

De immunologie achter SARS-CoV-2-afweerrespons, B en T!

Michiel Heron, Ailko Bossink, Hendrik Gremmels, Chantal Reusken, Johan Reimerink, Gijs Limonard, Kristin Kremer, Steven Thijsen

Samenvatting

Eind februari werd in Nederland de eerste COVID-19-patiënt gediagnosticeerd. Hoe het immuunsysteem de SARS-CoV-2-infectie precies bestrijdt en in hoeverre de respons adequaat is en langdurige bescherming biedt, is op dit moment nog niet duidelijk. In samenwerking met het RIVM is het Diaconessenhuis Utrecht een studie gestart om de immunrespons bij mensen met verschillende ernst van COVID-19 in kaart te brengen. In het laboratorium van de medische microbiologie van het Diaconessenhuis is een ELISpot ontwikkeld voor het meten van T-celreactiviteit tegen SARS-CoV-2-antigenen. Een recentelijk gepubliceerd artikel over de resultaten van de SARS-CoV-2-ELISpot wordt besproken, evenals de mogelijke rol van (geheugen) T-cellen in de afweer tegen SARS-CoV-2 (en gerelateerde virussen).

Abstract

The first COVID-19 patient was diagnosed in the Netherlands at the end of February. Exactly how the immune system fights the SARS-CoV-2 infection and to what extent the response is adequate, is not yet clear. The Diaconessenhuis Utrecht, in collaboration with the RIVM, has started a study to map the immune response in people with different severity of COVID-19 disease. In the medical microbiology laboratory of the Diaconessenhuis, an ELISpot has been developed for measuring T-cell reactivity against SARS-CoV-2 antigens. A recently published article on the results of the SARS-CoV-2-ELISpot is discussed, as well as the recent insights regarding the role of (memory) T-cells in the immune-defense against SARS-CoV-2 (and related viruses).

In Nederland zijn tot en met 1 september in totaal 71.129 COVID-19-patiënten gemeld en zijn 6230

mensen overleden.[1] Hoge leeftijd is een risicofactor voor een ernstig beloop van COVID-19; van de opgenomen patiënten was de helft 68 jaar of ouder en van de overleden patiënten was de helft 83 jaar of ouder. Zeventig procent van de mensen die jonger dan 70 jaar waren bij overlijden hadden onderliggend lijden, waarvan cardiovasculaire aandoeningen en hypertensie, diabetes en chronische longaandoeningen het vaakst voorkwamen.[1] In veel gevallen verloopt COVID-19 mild en/of symptomeloos. Naast deze risicofactoren speelt het humane afweersysteem waarschijnlijk een belangrijke rol in het beloop van de ziekte, die door het SARS-CoV-2-virus wordt veroorzaakt.

Hoe het immuunsysteem de SARS-CoV-2-infectie precies bestrijdt en in hoeverre de respons adequaat is en langdurige bescherming biedt, is op dit moment nog niet duidelijk. Ook is nog onbekend wat de rol en het belang is van de aangeboren en verworven humorale (B-lymfocyten, antistoffen) en cellulaire (T-lymfocyten, cytokines) afweer. Daarom zijn wij een studie gestart om de immunrespons bij mensen met verschillende ernst van COVID-19 in kaart te brengen. Daarnaast willen we inzicht krijgen in hoeverre de

Diakonessenhuis, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, M. Heron, medisch immunoloog, H. Gremmels, afdeling medische microbiologie, S. Thijsen, arts-microbioloog; Diaconessenhuis, Utrecht, afdeling Longziekten, A. Bossink, longarts, G. Limonard, longarts; Centrum Infectieziektebestrijding, WHO referentielaboratorium voor COVID-19, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, C. Reusken, viroloog, J. Reimerink, onderzoeker emerging en zeldzame virussen, K. Kremer, coördinator bacteriële serologie. Correspondentieadres: M. Heron (mheron@diakhuis.nl).

verworven humorale en cellulaire respons in de tijd aantoonbaar blijft. Mogelijk biedt dit aanknopingspunten om te beoordelen of deze respons bescherming biedt tegen herinfectie, en om de effectiviteit van een vaccin mede te kunnen beoordelen.

Interactie tussen B- en T-lymfocyten

Drainerende lymfeklieren vormen een ontmoetingsplek voor antigeenpresenterende cellen en B- en T-lymfocyten. De interactie tussen deze cellen maakt herkenning van lichaamsvreemde antigenen mogelijk en kan de aanzet vormen tot een afweerrespons tegen een nieuw coronavirus.

Elke B-lymfocyt heeft een unieke B-celreceptor, die door willekeurige genherschikking tot stand is gekomen. De B-celreceptoren herkennen zowel oplosbare antigenen als membraangebonden antigenen van micro-organismen en kunnen deze na internalisatie verwerken. Vervolgens komen peptidefragmenten van het antigeen terecht in het 'major histocompatibility'-complex (MHC) klasse II-complex. B-lymfocyten zullen na de eerste herkenning van het antigeen IgM-antistoffen gaan produceren. Om vervolgens tot IgG-antistofproductie te worden aangezet, moeten de door de B-lymfocyten in het MHC klasse II-complex gepresenteerde antigenen worden herkend door specifieke receptoren op geactiveerde CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten, ook aanwezig in de lymfeklieren. De interactie tussen de B- en T-lymfocyten wordt versterkt door co-stimulerende signalen, en vindt plaats in aanwezigheid van specifieke cytokines (onder meer interleukine (IL)-6 en IL-21). Dit stelt de B-lymfocyten in staat tot het maken van de isotypeswitch van IgM- naar IgG-antistoffen.[2] Daarnaast vindt affiniteitsrijping van de B-lymfocyten plaats, door selectie op grond van bindingssterkte van de B-celreceptor met het antigeen, en de vorming van geheugen-B-lymfocyten. De specifieke CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten zijn tevens noodzakelijk voor het activeren van antigeenspecifieke CD8⁺-T_{cytotoxische}-lymfocyten die zorgen voor het opruimen van virusgeïnfecteerde cellen. De productie van interferon-gamma (IFN-gamma) door de geactiveerde T-lymfocyten is essentieel voor de effectiviteit van de afweerrespons tegen intracellulaire bacteriële en virale infecties.

Humorale afweer tegen SARS-CoV-2

Voor het stellen van de diagnose COVID-19 wordt meestal gebruikgemaakt van de detectie van SARS-CoV-2-RNA via real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Voor detectie van SARS-CoV-2-specifieke antistoffen zijn in korte tijd verschillende testmethoden beschikbaar gekomen. Deze maken gebruik van verschillende, specifieke SARS-CoV-2-antigenen (S1-domein van het spike-eiwit, combinatie S1/S2-domein, receptorbindend domein van het spike-eiwit, nucleocapside-eiwit) die op unieke wijze gekoppeld zijn aan verschillende soorten vaste dragers (cellulose-strip, gecoat op een plastic plaat, gebonden aan beads). Verschillende substraatreacties worden gebruikt om de binding van antistoffen aan te tonen. Testen gebaseerd op het principe van laterale flow immuno assay (LFIA) en enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) kwamen het eerst op de markt, gevolgd door onder meer chemoluminescentie immuno assay (CLIA)-testen op geautomatiseerde systemen.

Inmiddels zijn diverse wetenschappelijke publicaties verschenen waarin serologische testen met elkaar worden vergeleken, en waarin de sensitiviteit van deze testen ten opzichte van PCR-bewezen ziekte en ernst van de ziekte en de specificiteit ten opzichte van andere coronavirussen zijn vastgesteld. Bovendien is er steeds meer inzicht in de correlatie tussen serologische routinetesten en de aanwezigheid van functionele antistoffen zoals neutraliserende antistoffen.[3] De testspecificaties zijn verschillend, afhankelijk van de ziekteduur en de ernst van de ziekte. Dit hangt ook samen met het type immunoglobuline dat wordt aangetoond, IgM, IgA, IgG of totaal-Ig-antistoffen. Globaal blijken SARS-CoV-2-antistoffen tussen 7 en 14 dagen na begin van de ziektesymptomen aantoonbaar. Naarmate het aantal ziektedagen langer en de ziekte ernstiger is, nadert de sensitiviteit van de meeste laboratorium IgG-testen de 95 procent of hoger. In Nederland verzamelt en deelt de Taskforce Serologie validatiedata, die worden aangeleverd door deelnemende medisch-microbiologische laboratoria. De rapportage van deze data is vrij toegankelijk en regelmatig worden geactualiseerde versies uitgebracht.[4]

Cellulaire afweer tegen SARS-CoV-2

Over de verworven cellulaire T-celrespons gericht tegen SARS-CoV-2-eiwitten is nog weinig bekend. Verschillende studies suggereren een onderdrukte T-celimmunititeit bij patiënten met ernstige COVID-19, gebaseerd op een verlaagd absoluut aantal circulerende T-lymfocyten of afwijkende IFN-gamma-expressie door T-lymfocyten gemeten met behulp van flowcytometrie. [5,6]

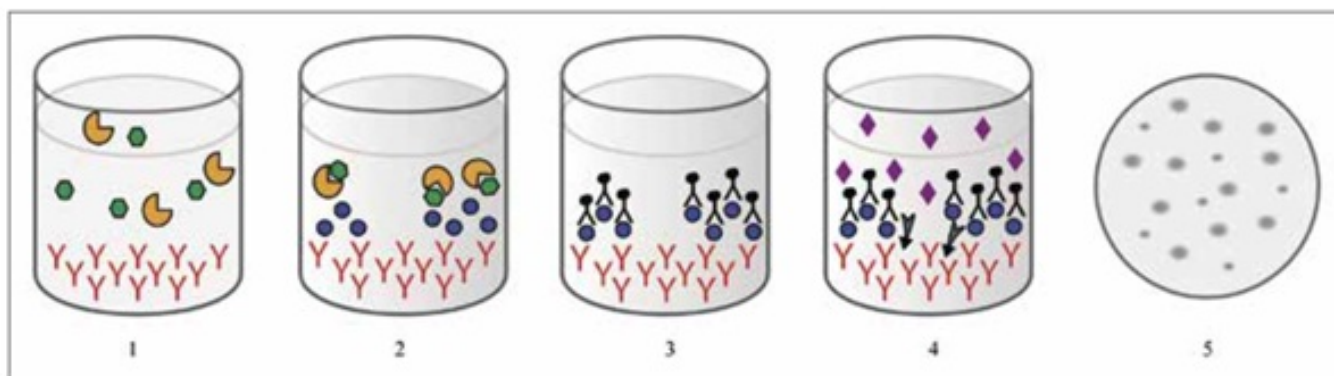
Zeer recent is een studie verschenen waarin SARS-CoV-2-eiwitpools zijn ingezet om te ontdekken welke SARS-CoV-2-eiwitten door specifieke T-lymfocyten van COVID-19-patiënten worden herkend, wederom gemeten met behulp van flowcytometrie. De resultaten lieten zien dat SARS-CoV-2-membraan-, spike- en nucleocapside-eiwitten codominant waren in herkenning door CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten. Bij CD8⁺ T_{cytotoxische}-lymfocyten was de reactie tegen het spike-eiwit minder dominant en werd significante reactiviteit aangetoond tegen membraan-, nucleocapside- en andere SARS-CoV-2-eiwitten. [7] In een andere recente studie werd aangetoond dat CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten van COVID-19-patiënten reageren met het SARS-CoV-2-spike-eiwit maar dat deze ook aantoonbaar waren bij SARS-CoV-2-seronegatieve gezonde donoren. [8] In beide artikelen wordt

gediscussieerd over de samenhang tussen aangetoonde T-celreactiviteit en gemeten antistoffen tegen het SARS-CoV-2-spike-eiwit en de mogelijke kruisreactiviteit met andere coronavirussen.

Een andere methode om de functionele T-celrespons tegen SARS-CoV-2-antigenen te bepalen is het meten van IFN-gamma-productie met behulp van een enzymelinked immunospot (ELISpot)-methode. In het laboratorium van de medische microbiologie van het Diaconessenhuis is een ELISpot ontwikkeld voor het meten van T-celreactiviteit tegen SARS-CoV-2- nucleocapside-antigenen en tegen een SARS-CoV-2-mozaïekproteïne, dat bestaat uit membraan-, nucleocapside- en spike-eiwitten (figuur 1).

De methode bestaat uit het isoleren van mononucleaire cellen uit het perifere bloed (peripheral blood mononuclear cells (PBMC's)) en het toevoegen van een bepaald aantal cellen in een well van een plaat die is gecoat met IFN-gammavangende antistoffen. De cellen worden gestimuleerd met een bepaalde concentratie SARS-CoV-2-specifieke antigenen, met medium als negatieve controle en een polyklonale activator als positieve controle (anti-humaan CD3-monoklonale antistof). Indien de antigenen worden herkend door de antigeenspecifieke

Figuur 1. Schematische weergave van het principe van de ELISpot test



- (1) De ELISpotplaat bestaat uit welltjes gecoat met antistoffen (rood) tegen IFN-gamma. Op de plaat worden mononucleaire cellen uit het perifere bloed ('peripheral blood mononuclear cells', PBMC's) (oranje) en SARS-CoV-2-eiwitten (groen) toegevoegd.
- (2) De PBMC's verwerken de SARS-CoV-2-eiwitten en presenteren stukjes van deze eiwitten aan de T-lymfocyten, die daarop IFN-gamma (blauw) produceren. De IFN-gamma wordt vervolgens gebonden aan de antistoffen tegen IFN-gamma op de bodem van de welltjes.
- (3) Na een incubatietijd van een nacht worden de welltjes gewassen, om ze van overvloedige PBMC's te ontdoen. Vervolgens wordt conjugaat toegevoegd (zwart), dat zich bindt aan het IFN-gamma-antistofcomplex.
- (4) Na opnieuw wassen wordt enzymsubstraat (paars) toegevoegd.
- (5) Na wassen en drogen zijn bij een positief resultaat stipjes zichtbaar op de bodem van de welltjes, waarbij elke stip overeenkomt met één SARS-CoV-2-specifieke IFN-gamma-producerende T-lymfocyt.

T-lymfocyten zullen ze IFN-gamma uitscheiden dat kan worden gevangen door de anti-IFN-gamma-antistoffen gecoat op de plaat. Na 16-20 uur stimulatie wordt het gebonden IFN-gamma gedetecteerd met behulp van een chromogeen substraat waardoor een gekleurde 'spot' ontstaat rond IFN-gamma producerende SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten. Een groot voordeel van deze test is dat het relatief eenvoudig is om spotvormende units te kwantificeren.

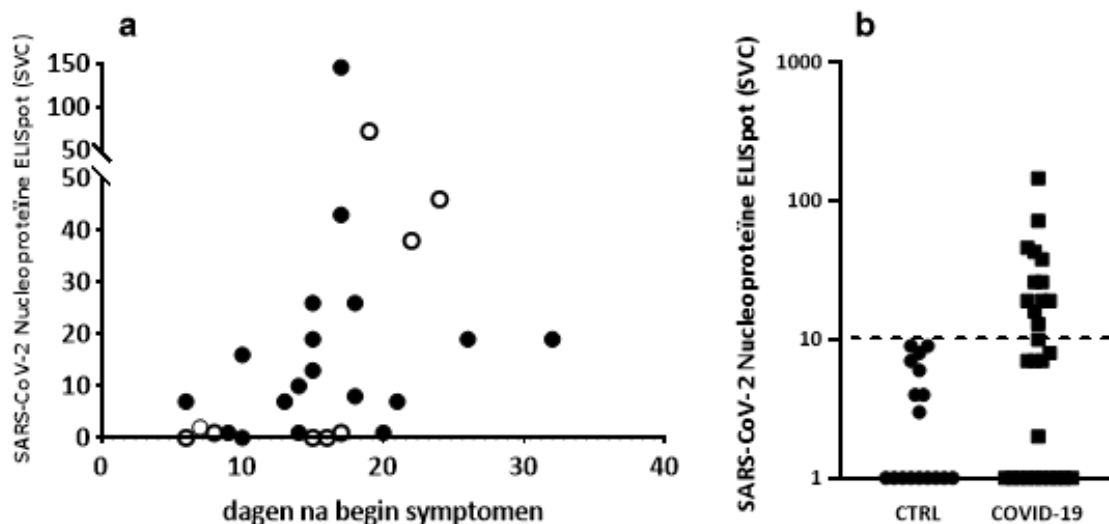
SARS-CoV-2-immunresponsstudie (SIR-studie)

Een recent in het *Journal of Infection* gepubliceerde studie, uitgevoerd in het Diakonessenhuis, toonde een robuuste T-celrespons tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit meetbaar met behulp van de ELISpot test na circa 10 ziekte-dagen bij COVID-19-patiënten opgenomen op de intensive care (IC) of op de longafdeling (n = 27) (figuur 2a). In een gezonde controlegroep (n = 16) waren nooit meer dan negen spots meetbaar. Tien of meer spots tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit werd dan ook beschouwd als diagnostisch voor COVID-19 (figuur 2b). Opvallend genoeg toonde een subset van de COVID-19-patiënten een vertraagde of onderdrukte respons. Vijf patiënten toonden vrijwel geen respons

en vier toonden een zwakke T-celrespons, aantoonbaar na 18 tot 32 ziekte-dagen.[9] De patiënten met de vertraagde of onderdrukte respons waren niet significant lymfopen, terwijl de respons op de positieve controle (polyklonale activator) wel significant lager was dan bij de COVID-19-patiënten zonder vertraagde of onderdrukte respons. Dit laatste zou kunnen wijzen op een vorm van uitputting van de T-lymfocyten.[10] In hoeverre dit correleert met ziekte-duur en ernst moet uit nader onderzoek blijken.

In samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) zal in een vervolgstudie de waarde van de SARS-CoV-2-ELISpot verder worden onderzocht. In de SARS-CoV-2-immunresponsstudie (SIR-studie) zullen COVID-19-patiënten worden vergeleken met gezonde deelnemers. COVID-19-patiënten worden een jaar gevolgd, en op vijf momenten gedurende het jaar zullen niet alleen SARS-CoV-2- (virus-neutraliserende) antistoffen maar ook de functionele T-celrespons met de SARS-CoV-2-ELISpot worden bepaald en gekwantificeerd. Hiermee hopen we inzicht te krijgen in de ontwikkeling van de immunrespons tegen SARS-CoV-2 bij patiënten met ernstige, matige en milde COVID-19. Met name in deze laatste groep zijn er

Figuur 2. T-celrespons tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit meetbaar met behulp van de ELISpot test, na circa 10 ziekte-dagen bij COVID-19 patiënten opgenomen op de intensive care (IC) of op de longafdeling



a) SARS-CoV-2-ELISpot nucleoproteïne IFN-gammaspotvormende cellen (SVC) in relatie tot het aantal dagen na begin van ziekte-symptomen. Open en gesloten rondjes betreffen COVID-19-patiënten opgenomen op respectievelijk de IC en de longafdeling.
 b) SARS-CoV-2-ELISpot nucleoproteïne IFN-gammaspotvormende cellen (SVC) bij een gezonde controlegroep (CTRL) en bij COVID-19-patiënten. De gestreepte lijn toont de afkapwaarde die is vastgesteld voor COVID-19.

aanwijzingen dat de humorale respons afwezig of vertraagd is en lijkt de virusneutraliserende capaciteit van het serum beperkt.[11] Het is echter opvallend dat in een Zweedse en een Franse studie (de laatste als preprint beschikbaar op internet) ook na langere tijd SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten zijn gemeten bij seronegatieve familieleden van COVID-19-patiënten en bij individuen die asymptomatische of milde COVID-19 hebben doorgemaakt. Bij een deel van niet aan SARS-CoV-2 blootgestelde individuen uit de controlegroep bleken SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten aantoonbaar specifiek voor het membraan en spike-eiwit, maar niet gericht tegen het nucleocapside-eiwit. [12,13] In een Singaporese studie werd echter aangetoond dat bij patiënten die hersteld waren van SARS of COVID-19, de specifieke T-lymfocyten juist gericht waren tegen het SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit. Bij hen waren er nauwelijks T-lymfocyten detecteerbaar die gericht waren tegen niet-structurele eiwitten (NSP), gecodeerd door ORF1-regio. In tegenstelling tot deze bevindingen bij herstelde patiënten, bleek bij donoren die niet aan SARS-CoV of SARS-CoV-2 waren blootgesteld, de specifieke T-celrespons voornamelijk gericht te zijn tegen niet-structurele eiwitten van SARS-CoV-2. Omdat de ORF1-regio van SARS-CoV, SARS-CoV-2 en andere dierlijke bètacoronavirussen vrijwel volledige homologie vertoont, leidt blootstelling aan dierlijke coronavirussen waarschijnlijk tot priming van deze T-lymfocyten. Dit is een mogelijke verklaring voor de aangetoonde kruisreactiviteit. In hoeverre kruisreactie van eventueel al aanwezige specifieke T-lymfocyten tegen het nucleocapside-eiwit of de NSP-ORF1-eiwitten van invloed zijn op SARS-CoV-2-infectie of COVID-19-ziektebeloop zal onderzoek moeten uitwijzen.[14] Er zijn al overzichtsartikelen verschenen van de gepubliceerde studies waarin SARS-CoV-2-specifieke T-cel-responsen zijn geanalyseerd.[15,16] De hierboven beschreven data laten zien dat blootstelling aan SARS-CoV-2 een virusspecifieke T-celrespons kan induceren met of zonder aantoonbare seroconversie. Detectie van SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten in samples van voor de COVID-19-pandemie (niet blootgesteld aan SARS-CoV of SARS-CoV-2) wijst mogelijk op kruisreactiviteit ten gevolge van blootstelling aan gewone humane verkoudheids-coronavirussen (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 en

HCoV-229E) en/of dierlijke coronavirussen. T-celreactiviteit tegen het SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit wordt bij individuen die niet zijn blootgesteld aan SARS-CoV of SARS-CoV-2, in de verschillende studies niet of minder dominant aangetoond.

De in het Diakonessenhuis ontwikkelde SARS-CoV-2-ELISpot biedt dus mogelijk aanvullende diagnostische waarde voor het bepalen van blootstelling aan en de immunusstatus tegen SARS-CoV-2. Of de aanwezigheid van een duurzame specifieke T-celrespons met of zonder antistoffen bescherming biedt tegen herinfectie met SARS-CoV-2 zal vervolgonderzoek moeten uitwijzen.

Referenties

1. RIVM. Epidemiologische situatie COVID-19 Nederland 01-09-2020. https://www.rivm.nl/sites/default/files/2020-09/COVID-9_WebSite_rapport_wekelijks_20200901_1353_0.pdf
2. den Haan JMM, Arens R, Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Imm Lett.* 2014;162:103-12.
3. Geurts-van Kessel CH, Okba NMA, Igloi Z, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Comm.* 2020;11:3436.
4. Taskforce Serologie, Landelijke Coördinatiestructuur Testcapaciteit, Status of the validation of ELISA and auto-analyser antibody tests for SARS-CoV-2 diagnostics: considerations for use. 2 July, 2020.
5. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-9.
6. Xu B, Fan CY, Wang AL, et al. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. *J Infect.* 2020;81(1):e51-e60.
7. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell.* 2020;181:1489-501.
8. Braun J, Loyal L, Frensch M, et al. Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440 (2020).
9. Thijsen S, Heron M, Gremmels H, et al. Elevated nucleoprotein-induced interferon- γ release in COVID-19 patients detected in a SARS-CoV-2 enzyme-linked immunosorbent spot assay. *Journal of Infection.* 2020;81:452-82.
10. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 11:827.
11. Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, et al. Differences in antibody kinetics and functionality between severe and mild SARS-CoV-2 infections. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.06.09.20122036.
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020; doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>.

13. Gallais F, Velay A, Wendling MJ, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.06.21.20132449.
14. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584:457-62.
15. Altmann M, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Science Immunology*. 2020;5(49):eabd6160.
16. Chen Z, Wherry EJ. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;1-8.