

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT  
MOLEKULAARPATOLOGIA UURIMISGRUPP

**SARS-CoV-2 suhtes resistentsete isikute immuunparameetrite  
uuring**

Bakalaureusetöö

12 EAP

Gerli Rukis

Juhendajad  
PhD Kai Kisand  
PhD Arnold Kristjuhan

TARTU 2024

## **SARS-CoV-2 suhtes resistentsete isikute immuunparameetrite uuring**

SARS-CoV-2 nakkuse kulg on väga varieeruv – haigus võib mööduda asümptomaatilisel või lõppeda halvimal juhul nakatunu surmaga. On ka neid, kes ei haigestu üldse ning kellel arvatakse olevat COVID-19 viirusevastane resistentsus. Raskeid haigusjuhte ning nende põhjuseid on palju uuritud, kuid resistentsuse kohta on vähem teadmisi, mistõttu aitaks selle uurimine viiruse patogeneesi paremini mõista. Selleks mõõdeti selles bakalaureusetöös vabatahtlike mittenakatunute verest tsütokiine, mida sekreteeriti T-rakulise vastusena SARS-CoV-2 antigeenidele, IFN $\alpha$  toodangut vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele ning autoantikehade esinemist I ja III tüüpi IFN-de vastu. Tulemusena leiti mittenakatunute hulgas ristreegervate T-rakkudega ja resistentsed inimesed ning viimaste puhul leiti osad kõrgete IFN $\alpha$  tasemetega inimesed, kelle puhul tuleks teostada edasine geeniuuring. Samuti ei leitud resistentsete isikute puhul I tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi.

**Märksõnad:** COVID-19, SARS-CoV-2, resistentsus, interferoonid, autoantikehad

**CERCS:** B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

## **Immunological parameters of SARS-CoV-2 resistant individuals**

The course of SARS-CoV-2 can vary a lot – it can be asymptomatic or in some cases even lead to death. There are also individuals who don't get infected despite being in intense contact with patients suffering from COVID-19, and who are therefore considered resistant against COVID-19. There has been a lot of research looking into the causes of severe cases of COVID-19 infection, but there's a lot less information available about resistant people. To get more insight into viral resistance and understand the pathology of this virus, those individuals must also be investigated. To do this, T cell response to viral antigens was measured from whole blood supernatants, secretion of IFN $\alpha$  after stimulating the samples with TLR7/8 and cGAS-STING signalling pathway ligands was determined and the presence of autoantibodies (AABs) against type I and type III interferons (IFNs) was examined. It was found that some of the non-infected patients had cross-reactive T cells and some were completely naive. There were no AABs against type I IFNs among these naive people and some individuals had high induced IFN $\alpha$  levels. The genetic causes behind this should be further investigated.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, resistance, interferons, autoantibodies

**CERCS:** B500 Immunology, serology, transplantation

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	8
1.1. Immuunkaitse viiruste vastu .....	8
1.2. SARS-CoV-2 viiruse iseloom .....	13
1.3. Raske haiguspildi põhjused.....	14
1.4. Resistentse võimalikud põhjused .....	16
2. EKSPERIMENTAALOSA / UURIMUS .....	17
2.1. Töö eesmärgid .....	17
2.2. Materjal ja meetodika .....	17
2.2.1 Küsimustik.....	17
2.2.2 Seerumi kogumine SYNLABis ja SARS-CoV-2 IgG määramine.....	17
2.2.3 Täisvere stimulatsioonid.....	18
2.2.4 Tsütokiinide määramine täisvere supernatantidest LegendPlex reagentikomplektiga .....	18
2.2.5 IFN $\alpha$ kontsentratsiooni määramine stimulatsioonide supernatantidest.....	19
2.2.6 Autoantikehade määramine vereseerumitest .....	20
2.2.7 Andmeanalüüs.....	20
2.3. Tulemused .....	21
2.3.1. Valim.....	21
2.3.2. T rakulise immuunvastuse määramine täisvere kultuuride stimulatsiooni abil SARS-CoV-2 viirusest pärit antigeenidega.....	22
2.3.3. Tsütokiinide keskmised tasemed ogavalguga stimuleeritud proovides erinevad SARS-CoV-2 IgG negatiivsetel ja positiivsetel inimestel.....	23
2.3.4. Resistentse võimalikud põhjused erinevate stimulatsioonide põhjal.....	24
2.3.5. IFN $\alpha$ tasemetes olulisi erinevusi gruppide vahel ei tuvastatud.....	25
2.3.6. Resistentsetel isikutel puuduvad autoantikehad I tüüpi interferoonide vastu.....	27
2.4. Arutelu.....	28

KOKKUVÕTE .....	31
SUMMARY .....	32
TÄNUSÕNAD .....	33
KIRJANDUSE LOETELU .....	34
LISAD .....	40
LISA 1.....	40
LISA 2.....	44
LISA 3.....	45
LISA 4.....	46
LISA 5.....	47
LIHTLITSENTS.....	49

## KASUTATUD LÜHENDID

- AAB – autoantikehad (ingl *autoantibodies*)
- ACE2 – angiotensiini muundav ensüüm 2 (ingl *angiotensin-converting enzyme 2*)
- APC – antigeeni presenteeriv rakk (ingl *antigen presenting cell*)
- ARDS – äge respiratoorse distressi sündroom (ingl *acute respiratory distress syndrome*)
- cGAMP – signaalmolekul tsükliline GMP-AMP (ingl *cyclic GMP-AMP*)
- COVID-19 – koroonaviirushaigus (ingl *coronavirus disease 2019*)
- CTL – tsütotoksiline T-rakk (ingl *cytotoxic T lymphocyte*)
- DAMP – koekahjustuseseselised molekulaarsed mustrid (ingl *damage-associated molecular patterns*)
- DC – dendriitakud (ingl *dendritic cells*)
- IEI – viirusvastase süsteemi kaasasündinud defektid (ingl *inborn errors of immunity*)
- IFN – interferoon (ingl *interferon*)
- IFNAR – I tüüpi IFN-de retseptor (ingl *type I interferon receptor*)
- IL – interleukiin (ingl *interleukin*)
- ILC – loomuliku immuunsuse lümfaatilise rea rakk (ingl *innate lymphoid cell*)
- IQR – kvartiilidehaare, (ingl *interquartile range*)
- IRF – transkriptsioonifaktor, mis suurendab esimest tüüpi interferoonide tootmist (ingl *interferon regulatory factors*)
- ISG – interferoonide stimuleeritud geenid (ingl *interferon stimulated genes*)
- LIPS – lutsiferaasi immunopretsipitatsiooni süsteem (ingl *luciferase immunoprecipitation system*)
- NF- $\kappa$ B – transkriptsioonifaktor (ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NK – loomulik tapurrakk (ingl *natural killer cell*)
- PAMP – patogeenseoselised molekulaarsed mustrid (ingl *pathogen associated molecular patterns*)
- PRR – patogeenumustreid äratundvad retseptorid (ingl *pattern recognition receptors*)
- RIG-I – retinoehappe indutseeritav geen I (ingl *retinoic acid-inducible gene-I*)
- SARS-CoV-2 – ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2 (ingl *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
- S-RBD – retseptoriga seonduv ogavalgu domään (ingl *spike protein receptor-binding domain*)
- STING – interferooni geenide stimulaator (ingl *stimulator of IFN genes*)
- TGF – transformeeriv kasvufaktor (ingl *transforming growth factor beta*)

Th – helper T-rakk ehk CD4<sup>+</sup> T-rakk (ingl *helper T cell*)

TLR – tolli-laadne retseptor (ingl *toll-like receptor*)

TMPRSS2 – transmembraani proteaas, seriin 2 (ingl *transmembrane serine protease 2*)

TNF – tuumori nekroosi faktor  $\alpha$  (ingl *tumor necrosis factor  $\alpha$* )

Treg – regulatoorne T-rakk (ingl *regulatory T cell*)

## SISSEJUHATUS

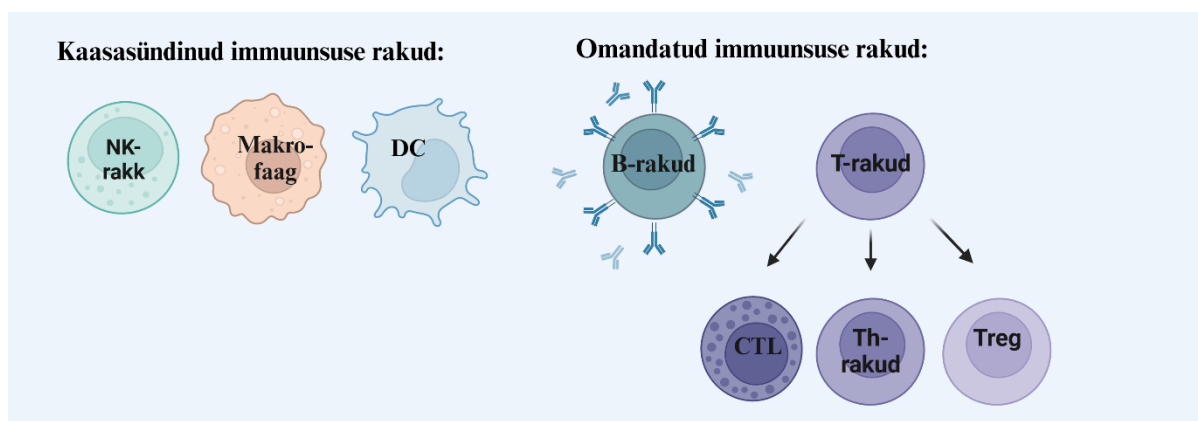
SARS-CoV-2 ehk ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2-ga nakatunute haiguspilt on oma loomult väga varieeruv. Haiguse kulg võib olla väga kerge ja isegi asümptomaatiline või vastupidiselt väga raskete sümptomitega ja lõppeda koguni surmaga. Lisaks on selliseid inimesi, kes ei nakatu viirusesse üldse ja keda peetakse seetõttu resistentseks. Rohkelt on uuritud koroonaviirushaiguse (COVID-19) rasket haiguspilti ja selle tagamaid, kuid viiruse suhtes resistentsete inimeste kohta ei ole palju teadmisi. Need teadmised aitaksid suurendada arusaama resistentse mehhanismidest, selle viirushaiguse patogeneesist ning panustada seekaudu teraapiate edendamisesse.

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida selliste vabatahtlike isikute immunoloogilisi parameetreid, kes olid lähikontaktis mõne COVID-19 haigestunuga, kuid ise viirusega ei nakatunu. Nende parameetrite mõõtmise kaudu tuleks teada saada, mis võiks olla nende inimeste mittehaigestumise põhjuseks ning kui paljud neist inimestest on tegelikult selle viiruse suhtes resistentset. Ühtlasi on eesmärgiks uurida nende resistentsete inimeste immunoloogiliste näitajate eripärasid. Uuritavateks parameetriteks on T-rakuline vastus SARS-CoV-2 antigeenidele, I tüüpi interferoon alfa ( $IFN\alpha$ ) toodang vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele ning autoantikehade esinemine I ja III tüüpi interferoonide ( $IFN$ , ingl *interferon*) vastu. Töö viidi läbi Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, biomeditsiini osakonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, molekulaarpatoloogia uurimisgrupis.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Immuunkaitse viiruste vastu

Inimese organismi kaitsesüsteem haigustekitajate vastu jaotub üldpildis kaheks: loomulik ja omandatud immuunsus. Loomulik ehk kaasasündinud immuunsus tagab kiire esmase reaktsiooni organismi sattunud haigustekitajate vastu ja on inimesel olemas alates tema sünnist. Selle moodustavad erinevad rakulised ja humoraalsed faktorid, mis tunnevad ära haigustekitaja ning kõrvaldavad selle organismist või esitlevad seda omandatud immuunsuse rakkudele. Tähtsaks loomuliku immuunsuse mehhanismiks on põletiku teke, mis on vajalik immuunrakkude liikumiseks nakatuskohta. Viiruste vastu reageerib sünnipärane immuunsus naturaalseste tappurrakkude (NK, ingl *natural killer cell*) ja I tüüpi interferoonide tootmise abil, mis vastavalt kas elimineerivad nakatunud rakke või põhjustavad nakatumata raku resistentsuse (Abbas jt., 2023; Parkin ja Cohen, 2001; Uibo jt., 2015). Ülevaatlik skeem immuunsüsteemi erinevate rakkude osalemisest viiruse tungimisel raku on kujutatud joonisel 1.

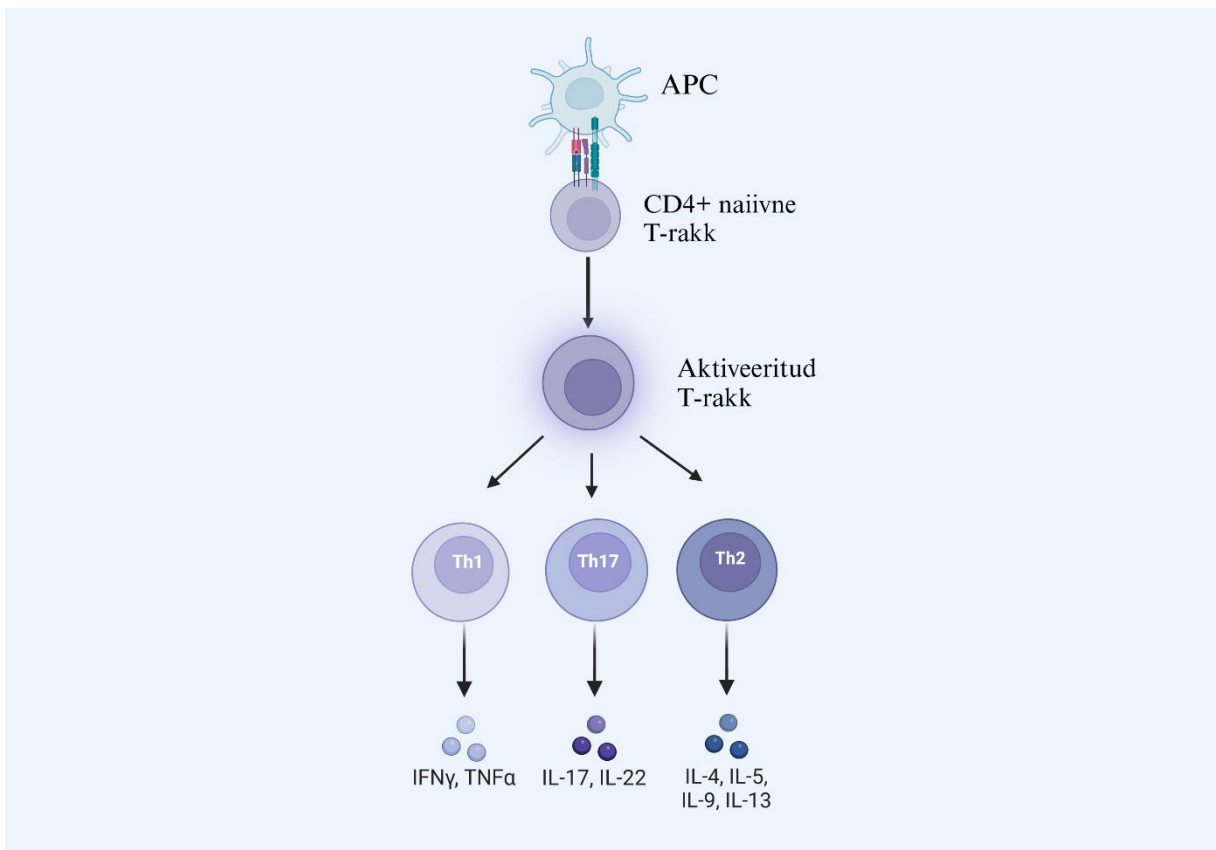


**Joonis 1.** Viirusevastases reaktsioonis osalevad põhilised immuunrakud. Viiruse vastu võitlemiseks aktiveerub organismi immuunsüsteem, milles osalevad nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsuse rakud. Ühest küljest hakkavad viiruse vastu võitlema NK-rakud, makrofaagid ja plasmatsütoidsed dendriitrakud (DCs, ingl *dendritic cells*), teisest küljest hakkavad omandatud immuunsuse B-lümfotsüüdid tootma antikehi ja T-lümfotsüütidest arenevad erinevad efektrorakud. Nakatunud rakke ründavad tsütotoksilised T-rakud (CTL, ingl *cytotoxic T lymphocyte*), tsütokiine hakkavad tootma Th-rakud (abistaja T-rakk, ingl *helper T cell*) ja immuunvastuse piiramisega tegelevad reguleerivad T-rakud (Treg, ingl *regulatory T cell*). Joonis on koostatud uurimistöö autori poolt BioRender programmiga.

Loomulik immuunsüsteem käivitub pärast võõr-struktuuride äratundmist. Neid on kahte sorti: patogeenidega seotud molekulaarsed mustrid (PAMP, ingl *pathogen-associated molecular patterns*) ja koekahjustusele iseloomulikud molekulid (DAMP, ingl *damage-associated molecular patterns*), mis seonduvad patogeennustreid äratundvate retseptoritega (PRR, ingl *pattern recognition receptors*). Selliseid retseptoreid on mitmeid, näiteks tolli-

laadsed retseptorid (TLR, ingl *Toll-like receptor*) ja RIG-tüüpi retseptorid (RLR, ingl *Rig-I-like receptor*). TLR-de poolt käivitatud signaal aktiveerib rakutuumani jõudes erinevaid transkriptsioonifaktoreid nagu NF- $\kappa$ B (transkriptsioonifaktor, ingl *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ja IRF-3 (interferoonide tootmist suurendav transkriptsioonifaktor, ingl *interferon response factor*). Esimene neist mõjutab põletikutsütokiinide ja endoteeli adhesioonimolekulide ekspressiooni ning IRF-3 I tüüpi interferoonide tootmist. RIG-I on tsütosoolis paiknev retseptor, mis tunneb ära viiruslikku RNA-d ja käivitab viirusvastaste tsütokiinide ehk I tüüpi IFN-de tootmise (Abbas jt., 2023; Kany jt., 2019; Su jt., 2023; Uibo jt., 2015).

Omandatud immuunsus on erinevalt kaasasündinud immuunsusest pikaajaline ja spetsiifiline kaitse haigustekitajate vastu, kuid see tekib alles pärast nende tungimist organismi. See võimaldab moodustuda immunoloogilisel mälul, mis põhjustab järgmisel kokkupuutel veelgi kiirema ja tõhusama reaktsiooni. Omandatud immuunsus jaguneb omakorda humoraalseks ja rakuliseks. Omandatud immuunsuse rakkudeks on B- ja T-lümfotsüüdid. Haigustekitaja tungimisel organismi tuvastavad selle antigeeni dendriitrakud ning presenteerivad antigeeni T-rakkudele. T-rakud tunnevad antigeeni ära T-raku retseptoriga ning aktiveeruvad. Naiivsed T-rakud hakkavad tootma tsütokiine (eelkõige IL-2) ja diferentseeruvad efektor-T-rakkudeks. Need jagunevad kaheks: CD4<sup>+</sup> ehk helperrakud, mis toodavad tsütokiine T- ja B-rakkude aktivatsiooniks ja suunamiseks ning CD8<sup>+</sup> tsütotoksilised T-rakud, mis elimineerivad nakatunud rakke. Ühtlasi tekivad mälu-T-rakud ja reguleerivad T-rakud. Nendest esimesed on kauasäilivad ja reageerivad kiiresti uuel kokkupuutel antigeeniga. Reguleerivad T-rakud on võimelised immuunreaktsioone alla suruma ja reguleerivad seeläbi immuunvastust (Abbas jt., 2021; Bonilla ja Oettgen, 2010; Uibo jt., 2015). Pärast aktivatsiooni CD4<sup>+</sup> T-rakkude jaotumine erinevateks Th-rakkude alatüüpideks ja nende poolt toodetud tähtsamad molekulid on kujutatud Joonisel 2.



**Joonis 2.** Naiivse CD4+ T-raku aktivatsioon antigeeni presenteeriva raku (APC) poolt ja selle diferentseerumine erinevateks Th-rakutüüpideks. Erinevad Th-rakud toodavad vastavalt erinevaid tsütokiine. Th1 rakud toodavad valdavalt IFN $\gamma$  ja TNF $\alpha$ , Th17 rakud sekreteerivad IL-17 ja IL-22 ning Th2 rakud produtseerivad IL-4, IL-5, IL-9 ja IL-13 tsütokiine. Joonis on koostatud uurimistöo autori poolt BioRender programmiga ja põhineb Uibo jt (2015) joonisel.

Lisaks T-lümfotsüütidele kuuluvad omandatud immuunsuse alla ka B-lümfotsüüdid. B-lümfotsüütidel on retseptoriks membraaniseoseline antikeha, mis seondub antigeeniga. Pärast aktivatsiooni hakkavad B-rakud tootma antikehi, mis tagavad humoraalse immuunsuse. Oponeerivad antikehad tunnevad spetsiifiliselt ära ja seonduvad viirusliku antigeeniga ning märgistavad selle fagotsüütide või komplemendi jaoks, mis haigustekitaja kõrvaldavad. Neutraliseerivad antikehad takistavad viiruse seondumist peremeesrakuga (Abbas jt., 2023; Bonilla ja Oettgen, 2010; Uibo jt., 2015).

Nii loomulikku kui ka omandatud immuunvastuse aktivatsiooni ja kulgu reguleerivad erinevad signaalvalgud ehk tsütokiinid, mida toodavad paljud rakutüübid. Nende tootmine aktiveeritakse pärast haigustekitaja äratundmist ja nende ekspressiooni reguleeritakse rakutuumas transkriptsioonifaktorite abil (Uibo jt., 2015; Kany jt., 2019). Selle uuringu jaoks olulised tsütokiinid, nende põhilised tootjad ja sihtmärgid on kokkuvõtvalt kujutatud tabelis (Tabel 1).

Loomulikku immuunsust vahendavate tsütokiinide alla kuuluvad näiteks põletikutsütokiinid, mis kontrollivad põletiku teket ja interferoonid. Põletikutsütokiinide põhilisteks tootjateks on dendriitrakud, makrofaagid, loomuliku immuunsuse lümfaatilise rea rakud (ILC, ingl *innate lymphoid cell*) ja nuumakud. Tähtsamateks tsütokiinideks loomulikus immuunreaktsioonis on interleukiinid (IL, ingl *interleukin*) IL-1, IL-6 ja IL-8. Lisaks nendele on tähtis tsütokiin ka tuumori nekroosi faktor (TNF $\alpha$ , ingl *tumor necrosis factor alpha*), mis suurendab kemokiinide ja teiste põletikutsütokiinide tootmist. Põletikuliste protsesside tasakaalustamiseks on olemas anti-inflammatoorsed tsütokiinid, mis aitavad vältida liiga tugeva põletiku teket. Põhilised sellised tsütokiinid on IL-4, IL-10, IL-11 ja IL-13. Nende seast toimib IL-10 väga tugeva TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-12 ja INF $\gamma$  repressorina. Lisaks interleukiinidele on põletikuvastase toimega ka omandatud immuunsuse transformeeriva kasvufaktori perekond (TGF, ingl *transforming growth factor*), vähendades makrofaagide ja Th1 rakkude aktiivsust (Abbas jt., 2023; Kany jt., 2019; Uibo jt., 2015; Zhang ja An, 2007).

Viirusinfektsiooni puhul on kesksel kohal interferoonid ehk viirusinfektsioone kontrollivad tsütokiinid, mis takistavad haigustekitaja levikut organismis ja neid on kolme tüüpi. I tüüpi interferoonide tootmise põhiline käivitaja on viirusliku RNA seondumine PAMP retseptoritega ja IFN-de endi seondumisel sobiva retseptoriga (IFNAR, ingl *type I interferon receptor*) käivitatakse erinevad signaalirajad, mis viivad raku viirusvastase resistentsuse tekkeni. Tähtsamate I tüüpi interferoonide alla kuuluvad grupid IFN- $\alpha$  ja IFN- $\beta$ , mis on eelkõige loomuliku immuunsuse osaks. II tüüpi interferooni ehk IFN- $\gamma$  toodavad peamiselt T- ja NK-rakud ning selle kaudu aktiveeritakse põhiliselt makrofaage ning pärsitakse nende kaudu viiruse levikut (Abbas jt., 2023; Su jt., 2023). III tüüpi interferoonid ehk INF- $\lambda$  on sarnase toimega nagu I tüüpi interferoonid, nende oluline erinevus viirusinfektsiooni peatamise juures on see, et kui I tüüpi IFN-d kaitsevad organismi viiruse süsteemse leviku eest, siis III tüüpi interferoonid on lokaliseeritud eelkõige limaskestades ja aitavad pärssida nakkuse levikut nendest paikadest kaugemale (Sommerreyns jt., 2008; Su jt., 2023; Wack jt., 2015). Vanker (2022) kirjeldab oma artiklis, et IFN-de mõju avaldub läbi interferoonide stimuleeritud geenide (ISG, ingl *interferon stimulated genes*) transkriptsiooni aktivatsiooni, mis on oma loomult viirusevastased geenid. Nende geenide produktid mõjutavad erinevaid etappe viiruse replikatsioonitsükliks nagu näiteks viiruse sisenemist (IFITM3 ja NCOA7 valgud) või viirusliku genoomi replikatsiooni (ZAP ja OAS valgud). Su jt (2023) märgivad, et ühtlasi tõuseb interferoonide tõttu põletikku tekitavate kemokiinide tootmine ning seeläbi mõjutatakse paljude immuunrakkude tegevust. Näiteks suureneb makrofaagide ja dendriitrakkude antigeeni presenteerimine, NK-rakkude, T-rakkude ja B-rakkude aktivatsioon.

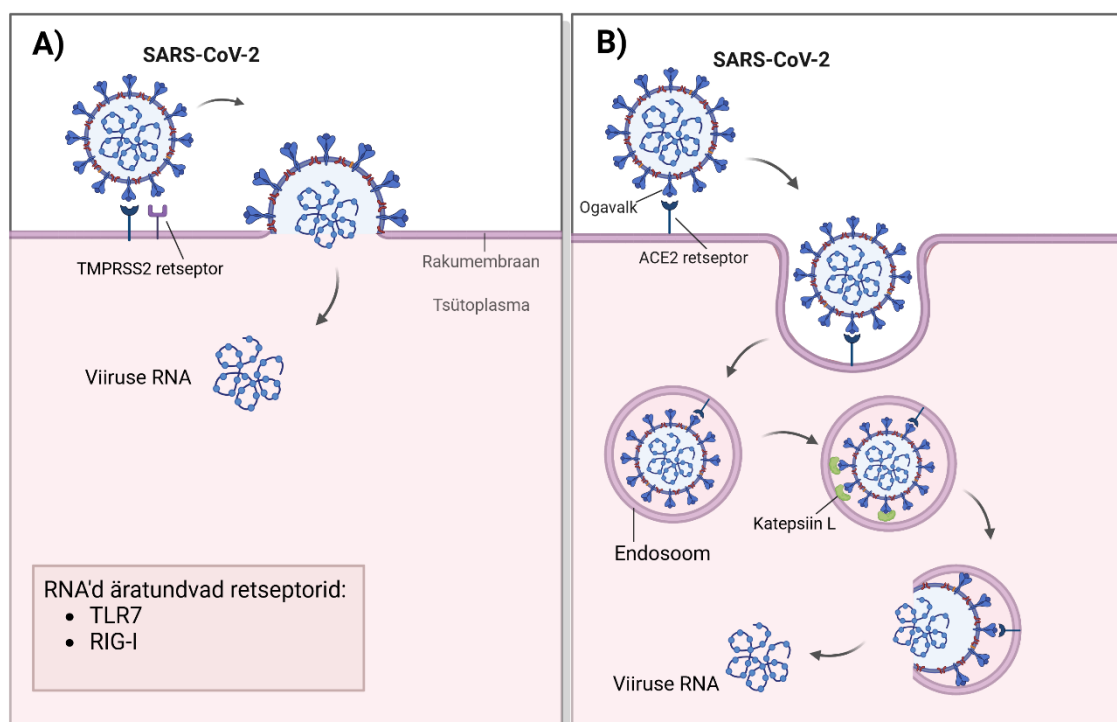
Omandatud immuunreaktsiooni reguleerivate tsütokiinide alla kuuluvad näiteks IL-2, IL-4 ja IL-5. Need mõjutavad peamiselt lümfotsüütide arengut. IL-2 toodetakse palju T-rakkude aktivatsioonil ja see soodustab eeskätt antigeenispetsiifiliste T-rakkude ja ka teiste immuunrakkude paljunemist. IL-4 suunab B-rakke tootma IgE antikehi ja stimuleerib Th2 diferentseerumist ning IL-5 aktiveerib eosinofiilide töö (Uibo jt., 2015).

**Tabel 1.** Ülevaade olulisematest tsütokiinidest, nende peamistest tootjatest ja sihtmärkidest (Abbas jt., 2023; Kany jt., 2019; Uibo jt., 2015; Zhang ja An, 2007).

<b>Tsütokiin</b>	<b>Põhilised tootjad</b>	<b>Sihtmärgid ja immuunreaktsioon</b>
<b>IL-2</b>	T rakud	T-rakkude paljunemine ja diferentseerumine, NK-rakkude proliferatsioon ja aktivatsioon
<b>IL-6</b>	Monotsüüdid, makrofaagid, endoteelirakud, T-rakud, fibroblastid	B- ja T-rakkude paljunemine
<b>IL-10</b>	Makrofaagid, T-rakud (peamiselt Treg)	Makrofaagid ja dendriitrakud, IL-12 tootmise inhibeerimine
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Makrofaagid, NK-rakud, T-rakud (Th1)	Vaskulaarse endoteeli aktivatsioon, Neutrofiilide aktivatsioon
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	T-rakud (Th1, CD8+), NK rakud, ILC	Makrofaagide aktivatsioon, B-rakkude diferentseerumine, Th1 rakkude diferentseerumine
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	Plasmatsütoidsed dendriitrakud, makrofaagid, mononukleaarsed fagotsüüdid	Viirusevastane reaktsioon, NK rakkude aktivatsioon

## 1.2. SARS-CoV-2 viiruse iseloom

SARS-CoV-2 on koroonaviirus, mis koosneb neljast struktuurset valgust: oga-, ümbris-, membraani- ja kapsiidivalgust (Wu jt., 2020; Muralidar jt., 2020). Viiruse sisenemisel peremeesrakku on kaks peamist sisenemismehhanismi. Esimene neist toimub membraanide ühinemise teel, kui viiruse ogavalk S seondub rakupinna angiotensiini muundava ensüüm 2 (ACE2, ingl *angiotensin-converting enzyme 2*) ja transmembraani seriin 2 proteaasi (TMPRSS2, ingl *transmembrane serine protease 2*) retseptoritega. Pärast membraanide ühinemist vabaneb raku tsütoplasmasse viiruse RNA genoom ning sellele järgneb RNA replikatsioon. Sel viisil viirus paljuneb, uued partiklid pakitakse kokku ja need lahkuvad rakust, et nakatada järgmisi rakke. Teiseks sisenemismehhanismiks on viiruse sattumine endosoomi pärast ogavalgu seondumist ACE2 retseptoriga. Viiruse väljumine endosoomist toimub katepsiini valgu abil ning viiruse RNA vabaneb raku tsütoplasmasse (Jackson jt., 2022; Khan jt., 2021). SARS-CoV-2 sisenemine rakku on kujutatud joonisel 3.



**Joonis 3.** SARS-CoV-2 sisenemine rakku. Viirus siseneb rakku kahel viisil. Ogavalgu seondumisel rakupinna ACE2 ja TMPRSS2 retseptoritega toimub viirusepartikli ja peremeesraku membraanide ühinemine ning viiruse RNA vabaneb rakku (A). Teise võimalusena seondub viiruse ogavalk raku ACE2 retseptoriga ja viirus satub endosoomi, millest väljumine toimub katepsiin L valgu abil. Toimub viirusepartikli ja endosoomi membraanide ühinemine ning tsütoplasmasse vabaneb viiruse RNA genoom, mis on peamiseks immunreaktsiooni käivitavaks antigeeniks (B). RNA genoomi ehk PAMP signaalid tunnevad peremeesrakus ära TLR7 ja RIG-I retseptorid. Joonis on tehtud uurimistöö autori poolt kasutades BioRender programmi ja põhineb Jackson jt (2022) artikli illustatsioonil.

Viiruse antigeenideks, mis käivitavad immuunreaktsiooni, on näiteks rakku vabanev viiruse RNA molekul, mille tunneb ära TLR7 või RIG-I retseptor. Retseptori ja RNA omavahelisel seandumisel suureneb interferoonide ja tsütokiinide tootmine (Vanker, 2022). Neufeldt jt (2022) ja Wu jt (2022) artiklite järgi käivitab COVID-19 peremehes ka cGAS-STING raja. See rada kuulub organismi loomuliku immuunsuse alla ja aitab viiruse vastu võidelda, stimuleerides samuti esimest tüüpi interferoonide tootmist. cGAS-STING raja aktivatsiooni põhjustab dsDNA ja hakatakse tootma tsüklilist signaalmolekuli GMP-AMP (cGAMP, ingl *cyclic GMP-AMP*). cGAMP seandumise tagajärjel valgulise STING kompleksiga vallanduvad signaalid I tüüpi IFN-de geenide ekspressiooni aktivatsiooniks (Abbas jt., 2023:32). Kuna SARS-CoV-2 on RNA genoomiga viirus, siis arvatakse, et rada käivitub peremeesraku kromatiini või mtDNA sattumisel tsütoplasmasse viirusega nakatumise tagajärjel (Zhou jt., 2021; Lv jt., 2022).

COVID-19 nakkuse levik toimub põhiliselt piiskade ja aerosoolide kaudu. Viiruse haigusnähud on väga erinevad ja kuigi enamasti kaasnevad haigestumisega kerged sümptomid, võib riskirühma kuuluvate inimeste jaoks haigestumine lõppeda surmaga (Gandhi jt., 2020; Muralidar jt., 2020).

### **1.3. Raske haiguspildi põhjused**

SARS-CoV-2 viirusesse raskelt haigestumisel on mitmeid riskifaktoreid, peamisteks on kõrge vanus ja teiste krooniliste haiguste esinemine. Kroonilised haigused nagu südame- ja veresoonkonnahaiused, HIV, diabeet, kroonilised neeru-ja maksahaigused jt on seotud SARS-CoV-2-te raskelt haigestumisega ja tüsistuste tekkega. Kõrgemas eas inimestel on ühtlasi tõenäoline mitme kroonilise haiguse koosinemine, mis muudab neid raskele haiguskulule vastuvõtlikumaks (Martono jt., 2023; Meister jt., 2022; Zhou jt., 2020).

Immuunvananemine (ingl. *Immunosenescence*) põhjustab vanemates inimestes immuunreaktsiooni häireid, mis mõjutavad negatiivselt nii rakulist kui ka humoraalset immuunsust. Kõrgemas eas inimestel toimuvad seetõttu muutused tsütokiinivastuste mehhanismides ning põletikuvastane reaktsioon on tihti ebaadekvaatne (Opal jt., 2005). Tagajärjeks võib olla COVID-19 viirusesse nakatumisel nõrgenenud esimest tüüpi interferoonide reaktsioon, aga teisest küljest kaasasündinud immuunsuse ägestunud reaktsioon. Viimane viib omakorda tugeva põletikuvastuseni ja kui seda ei suudeta kontrollida, siis kahjustuvad kopsud ning võib tekkida äge respiratoorse distressi sündroom (ARDS, ingl *acute respiratory distress syndrome*) (Zinatizadeh jt., 2022). Sellist ägestunud põletikuteket on lisaks kõrgele vanusele täheldatud ka teiste riskifaktorite puhul nagu diabeet, ülekaalulisus ja kõrge

vererõhk (Ballow ja Haga, 2021). Xia jt (2021) artikli järgi on koroonaviirusesse nakatumise tagajärjel tsütokiinde tormi (ingl. *cytokine storm*), organirikete ja selliste ARDS-i ja teiste tüsistuste teke patsientide hospitaliseerimise ja suremise põhiliseks põhjuseks. Ägeda põletikureaktsiooni indikaatoriteks on kõrged põletikutsütokiinide tasemed, mida on täheldatud just raskelt haigestunute COVID-19 patsientide puhul. Hadjadj jt (2020) märgivad, et kriitilises seisus COVID-19 haigetel leiti perifeersetest vere immuunrakkudest kõrgel tasemel põletikutsütokiine IL-6 ja TNF $\alpha$  ning Contoli jt (2021) nägid raskelt haigestunute puhul ka kõrgeid IL-10 tasemeid. Nende leidudega kattuvad Galani jt (2021) artiklis kirjeldatud tulemused kõrgeinud põletikutsütokiinide tasemetest, mis võrreldes grippi põdenutega püsivad kõrgetena palju pikema ajaperioodi vältel.

Immuunreaktsiooni tugevust viiruse vastu mõjutab interferoonide hulk organismis ja nende tootmise tõhusus. Kui vajalike interferoonide tootmine on eri põhjustel häiritud, ei peatata viiruse levikut nii efektiivselt. Seega on madal IFN-de tase üheks raske COVID-19 haiguspildi põhjuseks (Su jt., 2023; Vanker, 2022). Hadjadj jt (2020) leidsid oma uuringus kriitiliselt haigete patsientide puhul väga madalad esimest tüüpi IFN-de tasemed. Abbas jt (2021) toovad välja, et raske SARS-CoV-2 haigestumisega patsientidel on tihti täheldatud just I tüüpi IFN-de defekte ning 10% sellistest patsientidest toodavad autoantikehi enda I tüüpi IFN-de vastu. Ligi 3,5% kuni 4% sellistest patsientidest omavad nende sõnul mutatsioone, mis mõjutavad I tüüpi interferoonide tootmist või signaaliradu.

IFN-de vähesusel võib olla mitmeid põhjuseid, kuid Zhang jt (2020) artikkel toob välja geneetilised põhjused ehk viirusvastase süsteemi kaasasündinud defektid (IEI, ingl. *inborn errors of immunity*), mis mõjutavad mitmeid geene ja viivad seeläbi interferoonide puudulikkuseni. Teiseks on täheldatud, et osadel COVID-19 viiruse kodeeritud valkudel on organismi kaitsesüsteemidele pärssiv mõju. Xia jt (2020) tuvastasid oma uuringus järgmised interferoonide tootmist allasuruvad valgud: nsp1, nsp13 ja ORF6. Nende toimemehhanismid on erinevad, kuid need mõjutavad eelkõige IFN-de produktsiooniks vajalikke signaaliradu. Samuti inhibeerivad need ja mõned teised viirusvalgud IFN-de poolt käivitatud signaaliradu ja takistavad seeläbi ISG-de ekspressiooni. Kolmandaks põhjuseks on interferoone neutraliseerivad autoantikehad (AAB, ingl. *autoantibodies*), mis vähendavad nende viirusvastast toimet (Su jt., 2023). Bastard jt (2023) uurimusest selgus, et paljudel kriitilises seisundis SARS-CoV-2 haigestunutel leiti I tüüpi IFN-e neutraliseerivaid autoantikehasid ja nende hulk korreleerus haiguspildi raskuse ning fataalsusega. Autoantikehade hulk seostus ka patsientide kõrge vanusega ning sooga – autoantikehi esines rohkem vanematel inimestel ning meestel. Vanker (2023) uuris ka III tüüpi IFN-de vastaste autoantikehade esinemist, kuid neid

leiti pigem viiruse suhtes naiivsetes inimestes ja sel juhul ei olnud tegu neutraliseerivate antikehadega.

Lisaks interferoonide puudumisele võib viirusele vastuvõtlikkust põhjustada ka ACE2 retseptori suurem hulk peremeesorganismi rakkudes, mis võimaldab viirusel kergemini organismi siseneda.

#### **1.4. Resistentsuse võimalikud põhjused**

Reaktsioon COVID-19 viiruse vastu ja haiguskulg organismis on inimestes väga varieeruv. On inimesi, kes põdesid haigust väga raskesti või kelle jaoks lõppes haigestumine surmaga, kuid paljudel ilmusid kõigest mõõdukad või kerged sümptomid. Lisaks nendele leidub ka neid, kes põdesid SARS-CoV-2 nakkust täiesti asümptomaatiliselt ja neid, kes on viiruse vastu resistentsed (Ghandi jt., 2020). Asümptomaatilise nakatumise korral organism haigestub ja viirus tõrjutakse organismist välja, ilma et tekiks tugev põletikuline reaktsioon, kuid resistentsuse korral ei suuda haigustekitaja peremeest nakatada ja viiruslik protsess peatub paari päeva jooksul (Netea jt., 2022).

Nendel isikutel, kes põdesid SARS-CoV-2 viirust kergemini, on mõõdetud kõrgemad interferoonitasemed, kui kriitilises seisus patsientidel (Hadjadj jt, 2020). Analoogselt leiti, et paranematel patsientidel tõusis veres IFN $\alpha$  tase, kuid letaalsetel patsientidel püsis see madalal (Contoli jt., 2021). Lisaks sellele puudusid Bastardi jt (2020) andmetel kerge haiguspildiga isikutel autoantikehad, mis seevastu esinesid paljudel kriitiliselt haigetel. Tuginedes nendele leidudele ja raske haiguskulu teadaolevatele põhjustele võib välja pakkuda võimalikud põhjused osade inimeste viirusevastasele resistentsusele.

Andreacos jt (2022) pakuvad välja, et resistentsusel võivad olla erinevad geneetilised põhjused. Näiteks on leitud geenivariant, mis vähendab ACE2 retseptori hulka organismis (Horowitz jt., 2022). Ühtlasi võib olla võimalik, et esineb geenivariante, mis põhjustavad retseptori konformatsioonis muutusi või takistavad viiruse seondumist nagu näiteks põhjustab HIV viirusevastast resistentsust CCR5 kemokiini retseptori alleelis paiknev deletsioon (Hütter jt., 2009). Lisaks geneetilistele põhjustele võivad olla resistentsuse põhjuseks mõne teise koroonaviirusega nakatumise tagajärjel organismis olemas olevad ristreageerivad CD4+ mälu-T-rakud (Mateus jt., 2020; Tso jt., 2020). Braun jt (2020) täheldasid oma uuringus 35% ja Nelde jt (2021) leidsid 81% nakatumata doonoritest SARS-CoV-2 viirusega ristreageerivaid CD4+ T-rakke. Ühtlasi on leitud, et rinoviirusega nakatumine takistab SARS-CoV-2 replikatsiooni, seega on üheks võimalikuks resistentsuse mehhanismiks ka mõne teise viiruse poolt põhjustatud viiruslik interferents (Dee jt., 2021). Lisaks võib resistentsuse põhjustada väga

tõhus kaasasündinud immuunsus, elimineerides viiruse enne seda, kui adaptiivne immuunreaktsioon jõuab käivituda. Sellele oleks iseloomulik tugev tsütokiinide ja interferoonide tootmine (Netea jt., 2022).

## **2. EKSPERIMENTAALOSA / UURIMUS**

### **2.1. Töö eesmärgid**

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida vabatahtlike mittenakatunud isikute immunoloogilisi parameetreid ja selle kaudu tuvastada SARS-CoV-2 vastu resistentsed inimesed. Uuritavateks parameetriteks on T-rakuline vastus SARS-CoV-2 antigeenidele, IFN $\alpha$  toodang vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele ning autoantikehade esinemine I ja III tüüpi IFN-de vastu.

Töö esimeseks hüpoteesiks on, et resistentsete isikute hulgas on kõrge I tüüpi IFN-de toodanguga isikuid.

Töö teine hüpotees on, et resistentsetel inimestel puuduvad neutraliseerivad antikehad interferoonide vastu.

### **2.2. Materjal ja meetodika**

#### **2.2.1 Küsimustik**

Uuringusse sobilike vabatahtlike värbamiseks koostati Rockefelleri Ülikoolis läbiviidava sarnase uuringu eeskujul küsimustik ja paigutati see REDCap keskkonda. Küsimustik on leitav töö lisadest (Lisa 1). Uuringusse kutsuti isikud, kes ei haigestunud, kuid puutusid COVID-19 haigega kokku enne vaktsineerimist ja vähemalt kolmel päeval ja rohkem kui tund aega ilma kaitsevahendeid kasutamata.

#### **2.2.2 Seerumi kogumine SYNLABis ja SARS-CoV-2 IgG määramine**

Uuringukriteeriumitele vastavad isikud kutsuti vereproove andma SYNLABi lähimasse verevõtupunkti. SYNLABis määrati ka SARS-CoV-2 vastaste IgG antikehade tase kasutades Abbott SARS-CoV-2 IgG QN testkomplekti ja kemiluminestseeruvat mikropartiklitel põhinevat testi (*chemiluminescent micro-particle immunoassay*, CLIA) kasutades ARCHITECT i2000SR analüsaatorit (Abbott Laboratories). Tootjapoolseks positiivsuspääriiks oli 50 AU/ml ja ülemiseks detektsioonipiiriks 80,000 AU/ml.

### 2.2.3 Täisvere stimulatsioonid

RPMI1640 söötmega lahjendatud vereproove stimuleeriti erinevate SARS-CoV-2 antigeenidega või jäeti stimuleerimata (negatiivne kontroll). T-rakkude mäluvastuse hindamiseks lisati täisverele erinevaid SARS-CoV-2 viirusest pärinevaid antigeene: „S“ (viiruse ogavalk), „M“ (membraanivalk) ja „N“ (nukleokapsiidivalk). Loomuliku immuunvastuse hindamiseks lisati IFN $\alpha$  tootmist stimuleerivaid PRR ligande: cGAMP, Gardiquimod ja Resiquimod R848. Stimulandid ja nende kontsentratsioonid on kirjeldatud tabelis 2. Peale 20-tunnist inkubatsiooni 37°C juures proovid tsentrifuugiti 400g 5 min ja koguti rakkude pinnalt supernatant, mida hoiustati -20°C juures kuni edasiste analüüsideni. See osa teostati labori teiste liikmete poolt.

**Tabel 2.** Vereproovide stimulatsioonid.

Stimulant	Tootja	Tähis	Lõppkontsentratsioon	Kirjeldus
SARS-CoV-2 S Protein S1+S2 (R683A, R685A)	Biolegend	S	1 µg/ml	rekombinantne valk
PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_N (nukleokapsiid)	Miltenyi Biotec	M	1 µg/ml	peptiidide segu: 15aa pikad peptiidsed järjestused 11aa pikkuse ülekattega
PepTivator® SARS-CoV-2 Prot_M (membraanivalk)	Miltenyi Biotec	N	1 µg/ml	peptiidide segu: 15aa pikad peptiidsed järjestused 11aa pikkuse ülekattega
2'3'-cGAMP	Invivogen	cGAMP	5 µg/ml	tsükliiline dinukleotiid, mis aktiveerib STING retseptorit
Gardiquimod™	Invivogen	Gard	5 µg/ml	TLR7 agonist
R848 (Resiquimod)	Invivogen	R848	5 µg/ml	TLR7 ja TLR8 agonist

### 2.2.4 Tsütokiinide määramine täisvere supernatantidest LegendPlex reagentikomplektiga

Patsientide täisvere stimulatsioonide supernatantidest mõõdeti järgmiste tsütokiinide tasemed: IL-2, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  ja TNF $\alpha$ . Selleks kasutati *LEGENDplex™ HU Th1 Cytokine Panel (5-plex)* reaktsioonikomplekti (BioLegend). Juhisena kasutati tootja enda „LEGENDplex™ Human Th Cytokine“ protokolliga filterplaadi kasutamiseks.

Täisvere supernatante segati vortexil 5 sekundit raputades, millele järgnes 2000 rpm juures 6 sekundit *spin down* (seda tsükli korrati kaks korda) ja lahjendati puhver A-ga (50 mM Tris pH 7.5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 lahjendatud Milli Q vees)

viiekordselt. Lahjendused lisati 20 µl kaupa pesemispuhvriga niisutatud filterplaadile (BioLegend). Samas hulgas lisati plaadile standardproovid. Seejärel pipeteeriti igasse kannu 20 µl vastavalt tootja juhistele valmistatud helmete suspensiooni tsütokiinide püüdmiseks. Kasutatud helmed ning nende kogused on kirjas tabelis 3. Pärast kahetunnist inkubatsiooni pimedas loksutil (500 rpm) pesti plaat kaks korda pesemispuhvriga ja lisati igasse filterplaadi kannu 20 µl detektsiooniantikehi. Pärast järgmist ühetunnist inkubatsiooni loksutil (500 rpm) lisati 20 µl SA-PE-t (ingl *Streptavidin-phycoerythrin*) ja tehti viimane inkubatsioon loksutil (500 rpm) kestusega 30 minutit. Pärast plaadi kahekordset pesemist puhvriga lisati plaadile pesemispuhvrit ja pipeteeriti proovid ümber filterplaadilt V-kujulise põhjaga 96 kannuga mikroplaadile (Greiner Bio-One). Tulemusi mõõdeti ID7000 spektraaltsütomeeriga (Sony) ja analüüsiks kasutati LEGENDplex 2023-02-15 tarkvara versiooni. Tsütokiinide kontsentratsioonid arvutati standardkõverate põhjal ja ühe mõõtmise tulemusena saadud standardkõverad on näidisedena toodud uurimuse Lisas 2. Alla detektsioonipiiri jäänud lugemid asendati kõige madalamast standardkõvera väärtusest 50% väiksema väärtusega. Stimuleeritud proovist mõõdetud kontsentratsioonist lahutati negatiivsest kontrollproovist mõõdetud tsütokiini kontsentratsioon, et saada antigeen-spetsiifilisele stimulatsioonile vastav väärtus.

**Tabel 3.** Kasutatud helmed helmesuspensiooni valmistamisel (lahjendatud 1354µl puhvriss).

Helmetüüp	Kogus suspensioonis
<i>Human IL-2 Beads</i>	169,4 µl
<i>Human IL-6 Beads</i>	169,4 µl
<i>Human IL-10 Beads</i>	169,4 µl
<i>Human IFN<math>\gamma</math> Beads</i>	169,4 µl
<i>Human TNF<math>\alpha</math> Beads</i>	169,4 µl

### 2.2.5 IFN $\alpha$ kontsentratsiooni määramine stimulatsioonide supernatantidest

Proovidest määrati I tüüpi interferooni (IFN $\alpha$ ) kontsentratsioon ELISA meetodil (ensüüm-immuunsorbtsiooni meetod, ingl *enzyme-linked immunosorbent assay*). Kasutati *LumiKine<sup>TM</sup> Human IFN-alpha2 bioluminescent ELISA* komplekti (InvivoGen) ja juhitud *Invivogen LumiKine Xpress hIFN- $\alpha$*  protokollist. Selleks lisati 96 kannuga plaadile (Invivogen) 50 µl primaarset antikeha (1:60 lahjendus DPBS puhvriss, 5µg/ml) ja lasti inkubeerida toatemperatuuril üleöö. Järgmisel päeval eemaldati plaadilt primaarse antikeha lahuse ülejääk ning lisati 200 µl blokeerimispuhvrit (3% BSA, 0,05% Tween 20 sisaldusega DPBS), millele järgnes kahetunnine inkubatsioon 37°C kraadi juures. Sellele järgnevalt eemaldati blokeerimispuhver plaadilt ja lisati 50 µl kaupa proovid ning standardid (koos negatiivse kontrolliga) kahe paralleelina. Standardid valmistati vastavalt tootja juhendile. Seejärel kanti plaadile 50 µl detekteerimisantikeha lahust (1:333,3 lahjendusega DPBS puhvriss, 30ng/ml) ja

lasti inkubeerida 37°C kraadi juures kaks tundi. Inkubatsiooni lõppedes pesti plaati kolm korda pesupuhvriga (0,05% Tween 20 sisaldusega PBS) ja vahetult enne mõõtmist lisati plaadile 50 µl QUANTI-Luc reagenti 20-kordse lahjendusega steriilses vees. Mõõtmine viidi läbi Victor X5 plaadilugejaga (*VICTOR X Multilabel Plate Reader*, PerkinElmer). Saadud tulemustest arvutati proovide kahe korduse keskväärtus ja võrreldi neid standardväärtuste keskmisega.

### 2.2.6 Autoantikehade määramine vereseerumitest

Verest määrati I tüüpi interferoonide (IFN $\alpha$ 2, IFN $\omega$ ) ja III tüüpi interferoonide (IL-28A ning IL-29) vastaseid autoantikehi. Selleks kasutati LIPS-meetodit (lutsiferaasi immunoprecipitatsiooni süsteem, ingl *luciferase immunoprecipitation system*). Seerumilahjendused (1:10) tsentrifugeeriti rcf3000 juures 3 minutit ja kanti kahes korduses 25 µl kaupa 96 kannuga filterplaadile (*Millipore® MultiScreenHTS-BV Filter Plate*, Merck KGaA). Eelnevalt oli plaati niisutatud 10 µl puhver A-ga (50 mM Tris pH 7.5; 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 lahjendatud Milli Q vees). Lisaks seerumitele kanti plaadile 25 µl positiivseid ja negatiivseid proovid ning seejärel valmistati proteiin G agaroskerakesed (*Protein G Agarose High Flow Resin, 100 ml, Cat No COP28, Creative BioMart*). Neid pipeteeriti plaadile 25 µl ja lasti plaadil 1 tund toatemperatuuril loksudes inkubeerida. Pärast inkubatsiooni lisati seerumitele 50 µl 2×10<sup>6</sup> LU antigeenilahust ja lasti inkubeerida veel 1 tund. Inkubatsiooni jooksul toimus antigeen-antikeha seondumine ja nende seondumine agaroskerakestele. Inkubatsiooni möödudes pesti plaat neli korda puhver A-ga ja neli korda PBS-puhvriga. Vahetult enne mõõtmist lisati plaadile 20 µl lutsiferaasi nanosubstraati (*Nano-Glo Luciferase Assay Substrate, REF N1120, Promega*) lahjendusega 1:1000-le PBS-puhvrisk. Mõõtmine viidi läbi Victor X5 plaadilugejaga (*VICTOR X Multilabel Plate Reader*, PerkinElmer). Saadud tulemustest arvutati proovide kahe korduse keskväärtus ning analüüsiti nende suhet kontrollrühmade keskväärtustega.

### 2.2.7 Andmeanalüüs

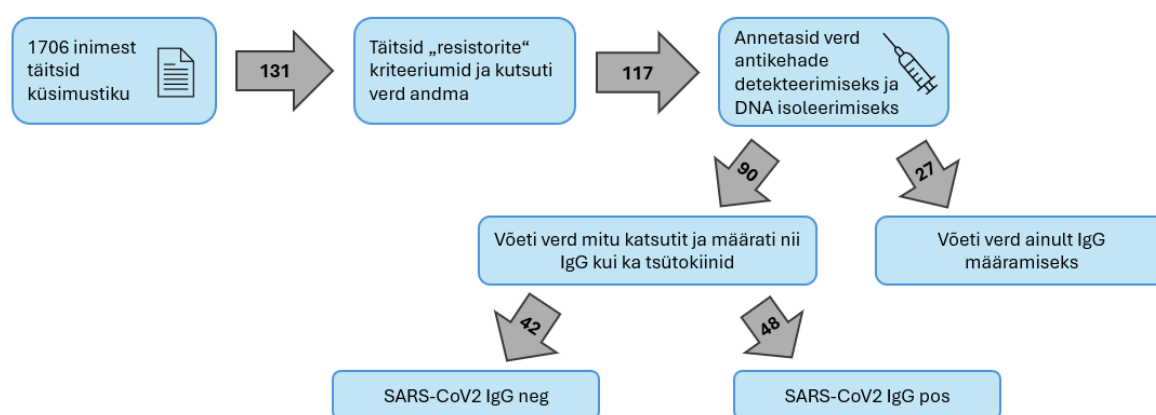
Andmete analüüsiks ja visualiseerimiseks kasutati Microsoft Excel (Microsoft), R (versioon 3.3.0) ja RStudio (versioon 2023.12.1.402) programme. Lisapakettideks olid *tidyverse* (versioon 2.0.0), *dplyr* (versioon 1.1.3) ja *psych* (versioon 2.4.1). Joonised tehti *ggplot2* (versioon 3.4.4) ja *cowplot* (versioon 1.1.3) pakettidega. Analüüsil võrreldi omavahel tunnuste keskmiseid väärtusi. Määratud tsütokiinid ei olnud jaotunud normaaljaotuse järgi ja andmete normaliseerimiseks tuli need logaritmidada. Edasine analüüs toimus logaritmitud andmestikuga. LEGENDplex-tulemuste ja ELISA-tulemuste visualiseerimiseks koostati karpdiagrammid ning

oluliste erinevuste testimiseks kasutati vastavalt kahepoolset Mann-Whitney U testi ja Kruskal-Wallis testi RStudio programmis. Lisaks teostati korrelatsioonianalüüs RStudio keskkonnas. Statistiliselt oluliseks loeti erinevused, mille p-väärtus oli  $<0,05$ .

## 2.3. Tulemused

### 2.3.1. Valim

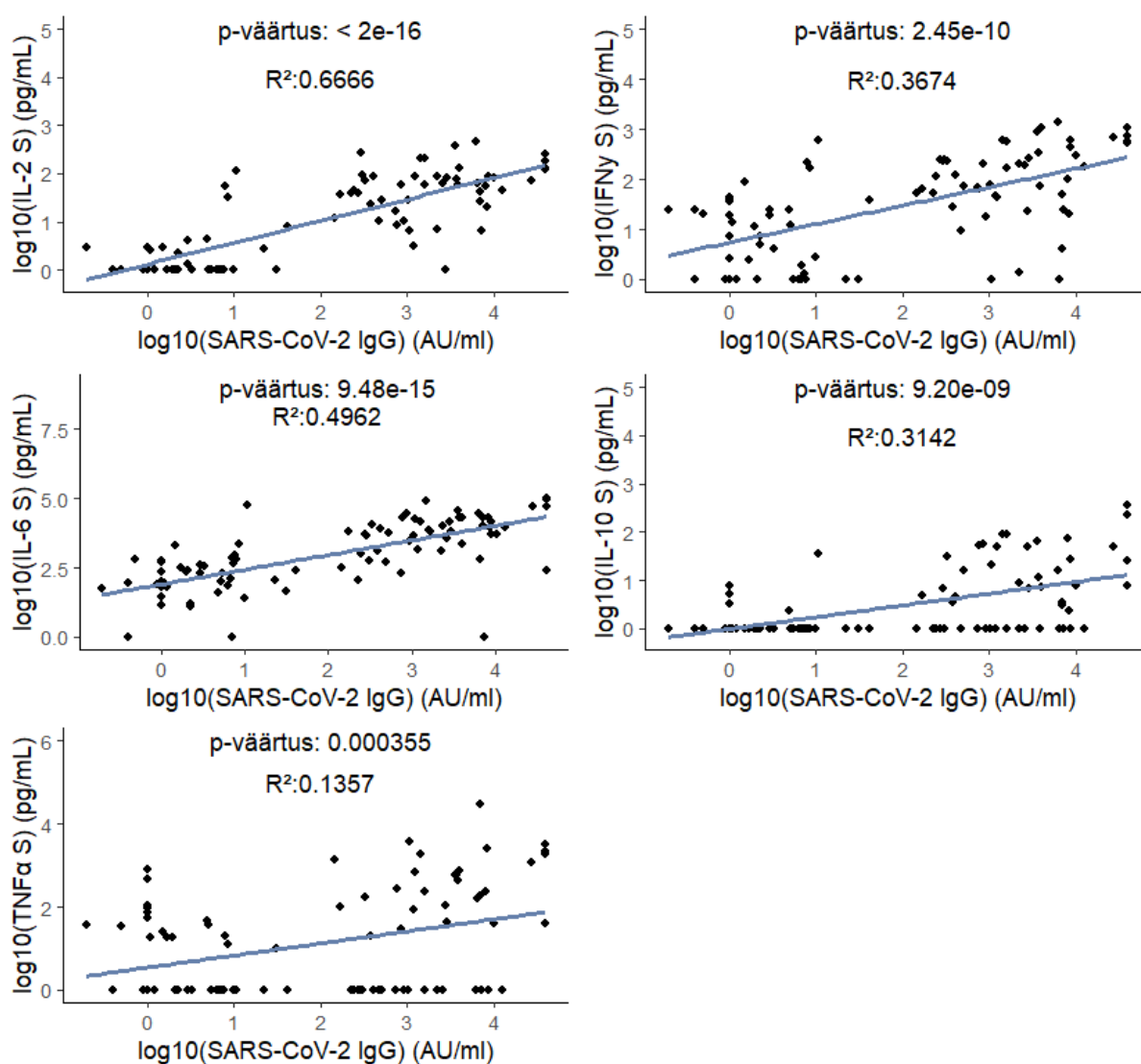
Uuring sai Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee heakskiidu (protokoll 359/T-23, koosolek 21.02.2022). Selle uurimuse valimi moodustavad 117 inimest. Valim moodustus protsessi käigus, mida on kujutatud alltoodul skeemil (Joonis 5). Kõigepealt kutsuti uuringusse SARS-CoV-2 viirusesse haigestunudega lähikontakti omanud, kuid mittenakatunud isikuid ning paluti neil täita ära küsimustik REDCap keskkonnas. Neid inimesi oli 1706 ja nendest 131 vastasid rahvusvahelises töögrupis kokkulepitud kriteeriumitele. Nendest omakorda 117 annetasid verd antikehade ja DNA isoleerimiseks. Kuna proove koguti üleriigiliselt, siis sõltuvalt kogumispunkti asukohast ei olnud osadelt inimestelt võimalik võtta vereproove in vitro stimulatsioonideks. Seetõttu määrati SARS-CoV-2 IgG antikehavastus kõigil 117 isikul, kuid erinevate stimulatsioonide tegemine ja tsütokiinide mõõtmine oli võimalik ainult 90nel inimesel. Seerumi kogumine ja SARS-CoV-2 IgG määramine toimus SYNLAB'is. 90nest patsiendist 42 andsid IgG antikehavastuseks negatiivse tulemuse ning 48 positiivse tulemuse. Valim koosneb 72 naisest ja 18 mehest. Valimi keskmine vanus on 45,5 aastat, mediaan on 45 aastat (kvartiilhaare ehk IQR on 37,25-54).



**Joonis 5.** Valimi moodustumise skeem. Küsimustikule vastanud inimesi oli 1706 ja nendest 131 sobisid uuringusse. Nendest omakorda 117 annetasid verd antikehade ja DNA isoleerimiseks ja erinevate stimulatsioonide tegemine ja tsütokiinide mõõtmine oli võimalik 90nel inimesel. 90nest patsiendist 42 andsid IgG antikehavastuseks negatiivse tulemuse ning 48 positiivse tulemuse.

### 2.3.2. T rakulise immuunvastuse määramine täisvere kultuuride stimulatsiooni abil SARS-CoV-2 viirusest pärit antigeenidega.

Selleks, et mõõta T-rakulist mäluvastust SARS-CoV2 suhtes, stimuleeriti vereproove erinevate sellest viirusest pärit antigeenidega („S”, „M” ja „N”). Antigeeni äratundmise järel hakkavad mälu-T-rakud tootma iseloomulikke tsütokiine, mida oli võimalik kogutud stimulatsioonisupernatandist mõõta LEGENDplex reaktsioonikomplektiga. Kõigepealt pakkus huvi, kuidas korreleerub ogavalgu vastane humoraalne vastus T-rakulise mäluvastusega. Need korrelatsioonigraafikud on kujutatud Joonisel 6. Sellel on näha erinevate tsütokiinivastuste ja SARS-CoV-2 antikehavastuse võrdlus, kusjuures kõige paremat korrelatsiooni IgG vastusega näitavad „S” stimulatsiooniga IL-2, IL-6 ja IFN $\gamma$ . IL-10 ja TNF $\alpha$  kontsentratsioon jäi paljudes proovides alla detektsioonitaseme.



**Joonis 6.** Ogavalgu vastase humoraalse vastuse Pearsoni korrelatsioonid S stimulatsiooni vastusena sekreteeritud tsütokiinidega. Kõige tugevamad seosed esinesid IL-2, IFN $\gamma$  ja IL-6 puhul. Mõõdetud LEGENDplex reaktsioonikomplektiga.

Järgnevalt võrreldi IL-2 „S” stimulatsiooni järel sekreteeritud tsütokiinide väärtuseid teiste stimulatsioonide poolt põhjustatud tsütokiinivastustega. Tulemusena on näha, et „S” stimulatsiooni põhjustatud tsütokiinide tootmise korrelatsioon „M” ja „N” stimulatsioonide järgsete tsütokiinide väärtustega on võrdlemisi nõrk. Tugevamat seost näitavad omavahel „M” ja „N” stimulatsioonide põhjustatud tsütokiinide väärtused (Lisa 3).

Kolmandaks vaadati IL-2 ja teiste tsütokiinide vahelisi seoseid (Lisa 4). Kõige paremini korreleeruvad teineteisega IL-2 ja IFN $\gamma$ , mis on mõlemad omandatud immuunsuse tsütokiinid. IL-2 väärtused näitasid nõrgemat seost IL-10, IL-6 ja iseäranis TNF $\alpha$ -ga, mis on eelkõige loomuliku immuunsuse tsütokiinid. Seega on nende tulemuste puhul oli näha tsütokiinide klasterdumist kahte gruppi: loomuliku ja omandatud immuunsuse tsütokiinid.

### **2.3.3. Tsütokiinide keskmised tasemed ogavalguga stimuleeritud proovides erinevad SARS-CoV-2 IgG negatiivsetel ja positiivsetel inimestel.**

Järgnevalt võrreldi LEGENDplex komplektiga mõõdetud tsütokiinide tasemeid SARS-CoV-2 IgG negatiivsete ja positiivsete isikute seas. Koostati karpdiagrammid ning andmete mediaanväärtused, kvartiilhaare (IQR) ja p-väärtused kanti Tabelisse 4. Koostatud diagrammid on uurimuse Lisas 5. Kuna andmed ei olnud jaotunud normaaljaotusega, tuli statistilise meetodina kasutada mitteparameetrist testi ning kuna andmegrupid on sõltumatud, siis kasutati Mann-Whitney U testi. Lisaks tehti ka p-väärtuste korrigeerimine Bonferroni meetodi järgi, et saadud väärtused oleksid võimalikult usaldusväärsed. Selleks, et saada korrigeeritud p-väärtus korrutati p-väärtused võrdluste arvuga ehk 15-ga. Testiti erinevust positiivsete ja negatiivsete IgG väärtustega inimeste tsütokiinide keskmiste väärtuste vahel. Statistiliselt oluliselt ( $\alpha=0,05$ ) erinesid teineteisest tsütokiinide väärtused, mis tekkisid vastusena “S” antigeenile.

Ühtlasi sai nende andmete põhjal järeldada, et kõige paremini eristas antikehade alusel jagatud grupe IL-2 (kõige väiksema p-väärtusega). Kuna korrelatsioonianalüüsist ilmselt, et SARS-CoV-2 IgG vastusega korreleerus kõige paremini ka just IL-2, siis valitigi edasiseks T-rakulise immuunsuse uurimiseks IL-2.

**Tabel 4.** Tsütokiinide kontsentratsioonide erinevused SARS-CoV2 S-RBD (ingl *spike protein receptor-binding domain*) IgG suhtes positiivsete ja negatiivsete isikute seas. Tabeli esimeses tulbas on ära toodud tsütokiinid ja vastavad stimulatsioonid („S” – ogavalk, „M” – membraanivalk, „N” - nukleokapsiidivalk). Teises tulbas on positiivse antikehavastusega isikute tsütokiinide mediaanväärtused ja sulgudes IQR väärtused. Kolmandas tulbas on negatiivse antikehavastusega isikute tsütokiinide mediaan- ja IQR väärtused (sulgudes). Neljandas tulbas vastavad p-väärtused ja viiendas tulbas Bonferroni meetodi järgi korrigeeritud p-väärtused.

Tsütokiin	S-RBD IgG pos (pg/ml)	S-RBD IgG neg (pg/ml)	p-väärtus	Korrigeeritud p-väärtus
IL-2 S	59,55 (25,14-87,06)	1 (1-2,503)	9,91E-14	1,48575E-12
IL-2 M	8,8 (1-32,61)	2,55 (1-16,49)	0,09063	1,35945
IL-2 N	1,07 (1-38,56)	1 (1-2,75)	0,01589	0,23835
IFN $\gamma$ S	141,69 (48,36-368,37)	6,16 (1-24,77)	3,35E-09	5,0205E-08
IFN $\gamma$ M	21,24 (1-113,43)	6,86 (1-110,5)	0,3744	5,616
IFN $\gamma$ N	13,61 (1-140,53)	8,73 (1-21,83)	0,2905	4,3575
IL-6 S	7070,5 (2068,26-19424,11)	120,45 (56,74-407,18)	1,16E-10	1,74195E-09
IL-6 M	622,62 (73,61-6798,94)	319 (75,17-4797,68)	0,7067	10,6005
IL-6 N	4904,5 (619,97-23972,52)	5102,18 (495,95-34920,64)	0,9774	14,661
IL-10 S	5,77 (1-28,75)	1 (1-1)	4,88E-07	7,3185E-06
IL-10 M	1 (1-10)	1 (1-1)	0,4176	6,264
IL-10 N	5,48 (1-45,37)	1 (1-40,23)	0,4985	7,4775
TNF $\alpha$ S	41,57 (0-6,36)	1 (0-3,17)	0,002661	0,039915
TNF $\alpha$ M	6,77 (0-5,3)	8,82 (0-4,43)	1	15
TNF $\alpha$ N	66,46 (0-5,17)	27,5 (0-5,65)	0,4415	6,6225

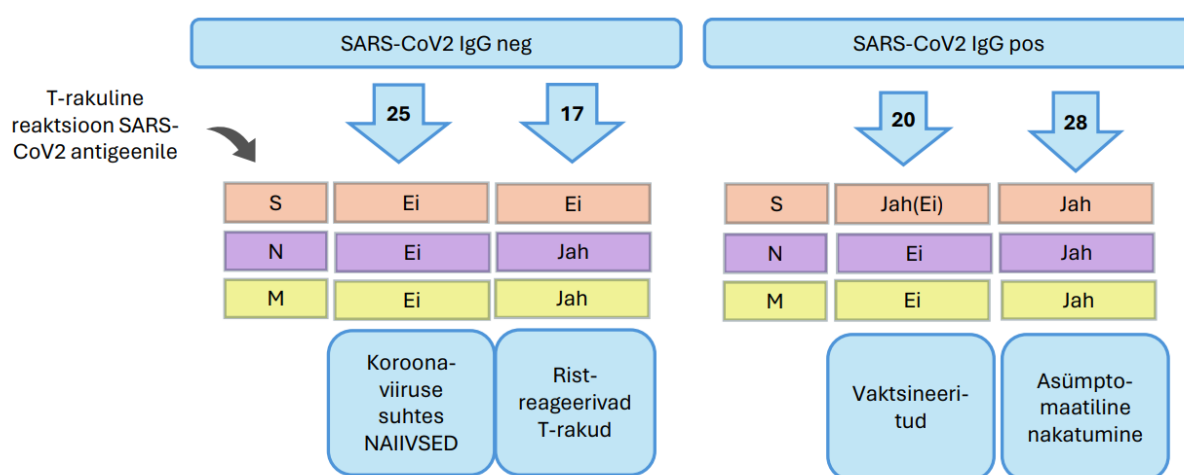
#### 2.3.4. Resistentsuse võimalikud põhjused erinevate stimulatsioonide põhjal

Varasemast analüüsist ilmnes, et kõikidest mõõdetud tsütokiinidest eristas RBD antikehade suhtes positiivseid negatiivsetest S-valgu toimel sekreteeritud IL-2 kontsentratsioon. Seetõttu otsustati ka „N” ja „M” spetsiifilise T-rakulise immuunvastuse hindamiseks kasutada vastavate stimulatsioonide järel sekreteeritud IL-2 kontsentratsiooni. Nivooks, millest alates loeti mõõdetud vastus positiivseks, oli „S” ja „M” stimulatsioonide puhul 6pg/ml ja „N” puhul 10pg/ml. Selle alusel saab inimesed jagada nelja gruppi (Joonis 7):

1. Inimesed, kellel ei tekkinud ühegi antigeeni vastu reaktsiooni, on viiruse suhtes täiesti naiivsed.
2. Inimesed, kellel tekkis T-rakuline reaktsioon ainult S-antigeeni vastu, on vaksineeritud (antikehavastus on hääbunud, kuid T-rakuline vastus on pikaajalisem ning on säilinud).

- Inimesed, kellel tekkis T-rakuline vastus N- ja/või M-antigeenide vastu, kuid S-antigeeni vastu mitte, on resistentsed arvatavasti ristreaktsiooni tõttu (eelnev kokkupuude mõne teise koroonaviirusega, millest säilisid ristreageerivad T-rakud).
- Kellel on reaktsioon kõigi antigeenidega, on viiruse ilmselt asümptomaatilisel läbi põdenud.

Vaadeldes kogupopulatsiooni on täielikult resistentsed ehk naiivsed 25 (28,89%), ristreageerivate T-rakkudega isikuid 17 (18,89%), vaktsineeritud inimesi 20 (21,11%) ja asümptomaatilisel nakatunuid 28 (31,11%). Vaadates ainult negatiivse anti-kehavastusega inimesi, esineb nende seas 59,5% juhtudel täielikku resistentsust ja 40,5% juhtudel kaitseb organismi viiruse eest tõenäoliselt ristreageerivate T-rakkude olemasolu.

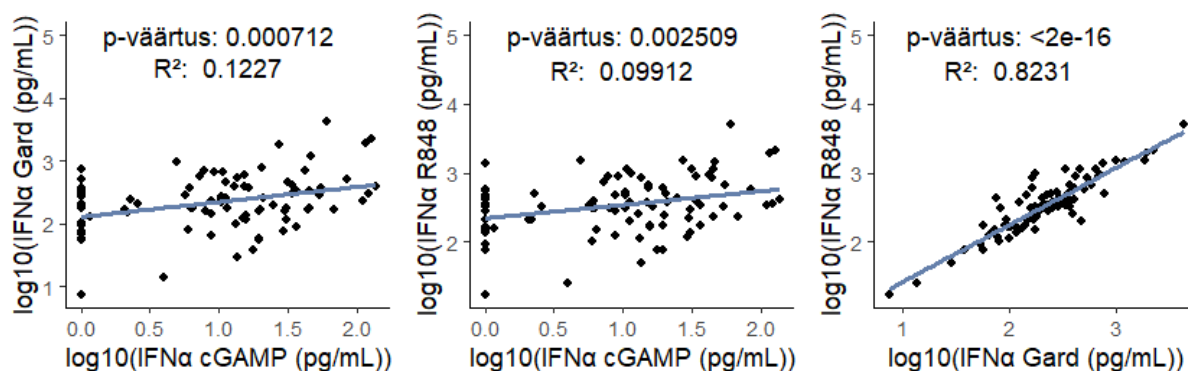


**Joonis 7.** Positiivsete ja negatiivsete SARS-CoV-2 IgG inimeste jaotumine gruppidesse IL-2 väärtuste põhjal. Valimi moodustanud inimesed jaotati IL-2 väärtuste põhjal nelja gruppi: COVID-19 suhtes täielikult naiivsed inimesed, vaktsineeritud isikud, ristreageerivate T-rakkudega ja asümptomaatilisel nakatunud inimesed.

### 2.3.5. IFN $\alpha$ tasemetes olulisi erinevusi gruppide vahel ei tuvastatud.

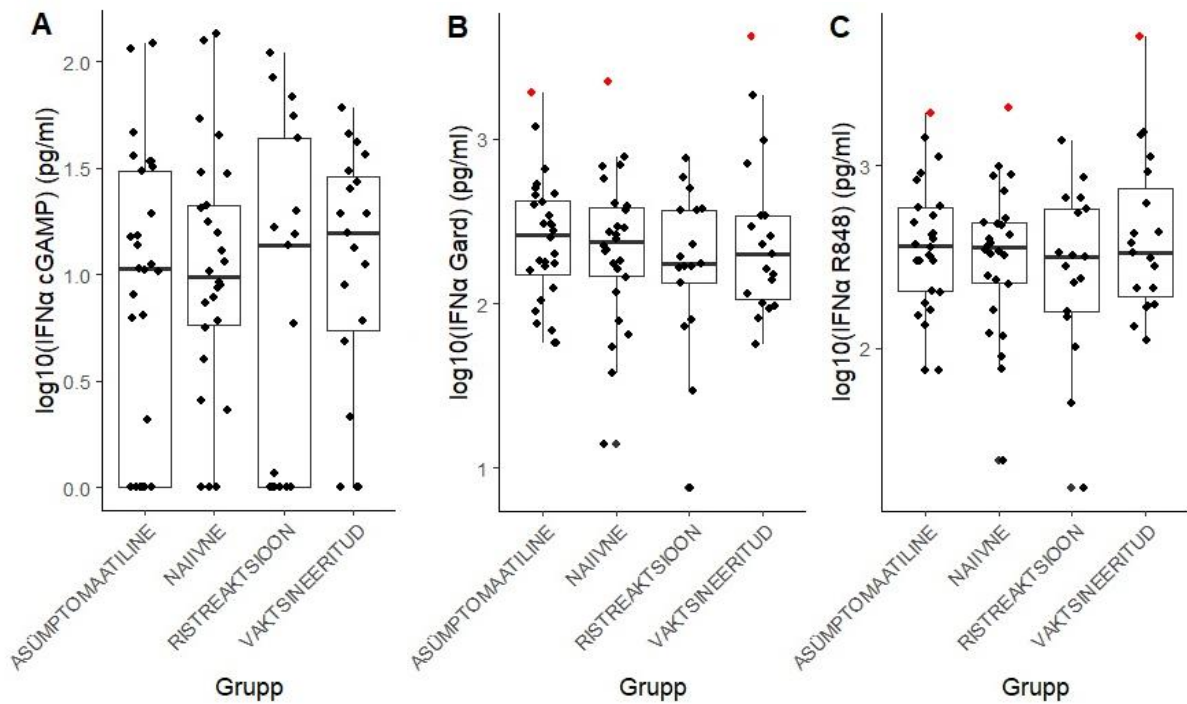
Proove stimuleeriti ka PRR ligandidega (Gard, cGAMP, R848), et aktiveerida loomulikku immuunsust. Selle tulemusena hakatakse tootma IFN $\alpha$ , mille mõõtmiseks kasutati ELISA meetodit. Kuna varasemalt on mõõdetud COVID-19 viirusesse raskelt nakatunute puhul väga madalad interferoonide tasemed, siis oli eesmärgiks tuvastada resistentsete inimeste seas kõrgete IFN $\alpha$  tasemetega isikud.

Kõigepealt sooritati korrelatsioonianalüüs, et näha võimalikke seoseid eri stimulatsioonide poolt käivitatud immuunvastuste vahel (joonis 8). Väga hea korrelatsioon on Gard ja R848 stimulatsioonide poolt esile kutsutud interferoonivastuste vahel. Need on mõlemad TLR7 agonistid, mistõttu on nende omavaheline korrelatsioon oodatav. cGAMP käivitab seevastu cGAS-STING rada ning on teistest stimulatsioonidest erinev.



**Joonis 8.** Pearsoni korrelatsioon erinevate stimulatsioonidega esilekutsutud interferoonivastuste vahel. Vasakult paremale: IFN $\alpha$  Gard vs cGAMP, IFN $\alpha$  R848 vs cGAMP, IFN $\alpha$  R848 vs Gard. cGAMP ja Gard antigeenidega stimuleeritud proovid korreleeruvad teineteisega paremini, kui teised. Mõõdetud ELISA meetodiga.

Järgmiseks võrreldi IFN $\alpha$  tasemeid eri stimulatsioonide puhul kõigis neljas T-rakulise reaktsiooni põhjal moodustatud kategoorias: täielikult naiivsed, ristreageerivate T-rakkudega inimesed, viiruse asümptomaatiliselt läbipõdenud ja vaksineeritud inimesed (joonis 9). Tulemustest on näha, et teineteisega sarnanevad Gard ja R848 stimulatsioonide poolt käivitatud interferoonivastused (B ja C), mis ühtib korrelatsioonianalüüsiga. Punasega on tähistatud teistest kõrgemate (>1900 pg/ml) IFN $\alpha$  tasemetega isikud. Andmepunktid graafikutele B ja C tähistavad samu inimesi, seega tulid esile kolm inimest: resistantsete inimeste grupis, vaksineeritute grupis ja asümptomaatiliselt nakatunute grupis. Testimaks, kas mõne stimulatsiooni puhul esineb nelja grupi vahel statistiliselt olulist erinevust, kasutati mitteparameetrilist Kruskal-Wallis testi RStudio programmis. Ühtegi statistilist olulisust ei esine ( $\alpha = 0,05$ ).

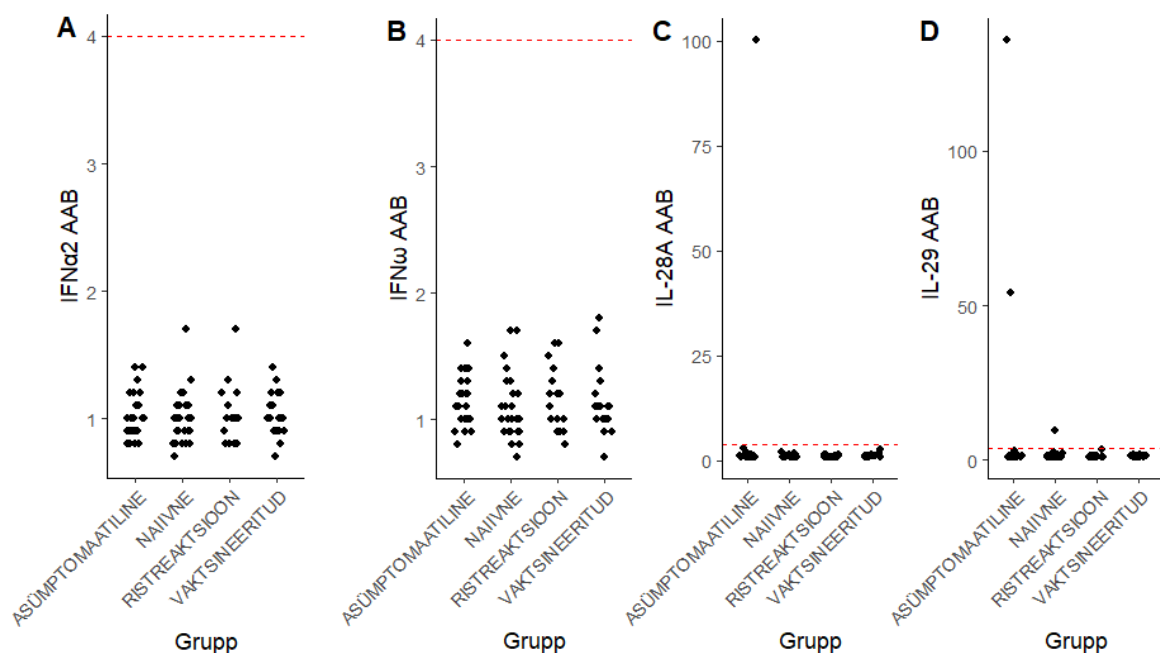


**Joonis 9.** IFN $\alpha$  tasemed erinevate stimulatsioonide (cGAMP, Gard, R848) puhul, mõõdetud ELISA meetodiga. Kujutatud on kõik T-rakulise reaktsiooni alusel moodustatud rühmad võrdlemaks IFN $\alpha$  tasemeid nendes gruppides. Karpdiagrammide ülemised ja alumised servad tähistavad IQR vahemikku ja “vurrud” tähistavad 95% usaldusintervalli. Gard ja R848 (B ja C) stimulatsioonide vastused on sarnase profiiliga ning mõlema puhul on näha andmepunkte, mis tähistavad populatsioonist kõrgemaid IFN $\alpha$  tasemeid (>1900 pg/ml; punased). Olulise erinevuse testimiseks kasutati Kruskal-Wallis testi, oluliselt erinevaid väärtusi ei esinenud.

### 2.3.6. Resistentsetel isikutel puuduvad autoantikehad I tüüpi interferoonide vastu.

Varasemalt on leitud SARS-CoV-2 viirusesse raskelt haigestunudel I tüüpi interferoonide vastaseid autoantikehi. Seetõttu mõõdeti LIPS meetodiga uuritavatelt inimestelt kogutud proovides I tüüpi IFN ja võrdluseks ka III tüüpi IFN-de vastaste autoantikehade tasemed. LIPS analüüsist selgus, et uuritavatel inimestel puuduvad valdavalt I tüüpi IFN-de (IFN $\alpha$ 2 ja IFN $\omega$ ) vastased AAB-d ja III tüüpi IFN-de (IL-28A ja IL-29) vastased AAB-d on haruldased. Autoantikehade tasemetest koostati karpdiagrammid, millel on näha nende madalad tasemed (Joonis 10).

Siiski leidub üksikuid, kelle puhul on autoantikehade kogus suurem. Tiitri positiivsuse nivoo on 4. Valimis oleva 90ne inimese seas esineb autoantikehi kolme inimese seas ja need kõik on III tüüpi IFN-de vastased. Jälgides ainult resistentsete inimeste rühma (n=25) esineb positiivsuspäärist kõrgem väärtus ainult ühel isikul (ainult IL-29 ehk III tüüpi IFN-de vastu).



**Joonis 10.** Autoantikehad I tüüpi (IFN $\alpha$ 2, IFN $\omega$ ) ja III tüüpi (IL-28A, IL-29) interferoonide vastu. Mõõdetud LIPS meetodiga. Autoantikehade positiivsusnivooks oli 4 (punane katkendjoon). Resistentete ehk naiivsete inimeste grupis esineb üks positiivse antikehastiitriga isik (D).

## 2.4. Arutelu

Töö eesmärgiks oli valimist tuvastada SARS-CoV-2 viiruse suhtes resistentsed inimesed ning uurida nende immunoloogilisi parameetreid. Selleks analüüsiti COVID-19 viirusesse nakatumata, kuid haigestunuga lähikontakti omanud isikute T-rakulist vastust viiruse antigeenidele ja IFN $\alpha$  toodangut vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele ning autoantikehade esinemist I ja III tüüpi IFN-de vastu.

T-rakulise vastuse uurimisel leiti kõigepealt, et SARS-CoV-2 ogavalgu vastase antikehavastusega korreleeruvad kõige paremini ogavalgu ehk „S” antigeeni poolt stimuleeritud IL-2, IFN $\gamma$  ja IL-6 väärtused. See on oodatav tulemus, kuna mõlemal juhul toimub spetsiifiline reaktsioon ogavalgu vastu. Veel on näha, et võrreldes IL-2 väärtusi erinevate stimulatsioonide puhul, näitavad tugevamat korrelatsiooni „N” ja „M” antigeenide poolt käivitatud tsütokiinivastused. Kuna vaktsiinis kasutati antigeenina ogavalgu, siis viitab eksklusiivselt ogavalgu „S” vastane immuunreaktsioon sellele, et see inimene on vaktsineeritud. „N” ja „M” stimulatsioonide vastase immuunreaktsiooni teke viitab seevastu ristreegerivate T-rakkude olemasolule ja/või viiruse läbipõdemisele. Seetõttu on ka loogiline, et „N” ja „M” stimulatsioonide indutseeritud immuunvastuste omavaheline seos on tugevam, kui nende seos „S” antigeeni poolt tekitatud tsütokiinivastusega.

Võrreldes teisi tsütokiine IL-2 väärtustega, eristuvad teineteisest omandatud ja loomuliku immuunsuse tsütokiinid ning moodustavad seega kaks rühma. IL-2 väärtustega korreleerub kõige paremini IFN $\gamma$ , mis on mõlemad omandatud immuunsuse tsütokiinid ja neid toodavad T-rakud (Abbas jt., 2021; Uibo jt., 2015). IL-2 väärtustega näitavad nõrgemat seost IL-10, IL-6 ja iseäranis TNF $\alpha$ , mis on kõik eelkõige loomuliku immuunsuse tsütokiinid ja mida toodavad lisaks T-rakkudele ka monotsüüdid ning makrofaagid. (Abbas jt., 2021; Kany jt., 2019; Uibo jt., 2015).

Järgmiseks võrreldi positiivse ja negatiivse antikehavastusega isikute tsütokiinivastuseid erinevate viiruse antigeenide vastu („S”, „M” ja „N”). Selgus, et positiivse ja negatiivse antikehavastusega inimeste seas erinevad teineteisest oluliselt ogavalguga stimuleeritud proovid, teiste stimulatsioonidega mõjutatud proovide vahel ei esine olulist erinevust. Kuna antikehavastus määrati samuti ogavalgu alusel, siis on ootuspärane, et „S” stimulatsiooniga mõjutatud proovides on positiivsetel isikutel tugevam T-rakuline vastus kui negatiivsetel isikutel. See kattub ka korrelatsioonianalüüsi käigus saadud tulemustega. Järgmiseks sai nende tulemuste alusel välja valida kõige paremini neid kahte rühma eristava tsütokiini, milleks oli IL-2. Selle põhjal sai kindlaks määrata, milliste antigeenide vastu esines inimestes T-rakuline vastus ja milliste vastu vastust ei tekkinud.

Olenevalt sellest, kas antigeenide vastu esines T-rakuline reaktsioon või mitte, sai otsustada, kui paljud valimi moodustavad inimesed on SARS-CoV-2 suhtes täielikult resistentsed (28,89%), kui paljudel esinevad tõenäoliselt ristreageerivad T-rakud (18,89%), kui paljud on vaktsineeritud (21,11%) ja kui paljud on viiruse ilmselt asümptomaatiliselt läbi põdenud (31,11%). Ainult negatiivse antikehavastusega inimeste seas esineb 59,5% juhtudel täielikku resistentsust ja 40,5% juhtudel kaitseb viiruse eest tõenäoliselt ristreageerivate mälu-rakkude olemasolu. Sellest saab järeldada, et ühest küljest kaitsevad inimesi viiruse eest ristreageerivad T-rakud mõnest varasemast kokkupuutest teise koroonaviirusega, mis neutraliseerivad viiruse enne sümptomite teket (Braun jt., 2020; Mateus jt., 2020; Nelde jt., 2021; Tso jt., 2020). Teisest küljest võivad inimesed olla nõ „täielikult resistentsed”, mille põhjused võivad olla erinevad, mistõttu tasuks naiivsete inimeste puhul teha edasine geeniuuring, et leida resistentsuse geneetilisi põhjuseid. Näiteks võiks otsida sisenemisretseptori ACE2 konformatsioonis muutusi põhjustavate geenivariantide olemasolu nagu HIV retseptori puhul (Hütter jt., 2009) või interferoonide ja tsütokiinide tootmisel osalevate geenivariantide olemasolu, kuna on leitud IFN-de puudulikkust põhjustavaid mutatsioone (Zhang jt., 2020). Ka ristreageerivate T-rakkude osas tuleks sooritada edasine uuring täpsemate meetoditega, näiteks proovida neid tuvastada voolutsütomeetriaga.

Selleks, et uurida IFN $\alpha$  toodangut vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele, stimuleeriti proove järgmiste PRR ligandidega: Gard, cGAMP, R848. Stimulatsioonile järgnevalt aktiveerub loomulik immuunsus ja hakatakse tootma IFN $\alpha$ . Varasemalt on täheldatud SARS-CoV-2 viirusesse raskelt nakatunute puhul väga madalaid I tüüpi interferoonide tasemeid (Hadjadj jt., 2020; Su jt., 2023; Vanker, 2022), mistõttu oli eesmärgiks tuvastada resistentsete inimeste seas kõrgete IFN $\alpha$  tasemetega isikud. Analüüsi tulemusena oli näha, et R848 ja Gard antigeenide järgselt sekreteeritud IFN $\alpha$  väärtused korreleeruvad teineteisega väga hästi. Kuna need on mõlemad TLR-7 agonistid, kuid cGAMP on cGAS-STING signaaliraja käivitaja, on see tulemus ootuspärane. Koostatud karpdiagrammide puhul oli näha samasugust üldpilti ning ühtlasi tulid välja kolm inimest, kelle puhul oli IFN $\alpha$  tase teistest palju kõrgem: üks resistentsete inimeste, teine vaksineeritute ja kolmas asümptomaatiliseltselt haigetunute grupis. Kui selle vaksineeritud indiviidi puhul toimus kokkupuude haigega enne vaksineerimist, siis tasub tema ja täielikult resistentse inimese puhul uurida kõrge interferoonitaseme geneetilisi põhjuseid.

Viimasena uuriti I tüüpi IFN-de (IFN $\alpha$ 2 ja IFN $\omega$ ) ja III tüüpi IFN-de (IL-28A ja IL-29) vastaste autoantikehade olemasolu. Varasemalt on täheldatud, et raskesti haigestunud COVID-19 patsientidel esineb I tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi (Bastard jt., 2023). III tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi on leitud pigem viiruse suhtes naiivsetes inimestes, kuid sel juhul ei olnud tegu neutraliseerivate antikehadega (Vanker 2023). Käesolevas uurimuses selgus, et autoantikehi leidis kolmel inimesel 90st ja täielikult resistentsetel inimestel ainult ühel juhul 25st. Seega ei esine resistentsete inimeste seas I tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi ja III tüüpi IFN-de vastased AAB-d on haruldased. Edaspidi võiks testida nende leitud autoantikehade neutraliseerimisaktiivsust.

Selle töö esimeseks hüpoteesiks oli, et resistentsete isikute hulgas on kõrge I tüüpi IFN-de toodanguga isikuid. Seda toetavaid tulemusi õnnestus leida, kuigi tuvastati ainult üksikud kõrge interferoonivastusega inimesed. Selle puhul tasub ära märkida asjaolu, et käesolevas uurimuses kasutatatud valim ja selles leiduv resistentsete inimeste hulk oli pigem väike ( $n_{\text{valim}}=117$  ja  $n_{\text{resistentsete}} = 25$ ), mis võib olla põhjuseks, miks ei õnnestunud leida rohkem selliseid inimesi.

Töö teiseks hüpoteesiks oli, et resistentsetel inimestel puuduvad neutraliseerivad antikehad interferoonide vastu. Leitud andmed kinnitavad seda hüpoteesi: I tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi ei leitud resistentsete inimeste seas üldse ning III tüüpi IFN-de vastu esines autoantikehi ainult ühe inimese puhul (tuleks veel kindlaks määrata, kas nende puhul on tegu neutraliseerivate antikehadega või mitte).

## KOKKUVÕTE

SARS-CoV-2 nakkus võidakse läbi põdeda asümptomaatiliselt või kergelt, kuid paljud inimesed võivad vajada haiglaravi ning haigestuvad viirusega nakatudes väga raskelt. On ka neid, kes ei haigestu üldse ning kellel arvatakse olevat SARS-CoV-2 viirusevastane loomulik resistentsus. Väga raskeid haigusjuhte ning nende põhjuseid on palju uuritud, kuid resistentsete inimeste kohta on vähem teadmisi. Selleks, et saada selles osas rohkem selgust ning mõista paremini viiruse patogeneesi, on vaja uurida ka neid, kes ei nakatunud, kuigi nad olid lähikontaktis viirusesse haigestunuga.

Selle bakalaureusetöö eesmärgiks oli leida põhjus, miks need inimesed ei nakatunud ja tuvastada populatsioonis resistentsed inimesed ning uurida nende immunoloogilisi parameetreid. Selleks mõõdeti vabatahtlike verest tsütokiine, mida sekreteeriti T-rakulise vastusena SARS-CoV-2 antigeenidele, IFN $\alpha$  toodangut vastuseks TLR7/8 ja cGAS-STING raja ligandidele ning autoantikehade esinemist I ja III tüüpi IFN-de vastu.

Töö tulemusena suudeti T-rakulise vastuse põhjal populatsioonis tuvastada neli gruppi inimesi. Kõigepealt eristusid teistest vaktsineeritud ja asümptomaatiliselt COVID-19 läbipõdenud inimesed. Ülejäänud viirusega mittenakatunud moodustasid esiteks selle viiruse suhtes täiesti naiivse grupi ja teise grupi moodustasid need, kellel ilmselt eksisteerisid mõne teise koroonaviirusega varasema kokkupuute tõttu tekkinud ristreageerivad T rakud, mis neid SARS-CoV-2 eest kaitsesid. Seejärel leiti kaks kõrgete IFN $\alpha$  tasemetega isikut, kellest üks oli resistentsete inimeste grupis ning teine vaktsineeritute grupis. I tüüpi IFN-de vastaseid autoantikehi resistentsete inimeste seas ei leitud ning vaid ühel juhul täheldati III tüüpi IFN-de vastaste autoantikehade olemasolu. Seega saab järeldada, et ühest küljest kaitsevad SARS-CoV-2 eest inimesi ristreageerivad T-rakud ning teisest küljest on osad inimesed loomupäraselt resistentsed, millel võivad olla erinevad geneetilised põhjused, mida tuleks edaspidi veel uurida. Samuti puuduvad resistentsitel inimestel I tüüpi IFNe neutraliseerivad autoantikehad.

# SUMMARY

## **Immunological parameters of SARS-CoV-2 resistant patients**

Gerli Rukis

### Summary

The course of SARS-CoV-2 can be asymptomatic or cause slight disease but can in some cases even lead to hospitalization and cause severe illness. There are individuals who don't get infected and who are therefore considered resistant against COVID-19. There has been a lot of research looking into the causes of severe cases of COVID-19 infection, but there's a lot less information available about resistant people. To get more insight into viral resistance and understand the pathology of this virus, those individuals who didn't get infected must also be investigated.

The aim of this thesis was to identify resistant people inside the sample group and investigate their immunological parameters. To accomplish this, T cell response to viral antigens was measured from whole blood supernatants, secretion of IFN $\alpha$  after stimulating the samples with TLR7/8 and cGAS-STING signalling pathway ligands was determined and presence of autoantibodies against type I and type III interferons was examined.

The sample population was divided into groups based on measured T cell responses. People who were vaccinated and those who were asymptotically infected were separated from others and the people who didn't get infected with SARS-CoV-2 split into two main groups: those who are completely naive against SARS-CoV-2 and those who are probably protected by cross-reactive T cells from a previous contact with another coronavirus. Secondly, two people with higher IFN $\alpha$  levels were identified, who belong in resistant and vaccinated groups and who should be further examined to reveal any possible genetic causes. Additionally no autoantibodies against type I IFNs were found among resistant people and AABs to type III IFNs were rare.

## TÄNUSÕNAD

Sooviksin tänada oma juhendajaid Kai Kisandit ja Arnold Kristjuhanit, kes olid mulle väga suureks abiks selle bakalaureusetöö kirjutamisel. Samuti tänan kõiki teisi molekulaarpatoloogia uurimisgrupis, kes mind laboritöö juures juhendasid ja abistasid, eriti Annika Hälingut ja Martti Vankerit. Lisaks neile tänan kõiki uurimisgrupi liikmeid, kes olid teinud laboratoorseid ettevalmistusi ja eeltöid, mis olid minu tehtud töö aluseks.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. ja Pillai, S. (2021). *Cellular and molecular immunology*, 10th edition, p. 98, 217-219, 345. Elsevier, Philadelphia.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. ja Pillai, S. (2023). *Basic Immunology: Functions and disorders of the immunsysem*, 7th edition. p. 11, 24-30, 37-43. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Andreacos, E., Abel, L., Vinh, D. C., Kaja, E., Drolet, B. A., Zhang, Q., O'Farrelly, C., Novelli, G., Rodríguez-Gallego, C., Haerynck, F., Prando, C., Pujol, A., Su, H. C., Casanova, J.-L. ja Spaan, A. N. (2022). A global effort to dissect the human genetic basis of resistance to SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology*, 23(2), 159–164. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01030-z>
- Ballow, M. ja Haga, C., L. (2021). Why do some people develop serious COVID-19 disease after infection, while others only exhibit mild symptoms? *The Journal of Allergy and Clinical Immuology: In Practice*, 9(4), 1442-1448. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2021.01.012>
- Bastard, P., Rosen, L. B., Zhang, Q., Michailidis, E., Hoffmann, H.-H., Zhang, Y., Dorgham, K., Philippot, Q., Rosain, J., Béziat, V., Manry, J., Shaw, E., Haljasmägi, L., Peterson, P., Lorenzo, L., Bizien, L., Trouillet-Assant, S., Dobbs, K., de Jesus, A. A., ... Casanova, J.-L. (2020). Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, 370(6515), eabd4585. <https://doi.org/10.1126/science.abd4585>
- Bonilla, F. A. ja Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2), S33–S40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Braun, J., Loyal, L., Frentsch, M., Wendisch, D., Georg, P., Kurth, F., Hippenstiel, S., Dingeldey, M., Kruse, B., Fauchere, F., Baysal, E., Mangold, M., Henze, L., Lauster, R., Mall, M. A., Beyer, K., Röhmel, J., Voigt, S., Schmitz, J., ... Thiel, A. (2020). SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*, 587(7833), 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
- Contoli, M., Papi, A., Tomassetti, L., Rizzo, P., Segal, F. V. D., Fortini, F., Torsani, F., Morandi, L., Ronzoni, L., Zucchetti, O., Pavasini, R., Fogagnolo, A., Volta, C. A., Bartlett, N. W., Johnston, S. L., Spadaro, S. ja Campo, G. (2021). Blood Interferon- $\alpha$  levels and severity,

outcomes, and inflammatory profiles in hospitalized COVID-19 patients. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.648004>

Dee, K., Goldfarb, D. M., Haney, J., Amat, J. A. R., Herder, V., Stewart, M., Szemiel, A. M., Baguelin, M. ja Murcia, P. R. (2021). Human Rhinovirus Infection Blocks Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Replication Within the Respiratory Epithelium: Implications for COVID-19 Epidemiology. *The Journal of Infectious Diseases*, 224(1), 31–38. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab147an>

Galani, I.-E., Rovina, N., Lampropoulou, V., Triantafyllia, V., Manioudaki, M., Pavlos, E., Koukaki, E., Fragkou, P. C., Panou, V., Rapti, V., Koltsida, O., Mentis, A., Koulouris, N., Tsiodras, S., Koutsoukou, A. ja Andreacos, E. (2021). Untuned antiviral immunity in COVID-19 revealed by temporal type I/III interferon patterns and flu comparison. *Nature Immunology*, 22(1), 32–40. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00840-x>

Gandhi R. T., Lynch J. B. ja del Rio C. (2020). Mild or Moderate Covid-19. *New England Journal of Medicine*, 383(18), 1757–1766. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2009249>

Hadjadj, J., Yatim, N., Barnabei, L., Corneau, A., Boussier, J., Smith, N., Péré, H., Charbit, B., Bondet, V., Chenevier-Gobeaux, C., Breillat, P., Carlier, N., Gauzit, R., Morbieu, C., Pène, F., Marin, N., Roche, N., Szwebel, T.-A., Merklings, S. H., ... Terrier, B. (2020). Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. *Science*, 369(6504), 718–724. <https://doi.org/10.1126/science.abc6027>

Horowitz, J. E., Kosmicki, J. A., Damask, A., Sharma, D., Roberts, G. H. L., Justice, A. E., Banerjee, N., Coignet, M. V., Yadav, A., Leader, J. B., Marcketta, A., Park, D. S., Lanche, R., Maxwell, E., Knight, S. C., Bai, X., Guturu, H., Sun, D., Baltzell, A., ... Ferreira, M. A. R. (2022). Genome-wide analysis provides genetic evidence that ACE2 influences COVID-19 risk and yields risk scores associated with severe disease. *Nature Genetics*, 54(4), 382–392. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-01006-7>

Hütter G., Nowak D., Mossner M., Ganepola S., Müßig Arne, Allers K., Schneider T., Hofmann J., Kücherer C., Blau O., Blau I. W., Hofmann W. K. ja Thiel E. (2009). Long-Term Control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine*, 360(7), 692–698. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802905>

Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. ja Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>

- Kany, S., Vollrath, J. T., ja Relja, B. (2019). Cytokines in Inflammatory Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Khan, F. M., Ahmad, T., Gulistan, M., Chammam, W., Khan, M. ja Hui, J. (2021). Epidemiology of coronaviruses, genetics, vaccines, and scenario of current pandemic of coronavirus diseases 2019 (COVID-19): A fuzzy set approach. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(5), 1296–1303. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1798697>
- Lv, N., Zhao, Y., Liu, X., Ye, L., Liang, Z., Kang, Y., Dong, Y., Wang, W., Kolliputi, N. ja Shi, L. (2022). Dysfunctional telomeres through mitostress-induced cGAS/STING activation to aggravate immune senescence and viral pneumonia. *Aging Cell*, 21(4), e13594. <https://doi.org/10.1111/accel.13594>
- Martono, Fatmawati, F. ja Mulyanti, S. (2023). Risk Factors Associated with the Severity of COVID-19. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 30(3), 84–92. <https://doi.org/10.21315/mjms2023.30.3.7>
- Mateus, J., Grifoni, A., Tarke, A., Sidney, J., Ramirez, S. I., Dan, J. M., Burger, Z. C., Rawlings, S. A., Smith, D. M., Phillips, E., Mallal, S., Lammers, M., Rubiro, P., Quiambao, L., Sutherland, A., Yu, E. D., da Silva Antunes, R., Greenbaum, J., Frazier, A., ... Weiskopf, D. (2020). Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. *Science*, 370(6512), 89–94. <https://doi.org/10.1126/science.abd3871>
- Meister, T., Suija, K., Kalda, R. ja Uusküla, A. (2022). COVID-19 raske kulu riskifaktorid. *Perearst*, 3(177), 100-103. Vaadatud 03.12.2023, [https://www.med24.ee/sites/default/files/perearst\\_pdf/100-103.pdf](https://www.med24.ee/sites/default/files/perearst_pdf/100-103.pdf)
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S. ja Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>
- Nelde, A., Bilich, T., Heitmann, J. S., Maringer, Y., Salih, H. R., Roerden, M., Lübke, M., Bauer, J., Rieth, J., Wacker, M., Peter, A., Hörber, S., Traenkle, B., Kaiser, P. D., Rothbauer, U., Becker, M., Junker, D., Krause, G., Strengert, M., ... Walz, J. S. (2021). SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nature Immunology*, 22(1), 74–85. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00808-x>

- Netea, M. G., Domínguez-Andrés, J., van de Veerdonk, F. L., van Crevel, R., Pulendran, B. ja van der Meer, J. W. M. (2022). Natural resistance against infections: Focus on COVID-19. *Trends in Immunology*, 43(2), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.12.001>
- Neufeldt, C. J., Cerikan, B., Cortese, M., Frankish, J., Lee, J.-Y., Plociennikowska, A., Heigwer, F., Prasad, V., Joecks, S., Burkart, S. S., Zander, D. Y., Subramanian, B., Gimi, R., Padmanabhan, S., Iyer, R., Gendarme, M., El Debs, B., Halama, N., Merle, U., ... Bartenschlager, R. (2022). SARS-CoV-2 infection induces a pro-inflammatory cytokine response through cGAS-STING and NF- $\kappa$ B. *Communications Biology*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02983-5>
- Opal, S. M., Girard, T. D. ja Ely, E. W. (2005). The Immunopathogenesis of Sepsis in Elderly Patients. *Clinical Infectious Diseases*, 41(Supplement\_7), S504–S512. <https://doi.org/10.1086/432007>
- Parkin, J. ja Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *The Lancet*, 357(9270), 1777–1789. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Sommereyns, C., Paul, S., Staeheli, P. ja Michiels, T. (2008). IFN-Lambda (IFN- $\lambda$ ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. *PLOS Pathogens*, 4(3), e1000017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000017>
- Su, H. C., Jing, H., Zhang, Y. ja Casanova, J.-L. (2023). Interfering with Interferons: A Critical Mechanism for Critical COVID-19 Pneumonia. *Annual Review of Immunology*, 41(Volume 41, 2023), 561–585. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-101921-050835>
- Tso, F. Y., Lidenge, S. J., Peña, P. B., Clegg, A. A., Ngowi, J. R., Mwaiselage, J., Ngalamika, O., Julius, P., West, J. T. ja Wood, C. (2021). High prevalence of pre-existing serological cross-reactivity against severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) in sub-Saharan Africa. *International Journal of Infectious Diseases*, 102, 577–583. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.104>
- Uibo, R., Kisand, K., Peterson, P. ja Reimand, K. (2015). *Immunoloogia: õpik kõrgkoolidele*, 19-20, 74-76, 115, 153-155, 163-168, 191-192. Tartu: Tartu Ülikooli Kirjastus.
- Vanker, M. (2022). Seosed interferoonide ja COVID-19 vahel: mõju haiguspildile ning rakendused ravis. *Eesti Arst*, 101, 365-373. Vaadatud 03.11.2023, <https://eestiartst.ee/seosed-interferoonide-ja-covid-19-vahel-moju-haiguspildile-ning-rakendused-ravis/>

- Vanker, M., Särekannu, K., Fekkar, A., Jørgensen, S. E., Haljasmägi, L., Kallaste, A., Kisand, K., Lember, M., Peterson, P., Menon, M., Hussell, T., Knight, S., Moore-Stanley, J., Bastard, P., Zhang, S.-Y., Mogensen, T. H., Philippot, Q., Zhang, Q., Puel, A., ... Kisand, K. (2023). Autoantibodies Neutralizing Type III Interferons Are Uncommon in Patients with Severe Coronavirus Disease 2019 Pneumonia. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *43*(9), 379–393. <https://doi.org/10.1089/jir.2023.0003>
- Wack, A., Terczyńska-Dyla, E. ja Hartmann, R. (2015). Guarding the frontiers: The biology of type III interferons. *Nature Immunology*, *16*(8), 802–809. <https://doi.org/10.1038/ni.3212>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C. ja Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, Y., Zhang, M., Yuan, C., Ma, Z., Li, W., Zhang, Y., Su, L., Xu, J. ja Liu, W. (2022). Progress of cGAS-STING signaling in response to SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1010911>
- Xia, B., Shen, X., He, Y., Pan, X., Liu, F.-L., Wang, Y., Yang, F., Fang, S., Wu, Y., Duan, Z., Zuo, X., Xie, Z., Jiang, X., Xu, L., Chi, H., Li, S., Meng, Q., Zhou, H., Zhou, Y., ... Gao, Z. (2021). SARS-CoV-2 envelope protein causes acute respiratory distress syndrome (ARDS)-like pathological damages and constitutes an antiviral target. *Cell Research*, *31*(8), 847–860. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00519-4>
- Xia, H., Cao, Z., Xie, X., Zhang, X., Chen, J. Y.-C., Wang, H., Menachery, V. D., Rajsbaum, R. ja Shi, P.-Y. (2020). Evasion of Type I Interferon by SARS-CoV-2. *Cell Reports*, *33*(1), 108234. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108234>
- Zhang, J.-M. ja An, J. (2007). Cytokines, Inflammation, and Pain. *International Anesthesiology Clinics*, *45*(2), 27. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, Q., Bastard, P., Liu, Z., Le Pen, J., Moncada-Velez, M., Chen, J., Ogishi, M., Sabli, I. K. D., Hodeib, S., Korol, C., Rosain, J., Bilguvar, K., Ye, J., Bolze, A., Bigio, B., Yang, R., Arias, A. A., Zhou, Q., Zhang, Y., ... Casanova, J.-L. (2020). Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*, *370*(6515), eabd4570. <https://doi.org/10.1126/science.abd4570>

- Zhou, F., Yu, T., Du, R., Fan, G., Liu, Y., Liu, Z., Xiang, J., Wang, Y., Song, B., Gu, X., Guan, L., Wei, Y., Li, H., Wu, X., Xu, J., Tu, S., Zhang, Y., Chen, H. ja Cao, B. (2020a). Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: A retrospective cohort study. *The Lancet*, 395(10229), 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
- Zhou, Z., Zhang, X., Lei, X., Xiao, X., Jiao, T., Ma, R., Dong, X., Jiang, Q., Wang, W., Shi, Y., Zheng, T., Rao, J., Xiang, Z., Ren, L., Deng, T., Jiang, Z., Dou, Z., Wei, W. ja Wang, J. (2021). Sensing of cytoplasmic chromatin by cGAS activates innate immune response in SARS-CoV-2 infection. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00800-3>
- Zinatizadeh, M. R., Zarandi, P. K., Ghiasi, M., Kooshki, H., Mohammadi, M., Amani, J. ja Rezaei, N. (2023). Immunosenescence and inflamm-ageing in COVID-19. *Ageing Research Reviews*, 84, 101818. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2022.101818>

# LISAD

## LISA 1. COVID-19 suhtes resistentsete isikute eeluuringu küsimustik

Kutsume Teid täitma eeluuringu küsimustikku, et teha kindlaks kas Te sobite uuringusse „COVID-19 suhtes resistentsete inimeste rahvusvaheline uuring“.

Rahvusvaheline konsortsium COVID HUMAN GENETIC EFFORT <https://www.covidhge.com/> J-L Casanova juhtimisel, milles osalevad ka Tartu Ülikooli teadlased, on avaldanud juba terve rea teadustöid COVID-19 kulu iseärasuste geneetilistest ja immunoloogilistest põhjustest. Raske COVID-19 kuluga on seotud geenide variandid, mis häirivad viirusevastaste valkude, interferoonide süsteemi tööd. Samuti on haiguse raske kulu riskiteguriks autoantikehad, mis neutraliseerivad interferoonide toime.

Väga oluline on uurida ka geneetilisi ja immunoloogilisi iseärasusi, mis võivad muuta inimesi SARS-CoV-2 nakkuse suhtes resistentseteks. SARS-CoV-2 viiruse ülekandumine toimub sageli pereringis. Siiski ei pruugi mõned suure viiruskoormuse all olnud isikud üldse nakatuda. Projekti käigus otsitakse ja uuritakse inimesi, kes ei ole SARS-CoV-2-ga nakatunud vaatamata lähedasele kokkupuutele COVID-19 põdeva haigega. Uuring on põhjendatud ja vajalik, et aidata leida paremaid viise selle viirusega võitlemiseks.

Võtame Teiega ühendust ja anname teada, et kas Te sobite sellesse uuringusse.

Eeluuringu küsimustiku täitmine on vabatahtlik ja ei kohusta Teid uuringus osalema. Isegi kui Te vastate uuringu tingimustele ja otsustate uuringus osaleda, võite Te hiljem ümber mõelda ning uuringust keelduda. Kui Te sobite ning kaalute uuringus osalemist, siis tutvustatakse Teile detailselt peauuringu katseprotseduure, riske ning potentsiaalset kasu. See küsimustik on loodud veebipõhise vahendi abil nimega REDCap. REDCapil on funktsioonid, mis aitavad hoida Teie andmeid turvalisena. Küsimustiku täitmine võtab umbes 10 minutit aega.

Kui Teil on küsimusi selle küsimustiku või uuringu kohta, siis palun võtke julgelt ühendust. Võite kirjutada uurimisrühmale aadressil [kai.kisand@ut.ee](mailto:kai.kisand@ut.ee) või inglise keeles [casanova\\_studies@rockefeller.edu](mailto:casanova_studies@rockefeller.edu). Uuringu on kooskõlastanud Tartu Ülikooli Inimuuringute Eetikakomitee.

Kui Teil on küsimusi seoses enda kui uuritava õigustega, siis saate pöörduda eetikakomitee poole telefonil 7376215.

Kui Teil on andmekaitset puudutavaid küsimusi, siis saate pöörduda Andmekaitse Inspektsiooni poole telefonil 56202341 või e-kirjaga aadressil [info@aki.ee](mailto:info@aki.ee)

Valides allpool vastus "Jah", kinnitate, et olete aru saanud informatsioonist ja nõustute täitma eeluuringu küsimustikku. Kui Te sobite uuringu jaoks, võtame Teiega ühendust, et arutada üksikasjalikult uuringu detaile.

### Kas Te olete nõus osalema selles eeluuringus?

- Jah
- Ei

## TERVISHOIUTÖÖTAJA

**Kas Te olete tervishoiutöötaja?**

- Jah
- Ei

**Milline on Teie amet?**

- Õde
- Arst
- Muu

Palun täpsustage Teie ametit

**Millises tervishoiuasutuses Te töötate?**

- Haiglas, intensiivravi osakonnas
- Haiglas, erakorralise meditsiini osakonnas
- Haiglas, COVID osakonnas
- Pikaajalise hooldusteenuse asutuses
- Teises asutuses

Palun täpsustage, mis tüüpi tervishoiuasutuses Te töötate

**Kas Te olete otseselt töötanud COVID patsientidega?**

- Jah
- Ei

**Kas töötades COVID patsientidega oli Teil juurdepääs isikukaitsevahenditele?**

- Jah
- Ei

**Milliseid meditsiinilisi protseduure olete Te läbi viinud COVID patsientidega?**

- Intubatsioon
- Elustamine
- Muu

**Palun täpsustage milliseid meditsiinilisi protseduure olete Te läbi viinud COVID patsientidega**

**KONTAKT COVID haigega**

Paljud inimesed on kokku puutunud rohkem kui ühe COVID haigega. Küsimuste puhul palun mõelge oma kokkupuutele kõige raskemate COVID haige(te)ga. Palun vastake allpool esitatud küsimustele iga kokkupuute kohta COVID haigestunud inimesega.

**Kas Te olete kokku puutunud COVID haige inimesega (tervishoiutöötajate puhul kehtib see kokkupuute kohta väljaspool ametikohustusi)?**

- Jah
- Ei

**Milline on Teie suhe COVID haige inimesega, kellega puutusite kokku?**

- Elame koos
- Ei ela koos

**Kui COVID nakatunud inimene oli Teie leibkonna liige, palun täpsustage Teie suhet.**

- Abikaasa või partner
- Laps või lapselaps
- Toakaaslane
- Muu

**Milline oli COVID haige inimese vanus, kellega puutusite kokku?**

- 0-10 aastat
- 10-20 aastat
- 20-50 aastat
- 50-70 aastat
- vanem kui 70 aastat

**Kui raskelt põdes COVID haige inimene, kellega puutusite kokku?**

- Viibis intensiivravipalatis
- Oli hospitaliseeritud
- Viibis kodus, kuid vajab abi
- Viibis kodus ja sai iseseisvalt hakkama
- Asümptomaatiline

**Mitme päeva jooksul viibisite koos COVID haige isikuga tema haiguse ajal?**

- 2 päeva või vähem
- 3-4 päeva
- 5 päeva või rohkem

**Mitu tundi päeva jooksul viibisite koos COVID haige isikuga tema haiguse ajal?**

- vähem kui üks tund
- 1-4 tundi
- 5 tundi või rohkem

**Kas Te kasutasite kontakti ajal isikukaitsevahendeid, näiteks näomaski?**

- Jah
- Ei

**Kas Te magasite samas toas COVID haige isikuga?**

- Jah
- Ei

Kui Te puutusite kokku mõne teise COVID haige inimesega, vajutage nuppu „SISESTA TÄIENDAV COVID KONTAKT” allpool. Vastasel juhul vajutage nuppu "Esita".

## **COVID TESTIMINE**

**Kas Te testisite ennast COVIDi suhtes peale kokkupuudet COVID haigega?**

- Jah
- Ei

**Kas Te olete teinud PCR testi?**

- Jah
- Ei

**Milline oli PCR testi tulemus?**

- Positiivne
- Negatiivne

**Kas Te olete teinud antikehade (seroloogilist) testi?**

- Jah
- Ei

**Milline oli ajavahemik Teie kokkupuute ja antikehade (seroloogilise) testi vahel?**

- vähem kui 2 nädalat
- 2-6 nädalat
- rohkem kui 6 nädalat

**Milline oli antikehade (seroloogilise) testi tulemus?**

- Positiivne
- Negatiivne

**VAKTSINEERIMINE**

**Kas Te olete COVIDi vastu vaktsineeritud?**

- Jah
- Ei

**Millise vaktsiini olete saanud?**

- Janssen, ühe doosi
- Astra Zeneca, kaks doosi
- Pfizer, kaks doosi
- Moderna, kaks doosi
- Tõhustusdoosi
- Muu

Palun täpsustage Teie vaktsineerimise detaile

**Kas Te olete vaktsiini saanud enne või pärast kokkupuudet COVID nakatunud isikuga?**

- Enne
- Pärast

**OSALEJA ANDMED**

**Perekonnanimi**

**Eesnimi**

**Vanus**

**Sugu**

- Mees
- Naine

**Riik**

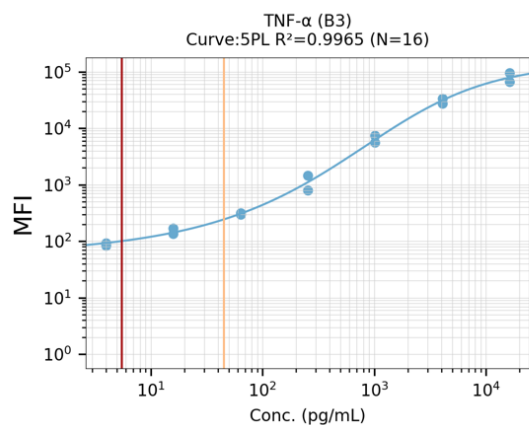
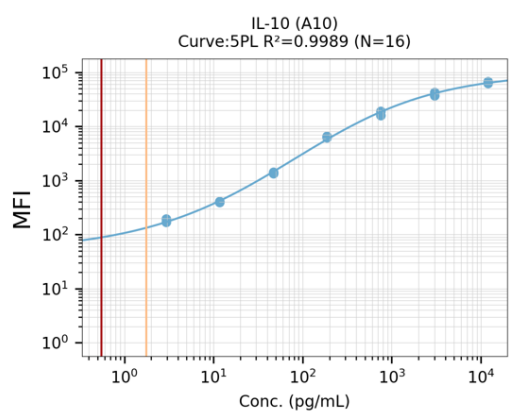
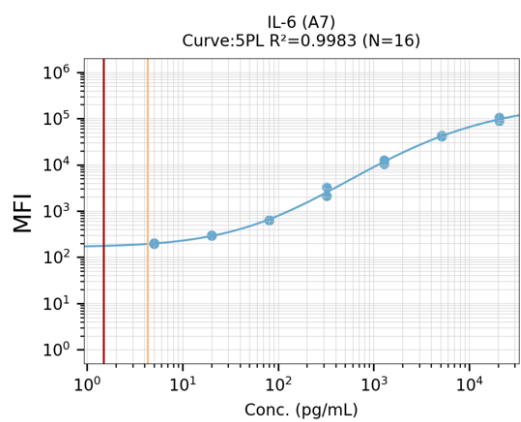
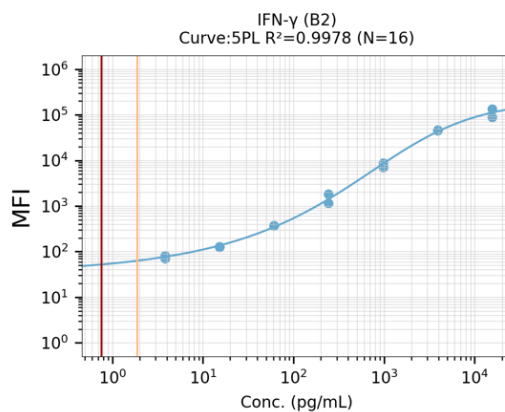
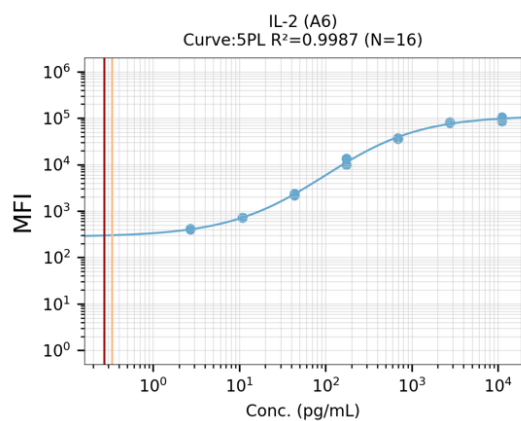
**Maakond/linn**

**Sihtnumber**

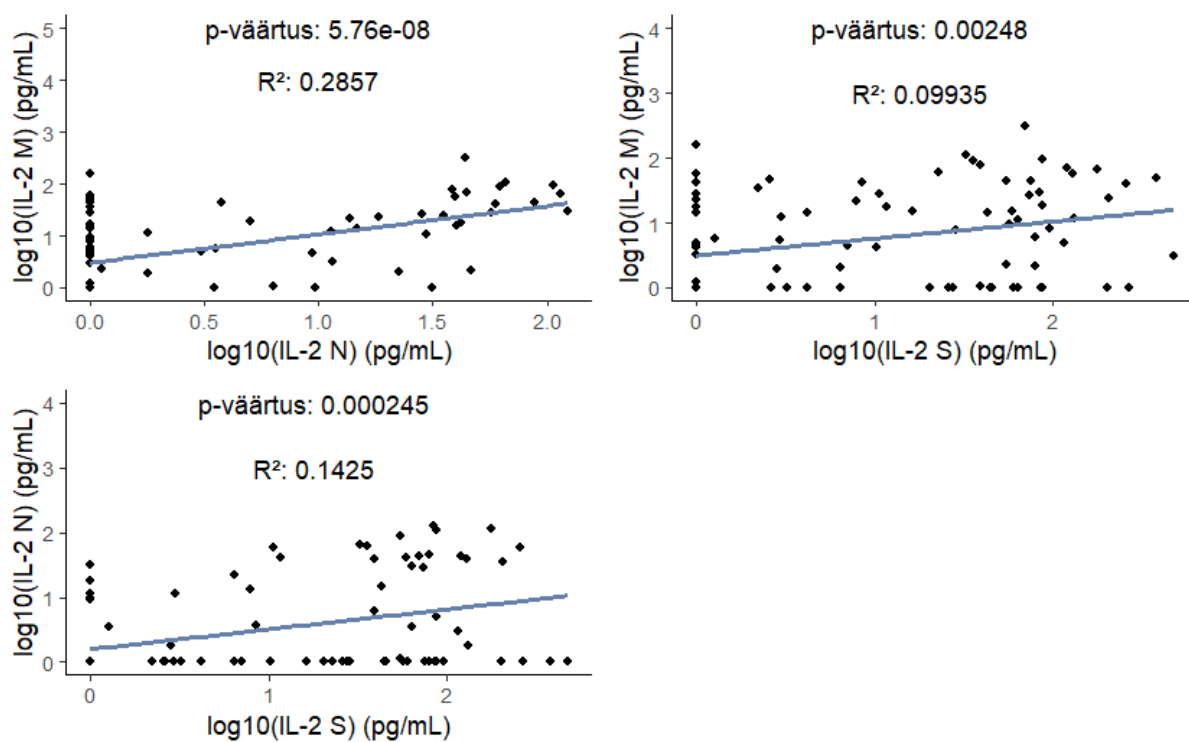
**E-mail**

**Telefoninumber**

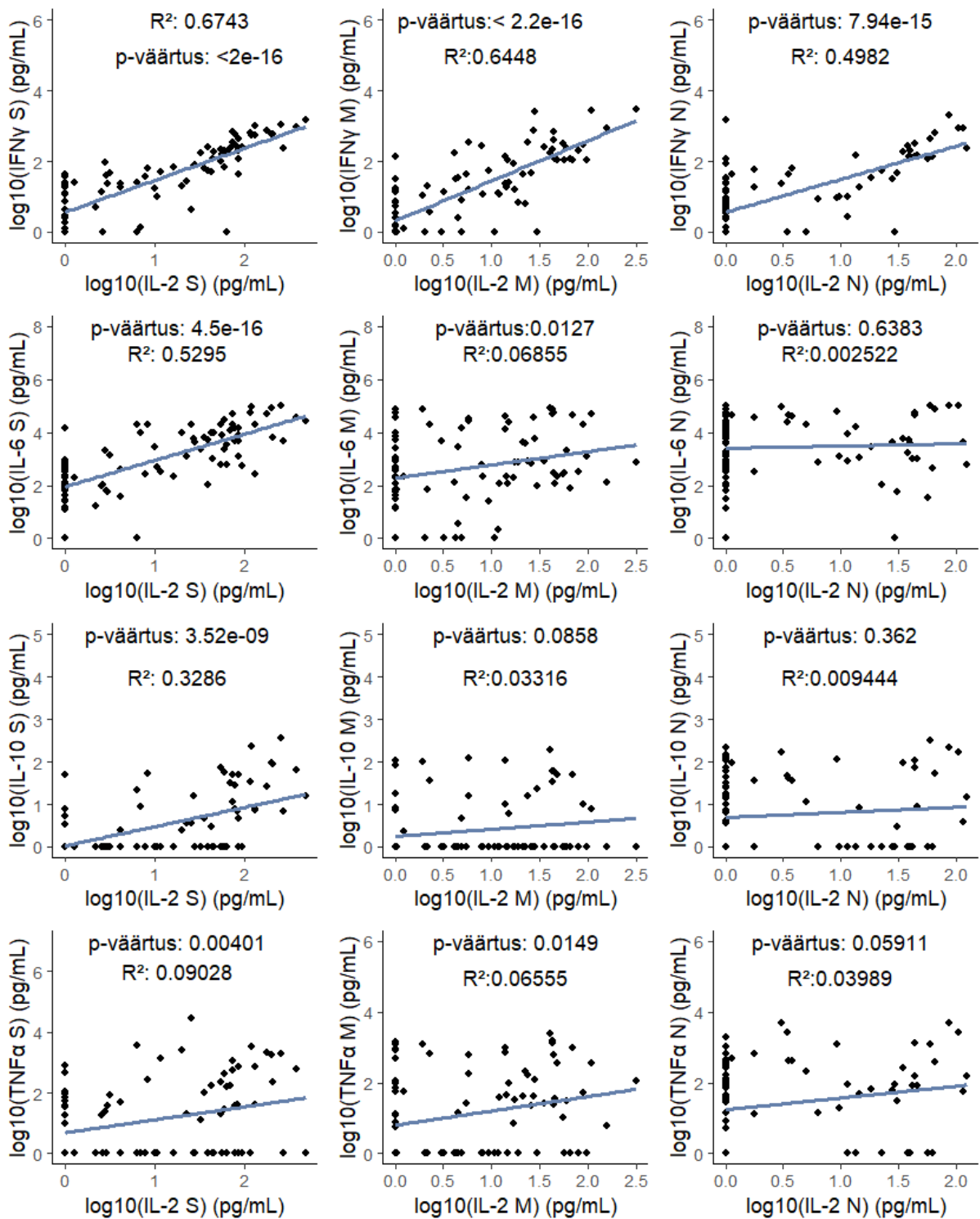
**LISA 2. LEGENDplex komplektiga ja tarkvaraga saadud kalibratsioonikõverad ühe mõõtmise näidisenä. IL-2, IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10 ja TNF $\alpha$  standardkõverad.**



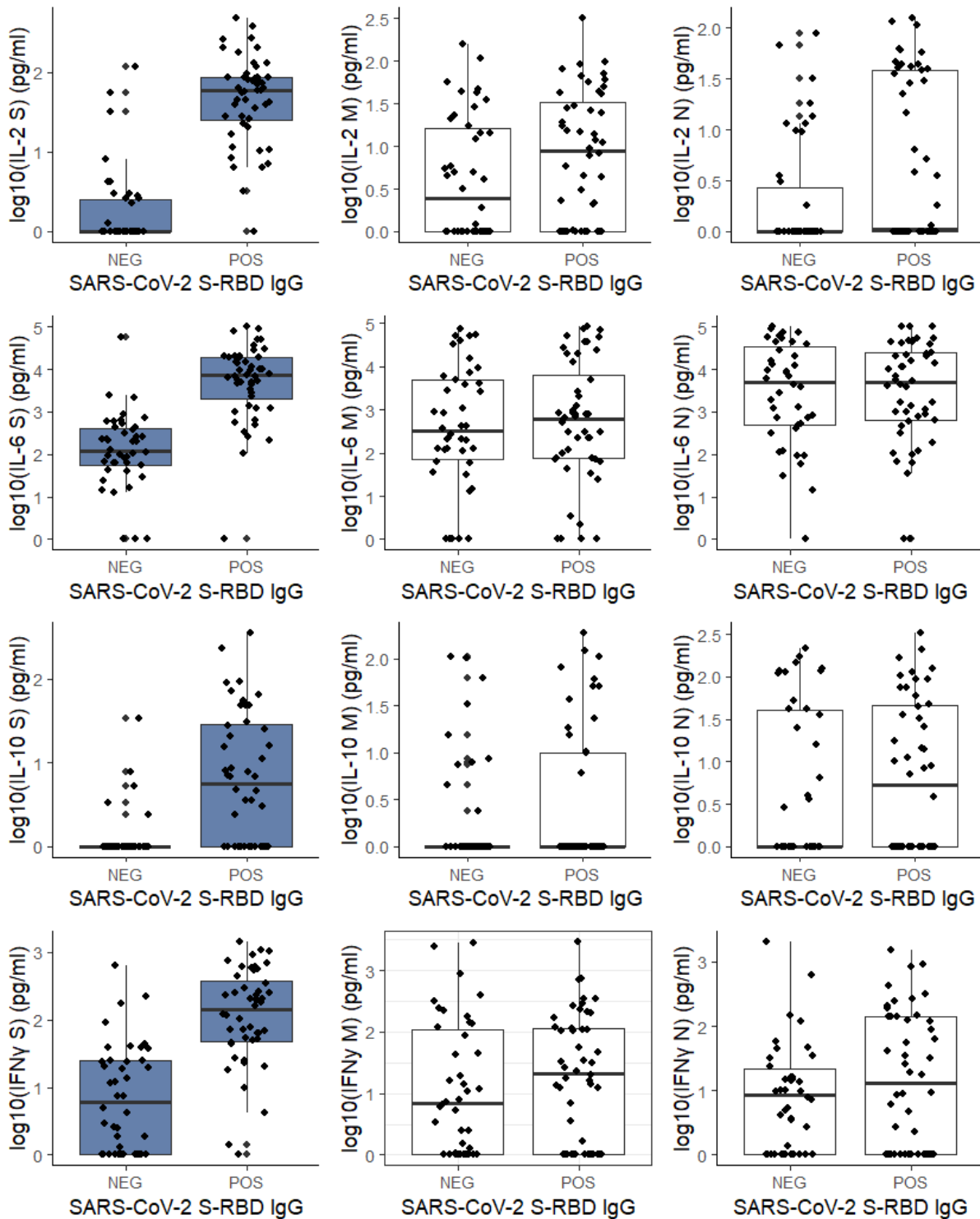
**LISA 3.** IL-2 erinevate stimulatsioonide omavahelised Pearsoni korrelatsioonid. Kõige tugevam seos on „N“ ja „M“ stimulatsioonide järel tekkinud tsütokiinivastuste vahel.

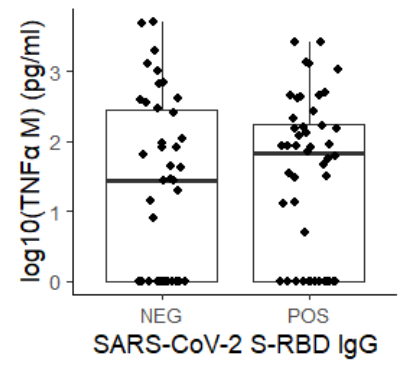
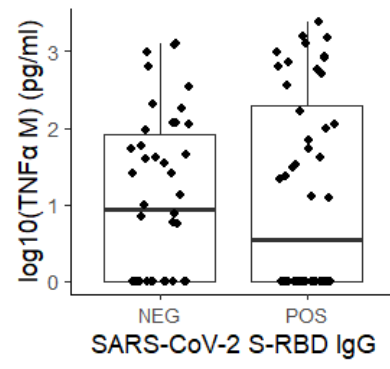
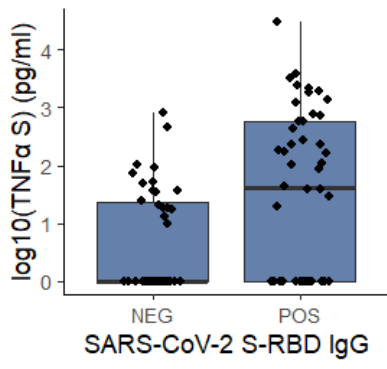


LISA 4. IL-2 väärtuste Pearsoni korrelatsioonid teiste tsütokiinide väärtustega. IL-2 tasemetega korreleerub kõige paremini IFN $\gamma$ .



**LISA 5.** Tsütokiinide väärtuste võrdlus SARS-CoV-2 S-RBD IgG positiivsete ja negatiivsete inimeste seas. Statistiliselt erinevad „S” stimulatsiooni järel tekkinud tsütokiinivastused, kujutatud siniselt. Karpdiagrammide ülemised ja alumised servad tähistavad IQR vahemikku ja „vurrud” tähistavad 95% usaldusintervalli. Statistikud on kirjas põhiteksti tabelis 4.





# LIHTLITSENTS

## Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Gerli Rukis,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) minu loodud teose „SARS-CoV-2 suhtes resistentsete isikute immuunparameetrite uuring“, mille juhendajateks on PhD Kai Kisand ja PhD Arnold Kristjuhan, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Gerli Rukis

25.05.2024