl exprimován v buňkách 293F (ATCC) po dobu 7 dnů, než byl purifikován pomocí afinitní chromatografie na koloně HisTrap (GE Healthcare).

Myší kmeny

Myši Balb/c použité v této studii byly uloženy do výzkumného střediska zvířat Chongqing Medical University. Myši byly chovány ve skupinách náhodně v individuálně větraných klecích Myši byly

chovány ve světelném cyklu 12:12 při 30–70% vlhkosti a poskytovala se jim voda obsahující sulfatrim a standardní strava.

Podrobnosti metody

Institucionální schválení

Všechny pokusy na zvířatech popsané v této studii byly přezkoumány a schváleny Institutional Animal Care and Use and Committee of Chongqing Medical University (CQMU202104).

Strategie imunizace myší

50 µg RBD rekombinantního proteinu (Sinobiological: #40592-V05H) bylo rozpuštěno ve 100 µl PBS a poté formulováno ve Freundově kompletním adjuvans (Sigma: #9007-81-2) nebo Freundově neúplném adjuvans (Sigma: #F5506) at. poměr 1,2:1. Čtyři subkutánní imunizace byly podávány v konvenční skupině (v týdnech 0, 2, 4 a 6). Nebo bylo podáno šest subkutánních imunizací v rozšířené skupině (v týdnech 0, 2, 4, 6, 9 a 12). V den 10 po každé imunizaci byla odebrána krev z ocasní žíly a okamžitě použita pro analýzu protilátek.

Sérová ELISA

RBD-specifické titry IgG, IgG1 a IgG2a protilátek v séru imunizovaných myší byly detekovány pomocí ELISA. 20 ul RBD proteinu (Sinobiological: #40592-V05H, 3 ug/ml) bylo přidáno do 384jamkové destičky a poté inkubováno přes noc při 4 °C. Po promytí byly destičky blokovány blokovacím pufrem (5% BSA plus 0,05% Tween 20) při 37 °C po dobu 1 hodiny a inkubovány s 20 ul testovacího myšího séra s desetinásobným sériovým ředěním při 37 °C po dobu půl hodiny. Reagované myší sérum bylo detekováno pomocí HRP-konjugované kozí anti-myší IgG H&L sekundární protilátky (Abcam: #ab6789, 1: 10000), HRP-konjugované kozí anti-myší IgG1 H&L (Bethyl: #A90-105P, 1: 10000) a HRP-konjugovaný kozí anti-myší IgG2a H&L (Bethyl: #A90-107P, 1:10000).

IgG ELISPOT

Myší splenocyty byly stimulovány R848 (Sigma: #SML0196-10MG, 2 µg/ml) a myším IL-2 (PeproTech: #212-12-20UG, 100 U/ml) po dobu šesti dnů, aby se indukovaly diferenciaci paměťových B buněk na plazmatické buňky. IgG ELISPOT test byl proveden tak, jak je popsáno, a s menší modifikací ([Gao et al., 2021](#)). K aktivaci destiček ELISPOT (Millipore: #0038401-5) za méně než 1 minutu byl použit 35% alkohol se sterilní vodou a kapalina byla odstraněna. 50 µl RBD (Sinobiological: #40592-V05H, 10 mg/ml) bylo přidáno na destičky přes noc při 4 °C. Potom 5×10^5 splenocyty na jamku byly nasazeny na destičky a stimulovány po dobu 36 hodin proteinem RBD (Sinobiological: #40592-V05H, 10 mg/ml). Jako negativní kontrola byla provedena stimulace ekvimolárním objemem média. Následně byly destičky vyvolány kozím anti-myším IgG-ALP (MabTech: #3310-4, 1:1000). Skvrny IgG byly vyvinuty substrátem BCIP/NBT plus (MabTech: #3650-10, 50 µL) a kvantifikovány pomocí čtečky AID ELISPOT (AID, Německo). Pro kvantifikaci pozitivních RBD-specifických odpovědí byly výsledky vyjádřeny jako počet RBD-specifických IgG bodů na 5×10^5 splenocytů každé myši. IgG skvrny = (RBD-stimulovaná jamka č. 1 - nestimulovaná jamka č. 1) + (RBD-stimulovaná jamka č. 2 - nestimulovaná jamka č. 2)/2.

Imunofluorescence

Sleziny imunizovaných myší byly odděleny 7. den po konečné imunizaci a zalaty do sloučeniny pro optimální teplotu řezu (OCT) (SAKURA: #4583). Tkáně byly zmrazeny v kapalném dusíku před nařezáním (7 µm) na kryostatu. Po fixaci ve studeném acetonu a blokování 5% FBS v PBS při teplotě místnosti (RT) po dobu 1 hodiny byly řezy inkubovány s biotinylovanou PNA (VECTOR: #FL-1071-5, 1:100) přes noc při 4 °C. DyLight 488 Streptavidin (BioLegend: #405218, 1:100) byl použit jako sekundární protilátka při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny a následně s Alexa Fluor647-konjugovaným anti-myším CD45R (BioLegend: #103226, 1:150) při teplotě místnosti po dobu 1 hodiny. Po obarvení byly řezy skenovány pomocí přístroje Panoramic SCAN (3DHISTECH, Maďarsko).

Lymfocyty z krve nebo sleziny imunizovaných myší byly odebrány 7. den po poslední imunizaci a analyzovány průtokovou cytometrií. Mrtvé buňky byly vyloučeny barvením životaschopnosti a adherentní buňky byly vyloučeny SSC/A a SSC/H gating analýzou. Buňky byly analyzovány průtokovou cytometrií BD LSRFortessa™ (BD Biosciences, USA). Data byla získána a analyzována pomocí Flow Jo verze 10.5.2. LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit (Invitrogen: #L34976) byl použit pro barvení životaschopnosti. Pro povrchové barvení byly splenocyty obarveny následujícími protilátkami: APC anti-myší CD19 (klon: 1D3/CD19, Biolegend), PE anti-myší CD138 (Syndecan-1) (klon: 281-2, Biolegend), FITC anti-myš/krysa/člověk CD27 (klon: LG.3A10, Biolegend), PE anti-myší CD279 (PD-1) (klon: 29F.1A1, Biolegend), PE/Cyanine7 anti-myší CD4 (klon: GK1.5, biolegenda), a APC/Cyanine7 anti-myší CD185 (CXCR5) (klon: L138D7, Biolegend) pro analýzu Tfh buněk; s FITC anti-myší/lidský GL7 antigen (klon: GL7, Biolegend), PerCP/Cyanine5.5 anti-myší CD95 (Fas), (klon: SA367H8, Biolegend) a Alexa Fluor® 647 anti-myší/lidský CD45R/ B220 (klon: RA3-6B2, BD Pharmingen™) mAb pro analýzu GC B buněk. Alexa Fluor 700 anti-myší CD3 (klon: 17A2, Biolegend), PE anti-myší CD8a (klon: 53-6.7, Biolegend), Brilliant Violet 605™ anti-myší CD69 (klon: H1.2F3, Biolegend), APC anti-myš CD137 (klon: H1.2F3, Biolegend), APC anti-myší CD279 (klon: RMP1-30, Biolegend), PE anti-myší CD223 (klon: C9B7W, Biolegend), Brilliant Violet 605™ anti-myší/lidský CD44 (klon: IM7, Biolegend), Brilliant Violet 421™ anti-myší CD62L (klon: MEL-14, Biolegend). Pro intracelulární barvení, Alexa Fluor® 488 anti-myší FOXP3 (klon:

Odeberte buňky sleziny a promyjte 1× v barvicím pufu. Odstředujte 5 minut při $500 \times g$. Po odsátí supernatantu resuspendujte buněčnou peletu ve 100 μ l barvicího pufu obsahujícího optimální koncentraci protilátek konjugovaných s fluorochromem specifických pro antigeny buněčného povrchu. Inkubujte 20 minut při teplotě místnosti ve tmě a další promyjte 1x v barvicím pufu. Fixujte a

permeabilizujte buňky přidáním 500 µl fixačního/permeabilizačního roztoku (BD: #554714) a dále inkubujte při teplotě místnosti ve tmě po dobu 20 minut. Odstředte 5 minut, 500 × *g*. Po odsátí supernatantu resuspendujte buněčnou peletu ve 100 µl BD Perm/Wash™ pufri obsahujícího optimální koncentraci anticytokinové protilátky konjugované s fluorochromem pro intracelulární barvení. Barvete 30 minut při teplotě místnosti ve tmě. Promyjte buňky přidáním 2 ml pufri BD Perm/Wash™. Odstředování 5 minut, 500 × *g*. Odsajte supernatant. Resuspendujte buněčnou peletu v 500 µl PBS a analyzujte průtokovou cytometrií.

Produkce a titrace detekce pseudovirů SARS-CoV-2

pVSVG exprimující SARS-CoV-2 spike (S) protein byl zkonstruován za použití VSV-G pseudotypizovaného AG-luciferázového plazmidu. Kódoval buď S protein SARS-CoV-2, byl vytvořen B.1.617.2 a Omicron (BA.1). Lenti-X293T buňky byly pěstovány do 70% konfluency před transfekcí směsnými plazmidy VSV-G pseudotypizované AG-luciferázy, pWPXL a pSPAX2. Tyto buňky byly kultivovány přes noc při 37 °C s 5% CO₂. K naočkovaným buňkám bylo přidáno DMEM (Gibco, USA) doplněné 5% fetálním bovinním sérem (Gibco, USA) a 100 IU/ml penicilinu (beyotimem, Čína) a 100 µg/ml streptomycinu (beyotimem, Čína). byly kultivovány přes noc po dobu 48 hodin. Supernatant byl sklizen, filtrován přes 0,45 µm filtr a centrifugován při 300 *g* po dobu 7 minut, aby se shromáždil supernatant, pak byly rozděleny na alikvoty a uskladněny při -80 °C. Titry pseudovirů byly detekovány Lenti-X qRT-PCR Titration Kit (Takara, Japonsko), podle pokynů výrobce.

Neutralizační test pseudovirů

Pseudoviry a myší sérum byly vytvořeny tak, jak je popsáno výše. 50 µl sériově zředěného myšího séra bylo inkubováno s pseudoviry (1 × 10⁹ kopií/ml) při 37 °C po dobu 1 hodiny. Tyto směsi pseudoviru a séra byly přidány ke společné kultivaci s buňkami hACE2-293T. Po 72 hodinách byly luciferázové aktivity hACE2-293T buněk

analyzovány Bright-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Čína). Relativní luminiscenční jednotka aktivity Luc byla detekována pomocí čtečky ThermoFisher LUX (ThermoFisher, USA). Všechny experimenty byly provedeny alespoň třikrát a vyjádřeny jako průměr \pm SEM. Poloviční maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) násobků ředění byly vypočteny pomocí čtyřparametrové logistické regrese s proměnnou strmostí dávka-odpověď-inhibice v GraphPad Prism 8.0.

Konkurenční ELISA

20 μ l RBD mfc proteinu (Sinobiological: #40592-V05H) bylo přidáno na 384-jamkovou destičku (Corning: #3570) do konečné koncentrace 0,2 μ g/ml při 4 °C přes noc. Následující den byla destička blokována blokovacím pufrům (5% BSA plus 0,05% Tween 20) po dobu 1 hodiny. Poté bylo do misek přidáno 20 ml myšního séra na jamku a 5násobná sériová ředění, inkubováno při 37 °C po dobu 40 minut a další stejný objem 0,2 μ g/ml ACE2-his proteinu (Sinobiological: #10108 -H08H) byla přidána inkubována při 37 °C po dobu 40 minut. Po promytí PBS byla kozí anti-myší IgG H&L sekundární protilátka (Abcam: #ab6789, 1:10000) inkubována s destičkami po dobu 30 minut při teplotě místnosti. Na destičku byl přidán TMB (MabTech: #3652-F10), zastaven 1 mol/l HCl a poté kvantitativně detekován. Polovina maximální inhibiční koncentrace (IC_{50}) byla stanovena pomocí čtyřparametrové logistické regrese. Procento inhibice bylo vypočteno následovně: % inhibice = $[(A-Blank)-(P-Blank)]/(A-Blank) \times 100$, kde A je maximální OD signál vazby RBD na ACE2-his, když žádný bylo přítomno sérum a P je OD signál vazby RBD na ACE2-his v přítomnosti séra v daném ředění.

Test cytokinů

Myší sérum bylo naředěno 1:4 ředidlem vzorků Bio-Plex (Bio-RAD, Mouse and Rat cytokines Assays kit: #10014905). Naředěné (1 \times) perličky protřepejte na vortexu po dobu 20 sekund a přidejte 50 μ l do každé jamky testovací destičky. Promyjte destičku dvakrát 100 μ l promývacího pufru Bio-Plex. Do každé jamky přidejte 50 μ l vzorků, standardy a slepý pokus a inkubujte na třepače při 850 ot./min. RT

po dobu 30 minut. Poté destičku třikrát promyjte 100 μ l promývacího pufru a přidejte 25 μ l zředěných (1 \times) detekčních protilátek do každé jamky a inkubujte na třepačce při 850 ot./min. RT po dobu 30 minut. Po promytí přidejte 50 μ l naředěného (1 \times) SA-PE do každé jamky a inkubujte na třepačce při 850 ot./min. RT po dobu 30 minut. Promyjte destičku třikrát 100 μ l promývacího pufru. Resuspendujte kuličky ve 125 μ l testovacího pufru a protřepávejte destičku při 850 otáčkách za minutu po dobu 30 sekund. Odstraňte těsnicí pásku a odečtěte štítek pomocí níže uvedeného nastavení.

Kvantifikace a statistická analýza

Data byla statisticky analyzována pomocí softwaru GraphPad Prism verze 8.0. Číselné výsledky jsou uvedeny jako střední směrodatná odchylka. Kvantitativní data v histogramech, spojnicových grafech a jednotlivých datových bodech byla prezentována jako průměr \pm SEM. Statistické analýzy byly provedeny pomocí dvoustranných nepárových Studentových t-testů. $p < 0,05$ bylo kritériem pro statisticky významné skupinové rozdíly.

Poděkování

Studie byla podpořena projektem nouzového výzkumu viru SARS-CoV-2 z Chongqing Medical University .

Autorské příspěvky

Konceptualizace a supervize, A.-SJ; metodologie, F.-XG, R.-XW, J.-JH, S.-YS; vyšetřování, T.-TL, CH, M.-YS, S.-M., F.-YL, S.-YS, Y.-NH, X.-JH, QC, YM.W., LL, S.-LL; psaní-originál, F.-XG a R.-XW; financování získávání a zdrojů, A.-SJ; všichni autoři diskutovali a komentovali rukopis.

Prohlášení o zájmech

Autoři neuvádějí žádné konkurenční zájmy.

Začlenění a rozmanitost

Podporujeme inkluzivní, různorodé a spravedlivé provádění výzkumu.

Doplňující informace

 [Stáhnout : Stáhnout soubor Acrobat PDF \(2 MB\)](#)

Dokument S1. Obrázky S1–S3 .

Dostupnost dat a kódů

Tato studie nevygenerovala původní kód. Jakékoli další informace potřebné k opětovné analýze údajů uvedených v tomto dokumentu jsou na vyžádání k dispozici u [vedoucího kontaktu](#) . Všechna data získaná v této studii jsou zahrnuta v publikovaném článku a jeho doplňujících informacích nebo jsou na vyžádání k dispozici u [hlavního kontaktu](#) .

Reference

Atmar a kol., 2022

Atmar RL , Lyke KE , Deming ME , Jackson LA , Branch AR , El Sahly HM , Rostad CA , Martin JM , Johnston C , Rupp RE a kol .
Homologní a heterologní posilovací očkování proti Covid-19

N. Engl. J. Med. , 386 (2022) , s . 1046–1057

[CrossRefZobrazit záznam ve ScopusuGoogle Scholar](#)

Cerqueira-Silva a kol., 2022

T. Cerqueira-Silva , V. de Araujo Oliveira , E. Paixão S. , J. Júnior B. , G. Penna O. , G. Werneck v. , N. Pearce , M. Barreto L. , V. Boaventura S. , M. Barral-Netto , a kol.

Doba trvání ochrany CoronaVac plus heterologní booster BNT162b2 v období Omicron v Brazílii

Nat. Commun. , 18 (2022) , str. 13

[Zobrazit záznam ve ScopusuGoogle Scholar](#)

Chakrabarti a kol., 2022

S. Chakrabarti , SS Chakrabarti , G. Chandan , U. Kaur , BK Agrawal
Účinnost vakcíny ChAdOx1 nCoV-19 během nárůstu delta (B.1.617.2) varianty v Indii

Lancet Infect. Dis. , 22 (2022) , str . 446-447

Článek  [Stáhnout PDF](#)[Zobrazit záznam ve Scopusu](#)[Google Scholar](#)

Cheng a kol., 2022

S.M.S. Cheng, C.K.P. Mok, Y.W.Y. Leung, S.S. Ng, K.C.K. Chan, F.W. Ko, C. Chen, K. Yiu, B.H.S. Lam, E.H.Y. Lau, *et al.*

Neutralizační protilátky proti SARS-CoV-2 Omicron varianta BA.1 po homologní a heterologní vakcinaci CoronaVac nebo BNT162b2

Noc. S. , 28 (2022) , str . 486-489

CrossRef[Zobrazit záznam ve Scopusu](#)[Google Scholar](#)

Damo a Joshi, 2019

M.Damo , N.S. Joshi_ _

Treg buňky IL-10 a IL-35 vyčerpávají CD8(+) T buňky v nádorech

Nat. Immunol. , 20 (2019) , str . 674-675

CrossRef[Zobrazit záznam ve Scopusu](#)[Google Scholar](#)

Elliott a kol., 2022

T. Elliott , H. Cheeseman M. , A. Evans B. , S. Day , L. McFarlane R. , J. O'Hara , M. Kalyan , F. Amini , T. Cole

Posílené imunitní reakce po heterologní vakcinaci vakcínami COVID-19 s autoamplifikující RNA a mRNA

PLoS. Patog. , 10 (2022) , str. 18 - 28

Google Scholar

Fahrner a kol., 2022

JE Fahrner , I. Lahmar , AG Goubet , Y. Haddad , A. Carrier , M. Mazzenga , D. Drubay , C. Alves Costa Silva , Lyon COVID Study Group , E. de Sousa a *kol.*

Polarita a specificita antivirových odpovědí T lymfocytů určuje náchylnost k infekci SARS-CoV-2 u pacientů s rakovinou a zdravých jedinců.

Cancer Discov. , 12 (2022) , str . 958-983

Field a kol., 2020

CS Field , F. Baixauli , RL Kyle , DJ Puleston , AM Cameron , DE Sanin , KL Hippen , M. Loschi , G. Thangavelu , M. Corrado a *kol.*

Integrita mitochondrií regulovaná metabolismem lipidů je vnitřním kontrolním bodem buňky pro supresivní funkci Treg

Cell Metab. , 31 (2020) , str . 422–437.e5

Gao a kol., 2021

F. Gao , J. Huang , T. Li , C. Hu , M. Shen , S. Mu , F. Luo , S. Song , Y. Hao , W. Wang a *kol.*

Vysoce konzervovaný kandidát na peptidovou vakcínu aktivuje humorální i buněčnou imunitu proti variantním kmenům SARS-CoV-2

Přední. Immunol. , 12 (2021) , str. 789905

Gruell a kol., 2022

H. Gruell , K. Vanshylla , P. Tober-Lau , D. Hillus , P. Schommers , C. Lehmann , F. Kurth , LE Sander , F. Klein

mRNA booster imunizace vyvolává silnou neutralizační aktivitu séra proti SARS-CoV-2 Omicron variantě

Nat. Med., 28 (2022), pp. 477-480

Halfmann et al., 2022

P. Halfmann J., S. Iida, K. Iwatsuki-Horimoto, T. Maemura, M. Kiso, S. Scheaffer M., T. Darling L., A. Joshi, S. Loeber, G. Singh, *et al.*

SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters

Nature, 603 (2022), p. 7902

[Google Scholar](#)

Han et al., 2013

Q. Han, P. Lan, J. Zhang, C. Zhang, Z. Tian

Reversal of hepatitis B virus-induced systemic immune tolerance by intrinsic innate immune stimulation

J. Gastroenterol. Hepatol., 28 (2013), pp. 132-137

Lavinder and Ippolito, 2022

Lederer et al., 2022

K. Lederer, E. Bettini, K. Parvathaneni, M.M. Painter, D. Agarwal, K.A. Lundgreen, M. Weirick, K. Muralidharan, D. Castaño, R.R. Goel, *et al.*

Germinal center responses to SARS-CoV-2 mRNA vaccines in healthy and immunocompromised individuals

Cell, 185 (2022), pp. 1008-1024.e15

Lin et al., 1998

Y. Lin, J. Goebels, G. Xia, P. Ji, M. Vandeputte, M. Waer

Induction of specific transplantation tolerance across xenogeneic barriers in the T-independent immune compartment

Nat. Med., 4 (1998), pp. 173-180

Naranbhai et al., 2022

V. Naranbhai, A. Nathan, C. Kaseke, C. Berrios, A. Khatri, S. Choi, M.A. Getz, R. Tano-Menka, O. Ofoman, A. Gayton, *et al.*

T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals

Cell, 185 (2022), p. 1259

Perez-Then et al., 2022

E. Perez-Then, C. Lucas, V.S. Monteiro, M. Miric, V. Brache, L. Cochon, C.B.F. Vogels, A.A. Malik, E. De la Cruz, A. Jorge, *et al.*
Neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 Delta and Omicron variants following heterologous CoronaVac plus BNT162b2 booster vaccination

Nat. Med., 28 (2022), pp. 481-485

Regev-Yochay et al., 2022

G. Regev-Yochay, T. Gonen, M. Gilboa, M. Mandelboim, V. Indenbaum, S. Amit, L. Meltzer, K. Asraf, C. Cohen, R. Fluss, *et al.*
Efficacy of a fourth dose of Covid-19 mRNA vaccine against Omicron

N. Engl. J. Med., 386 (2022), pp. 1377-1380

Reynolds et al., 2022

C.J. Reynolds, C. Pade, J.M. Gibbons, A.D. Otter, K.M. Lin, D. Muñoz Sandoval, F.P. Pieper, D.K. Butler, S. Liu, G. Joy, *et al.*
Immune boosting by B.1.1.529 Omicron) depends on previous SARS-CoV-2 exposure

Science, 377 (2022), p. eabq1841

Rizzuto et al., 2022

Swadling et al., 2022

L. Swadling, M. Diniz O., N. Schmidt M., O. Amin E., A. Chandran, E. Shaw, C. Pade, J. Gibbons M., N. Le Bert, A. Tan T., *et al.*
Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2

Nature, 601 (2022), p. 7891

Google Scholar

Tanne, 2022

Tarke et al., 2022

A. Tarke, C. Coelho H., Z. Zhang, J. Dan M., E. Yu D., N. Methot, N. Bloom I., B. Goodwin, E. Phillips, S. Mallal, *et al.*

SARS-CoV-2 vaccination induces immunological T cell memory able to cross-recognize variants from Alpha to Omicron

Cell, 3 (2022), p. 185

Thiruvengadam et al., 2022

R. Thiruvengadam, A. Awasthi, G. Medigeshi, S. Bhattacharya, S. Mani, S. Sivasubbu, T. Shrivastava, S. Samal, D. Rathna Murugesan, B. Koundinya Desiraju, *et al.*

Effectiveness of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2 infection during the delta (B.1.617.2) variant surge in India: a test-negative, case-control study and a mechanistic study of post-vaccination immune responses

Lancet Infect. Dis., 22 (2022), pp. 473-482

Turner et al., 2020

J.A. Turner, E. Stephen-Victor, S. Wang, M.N. Rivas, A. Abdel-Gadir, H. Harb, Y. Cui, M. Fanny, L.M. Charbonnier, J.J.H. Fong, *et al.*

Regulatory T cell-derived TGF-beta1 controls multiple checkpoints governing allergy and autoimmunity

Immunity, 53 (2020), pp. 1202-1214.e6

Walls et al., 2022

A.C. Walls, K.R. Sprouse, J.E. Bowen, A. Joshi, N. Franko, M.J. Navarro, C. Stewart, E. Cameroni, M. McCallum, E.A. Goecker, *et al.*

SARS-CoV-2 breakthrough infections elicit potent, broad, and durable neutralizing antibody responses

Cell, 185 (2022), pp. 872-880.e3

Wang et al., 2022

J. Wang, C. Deng, M. Liu, Y. Liu, L. Li, Z. Huang, L. Shang, J. Jiang, Y. Li, M. R, *et al.*

Four doses of the inactivated SARS-CoV-2 vaccine redistribute humoral immune responses away from the Receptor Binding Domain

Preprint at

medRxiv (2022), [10.1101/2022.02.19.22271215](https://doi.org/10.1101/2022.02.19.22271215).

[Google Scholar](#)

Young and Brink, 2021

C. Young, R. Brink

The unique biology of germinal center B cells

Immunity, 54 (2021), pp. 1652-1664

Zhou et al., 2021

D. Zhou, W. Dejnirattisai, P. Supasa, C. Liu, A.J. Mentzer, H.M. Ginn, Y. Zhao, H.M.E. Duyvesteyn, A. Tuekprakhon, R. Nutalai, *et al.*

Evidence of escape of SARS-CoV-2 variant B.1.351 from natural and vaccine-induced sera

Cell , 184 (2021) , str . 2348-2361.e6

Blížící se výzvy, které představují genetické varianty SARS-CoV-2

2022, Patogeny

4

Tito autoři přispěli stejnou měrou

5

Vedoucí kontakt

© 2022