# **Elsevier Public Health Emergency Collection**

Public Health Emergency COVID-19 Initiative

<u>Célula.</u> 2020 25 de noviembre; 183 (5): 1340-1353.e16.

Publicado en línea el 5 de octubre de 2020 doi: <u>10.1016 / j.cell.2020.10.001</u>

PMCID: PMC7534589

PMID: <u>33096020</u>

# Desequilibrio de células T CD4 + reguladoras y citotóxicas SARS-CoV-2- T reactivas en COVID-19

Benjamín J. Meckiff, <sup>1,6</sup> <u>Ciro Ramírez-Suástegui</u>, <sup>1,6</sup>Vicente <u>Fajardo</u>, <sup>1,6</sup>Serena <u>J. Chee</u>, <sup>2,6</sup> Anthony <u>Kusnadi</u>, <sup>1</sup> <u>Hayley Simon</u>, <sup>1</sup> <u>Simon Eschweiler</u>, <sup>1</sup> <u>Alba Grifoni</u>, <sup>1</sup> <u>Emanuela Pelosi</u>, <sup>3</sup> Daniela Weiskopf, <sup>1</sup> <u>Alessandro Sette</u>, <sup>1,5</sup> <u>Ferhat Ay</u>, <sup>1</sup> <u>Grégory Seumois</u>, <sup>1</sup>Christian <u>H.</u> <u>Ottensmeier</u>, <sup>1,2,4,7,\*</sup> y <u>Pandurangan Vijayanand</u> <sup>1,2,5,7,8,\*\*</sup>

Información del autor Notas del artículo Información sobre derechos de autor y licencia Renuncia de responsabilidad

Este artículo se basa en una versión preliminar disponible anteriormente: "<u>Análisis transcriptómico</u> <u>de células individuales de células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2</u>".

Este artículo se basa en una versión preliminar disponible anteriormente: "<u>Análisis transcriptómico</u> <u>de células individuales de células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2</u>".

Este artículo ha sido citado por otros artículos en PMC.

### Datos asociados

<u>Materiales complementarios</u> Declaración de disponibilidad de datos

Resumen

#### **Gráficamente abstracto**

<u>y:</u>

#### Introducción

La enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) está causando una mortalidad, morbilidad y trastornos sociales sustanciales ( Tay et al., 2020; Vabret et al., 2020 ), y las vacunas y terapias eficaces pueden tardar varios meses o años en estar disponibles. Un número sustancial de pacientes se enferma potencialmente mortal y los

mecanismos responsables de causar el síndrome de dificultad respiratoria aguda grave (SARS) en COVID-19 no se comprenden bien. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de comprender los actores clave que impulsan las respuestas inmunitarias protectoras y patógenas en COVID-19 (Vabret et al., 2020). Este conocimiento puede ayudar a diseñar mejores terapias y vacunas para hacer frente a la pandemia actual. CD4 +Las células T son orquestadores clave de las respuestas inmunitarias antivirales, ya sea mejorando las funciones efectoras de otros tipos de células inmunitarias como las células T citotóxicas CD8 + , las células NK y las células B o mediante la destrucción directa de las células infectadas (<u>Sallusto, 2016</u>). Estudios recientes en pacientes con COVID-19 han verificado la presencia de células T CD4 + que son reactivas al SARS-CoV-2 ( Braun et al., 2020; Thieme et al., 2020; Grifoni et al., 202 2020). Sin embargo, la naturaleza y los tipos de CD4 +Los subconjuntos de células T que responden al SARS-CoV-2 y los roles que estos subconjuntos juegan en la conducción de respuestas inmunes protectoras o patógenas siguen siendo difíciles de alcanzar. Aquí, hemos analizado transcriptomas unicelulares de células T CD4 + reactivas al virus para determinar asociaciones con la gravedad de la enfermedad COVID-19 y comparar las propiedades moleculares de las células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 con otros virus respiratorios comunes. -Células T CD4 + reactivas de sujetos de control sanos.

**y**:

#### Resultados

#### Respuestas de las células T CD4 + en la enfermedad COVID-19

Para capturar las células T CD4 <sup>+</sup> que responden al SARS-CoV-2 en pacientes con enfermedad COVID-19, empleamos el ensayo de enriquecimiento de células T reactivas al antígeno (ARTE) ( Bacher et al., 2013, 2016, 2019; Schmiedel et al., 2018) que se basa en la estimulación in vitro de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) durante 6 h con grupos de péptidos superpuestos que se dirigen a los dominios inmunogénicos de las proteínas de la espiga y la membrana del SARS-CoV-2 (ver Métodos STAR; Thieme et al., 2020). Después de la estimulación in vitro, CD4 + reactivo al SARS-CoV-2 Los linfocitos T de memoria se aislaron basándose en la expresión de marcadores de superficie celular (CD154 y CD69) que reflejan el compromiso reciente del receptor de linfocitos T (TCR) por complejos relacionados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) -péptido (Figura S1 A). En el contexto de la enfermedad aguda por COVID-19, se han informado células T CD4 + que expresan marcadores de activación en la sangre (Braun et al., 2020; Thevarajan et al., <sup>2020</sup>); Tales células T CD4 + , presumiblemente activadas *in vivo* por antígenos virales del SARS-CoV-2 endógenos, también se capturaron durante el ensayo ARTE, lo que nos permitió estudiar una gama completa de subconjuntos de células T CD4 + <sup>que</sup> responden al SARS-CoV-2. Clasificamos> 300.000 CD4 <sup>+</sup> reactivos al SARS-CoV-2 Células T de> 1.300 millones de PBMC aisladas de un total de 40 pacientes con enfermedad COVID-19 (22 pacientes hospitalizados con enfermedad grave, 9 de los cuales requirieron tratamiento en la unidad de cuidados intensivos [UCI] y 18

sujetos no hospitalizados con enfermedad relativamente más leve; <u>Figuras 1</u>A y 1B y <u>Tablas S1</u> A y <u>S1</u> B). Además de expresar CD154 y CD69, CD4 <sup>+</sup> reactivo al SARS-CoV-2 clasificado las células T coexpresaron otros marcadores de superficie celular relacionados con la activación como CD38, CD137 (4-1BB), CD279 (PD-1) y HLA- DR (<u>Figuras 1</u>C y <u>yS1BS1</u>B y <u>Tabla S1</u> C).



#### Abrir en una ventana separada

#### Figura S1

CD4 <sup>+</sup>Respuestas de las células T en la enfermedad COVID-19, relacionadas con Figura 1

(A) Estrategia de compuerta para clasificar: puerta de dispersión por tamaño de linfocitos, células individuales (dispersión directa de altura versus área (FSC)), en vivo, memoria CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> (CD45RA <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> células naive excluidas) células CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> activadas . La expresión superficial de los marcadores de activación se analizó en la memoria CD4 <sup>+</sup> T.

(B) Gráficos representativos de FACS (izquierda) que muestran la expresión de superficie de PD-1 y CD38 en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria *ex vivo* y en células T CD4 <sup>+</sup> <sup>de</sup> memoria CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> después de 6 h de estimulación, post-enriquecimiento (basado en CD154 ). Parcelas (medio) que representan porcentaje de CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> de memoria CD4 <sup>+</sup> células T que expresan PD-1 o CD38 tras la estimulación y post-enriquecimiento (CD154-based) en 17 hospitalizados y 18 COVID-19 pacientes no hospitalizados. (Derecha) Gráfico que muestra el número total de células T CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+ de</sup> memoria CD4 <sup>+</sup> clasificadas por millón de PBMC; los datos son la media ± SEM.

(C) Gráficos representativos de FACS que muestran la tinción de la superficie de CD154 y CD69 en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria estimuladas durante 6 h con megapools de virus individuales, pre-enriquecimiento (arriba) y post-enriquecimiento (basado en CD154) (abajo) en sanos no- sujetos expuestos. (Derecha) Porcentaje de células T CD4 <sup>+</sup> de memoria que coexpresan CD154 y CD69 después de la estimulación con megapools de virus individuales (preenriquecimiento); los datos son la media ± SEM.

(D) Gráficos representativos de FACS (izquierda) que muestran la tinción de la superficie de CD154 en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria estimuladas con el megapool de Influenza, preenriquecimiento en sujetos sanos antes y / o después de la vacunación. (Derecha) Porcentaje de células T CD4 <sup>+</sup> de memoria que expresan CD154 después de la estimulación con el megapool Influenza (preenriquecimiento); los datos son la media ± SEM.

(E) Gráficos representativos de FACS que muestran la tinción de la superficie de CD154 en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria estimuladas con el megapool de influenza, después del enriquecimiento (basado en CD154), en sujetos sanos antes y / o después de la vacunación



### Figura 1

Abrir en una ventana separada

Respuestas de las células T CD4 <sup>+</sup> en la enfermedad COVID-19

(A) Resumen del estudio.

(B) Gráficos representativos de FACS que muestran la tinción de la superficie de CD154 (CD40L) y CD69 en la memoria CD4 <sup>+</sup> T estimuladas durante 6 h con grupos de péptidos de SARS-CoV-2, después del enriquecimiento (basado en CD154), en 22 hospitalizados y 18 no -pacientes con COVID-19 hospitalizados (izquierda) y resumen del número de celdas ordenadas (derecha); los datos son la media ± SEM.

(C) Gráficos de FACS representativos (izquierda) que muestran la expresión de superficie de CD137 (4-1BB) y HLA-DR en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria *ex vivo* (sin estimulación *in vitro*) y en células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> después de la estimulación , posenriquecimiento (basado en CD154). (Derecha) Porcentaje de CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> memoria CD4 <sup>+</sup> T que expresan CD137 (4-1BB) o HLA-DR en 17 pacientes con COVID-19 hospitalizados y 18 no hospitalizados; los datos son la media ± SEM.

Ver también Figura S1y Tabla S1 .

La evidencia reciente de estudios en individuos no expuestos (muestra de sangre obtenida antes de la pandemia COVID-19) indica la reactividad cruzada preexistente del SARS-CoV-2-reactivo CD4<sup>+</sup> T, posiblemente indicativo de la reactividad cruzada del coronavirus humano (HCoV). Estas células se observan en hasta el 50% de los sujetos estudiados (Braunet al., 2020; Grifoni et al., 2020; Le Bert et al., 2020). Para capturar estas células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T, susceptibles de ser reactivas para coronavirus (CoV), examinamos sujetos sanos no expuestos ycélulas CD4<sup>+</sup> T aisladas que respondían a grupos de péptidos SARS-CoV-2 de 4 sujetos con mayor frecuencia de respuesta (Figuras<u>1Ay S1CY S1</u>D). A continuación, para definir lossubconjuntos de células CD4<sup>+</sup> T y sus propiedades que distinguen las células reactivas SARS-CoV-2 de otrascélulas CD4<sup>+</sup> T reactivas por virus respiratorios comunes, aislamoscélulas CD4<sup>+</sup> T que responden a grupos de péptidos específicos de la proteína hemagglutinina de la gripe (células reactivas de la GRIPE, ver métodos STAR)de 8 sujetos sanos adicionales que proporcionaron muestras de sangre antes y/o después de la vacunación contra la gripe (Figuras<u>1</u>A, <u>A,S1D,S1</u>D yS1E y Tablas <u>S1</u>D yS1E). Lascélulas CD4<sup>+</sup> T que responden a grupos de péptidos específicos de otros virus respiratorios comunes como la parainfluenza humana (HPIV) y el metapneumovirus humano (HMPV) también fueron aisladas de sujetos sanos (FiguraS1C y Tablas S1 D y S1F). En total, interrogamos el transcriptoma y la secuencia de TCR de> 100.000 células T CD4 + reactiva un virus de 53 sujetos (Figuras<u>1</u>A, <u>A, S2 A,S2</u> A, y S2B y Tablas <u>S2</u> A – S2E).



#### Figura S2

Abrir en una ventana separada

Las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 están enriquecidas para células T FH y CD4-CTL, relacionadas con<u>Figura 2</u>

- (A) Número de genes recuperados para cada biblioteca 10x secuenciada.
- (B) Proporción de células en cada grupo para los 6 lotes de donantes.

(C) Los gráficos de anillos muestran la proporción de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas a virus individuales por grupo para diferentes virus. Se resaltan los grupos notables.

(D) Gráficos de violín que muestran patrones de enriquecimiento de T H 17, respuesta de IFN, T FH y firmas de genes CD4-CTL para cada grupo. El color indica la puntuación media de la firma de las células dentro de un grupo.

(E) Gráficos de violín que muestran el nivel de expresión normalizado (log <sup>2</sup> (CPM + 1)) de las transcripciones de marcadores T + 1, T + 17, respuesta IFN, T FH y CD4-CTL seleccionados en grupos designados en comparación con una agregación de células restantes ( Descansar). El color indica el porcentaje de células que expresan la transcripción indicada.

(F) Diagrama de dispersión que muestra el nivel de co-expresión (log <sup>2</sup> (CPM + 1)) de *IL2* y *TNF* transcripciones en *IFNG* expresando, memoria virus reactiva CD4 <sup>+</sup> células T en el grupo 1. Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

(G) Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) para T + 17, respuesta de IFN, ciclo celular, genes de firma de T + y CD4-CTL en un grupo dado en comparación con el resto de las células; \* p <0,05; \*\*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.

# Las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 están enriquecidas para células T <sub>FH</sub> y CD4-CTL

El análisis de los transcriptomas unicelulares de todos los

linfocitos T CD4 <sup>+</sup> reactivos a virus de todos los sujetos reveló 13 subconjuntos de linfocitos T CD4 + que se agrupaban de forma distinta, lo que reflejaba sus perfiles transcripcionales únicos (Figuras 2 A – 2D y Tabla S2 F). Sorprendentemente, varios grupos estaban dominados por células reactivas a virus particulares (Figuras 2B y y S2C). S2C). Por ejemplo, la gran mayoría de las células de los grupos 1 y 10 eran reactivas a la gripe (> 65%), mientras que las células de los grupos 0, 5, 6, 7 y 12 estaban formadas principalmente por células CD4 + T reactivas al SARS-CoV-2. células (> 70%) de pacientes con COVID-19 (Figuras 2B y y S2C). S2C). Por el contrario, las células de los grupos 2, 3, 4, 8 y 9 no se enriquecieron preferentemente para la reactividad a ningún virus dado (<u>Figuras 2</u>B y <u>y S2C).</u> S2C). Estos hallazgos sugieren que distintas infecciones virales generan subconjuntos de células T CD4 + con distintos programas de transcripción, aunque el momento de la encuesta (enfermedad aguda versus infección pasada) también contribuirá a sus estados celulares. Nuestros datos destacan una heterogeneidad sustancial en la naturaleza de las células T CD4 + generadas en respuesta a diferentes infecciones virales por un lado y características compartidas por el otro.



#### Abrir en una ventana separada

### Figura 2

Las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 están enriquecidas para células T FH y CD4-CTL

(A) Los transcriptomas de células individuales de células T CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+ de</sup> memoria
CD4 <sup>+</sup> clasificadas después de 6 h de estimulación con megapools de péptidos específicos de virus se muestran mediante aproximación y proyección múltiple uniforme
(UMAP). Agrupación basada en Seurat de 102.230 células coloreadas según el tipo de agrupación.

(B) UMAP que muestran células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria para condiciones de estimulación de megapool específicas de virus individuales (izquierda), y se muestran proporciones normalizadas de cada célula reactiva de virus por grupo (derecha).

(C) Mapa de calor que muestra la expresión de las transcripciones enriquecidas más significativamente en cada grupo (consulte la <u>Tabla S2</u> F). Análisis del gen marcador de Seurat (comparación del grupo de interés con todas las demás células). Las 200 transcripciones superiores se muestran basándose en el valor de *P* ajustado <0,05, cambio de log  $_2$  veces> 0,25 y> 10% de diferencia en el porcentaje de células que expresan la transcripción seleccionada entre dos grupos de células comparados.

(D) El gráfico muestra la expresión promedio (escala de colores) y el porcentaje de células que expresan (escala de tamaño) para las transcripciones de genes marcadores seleccionados en cada grupo.

(E) Gráficos de violín que muestran el nivel de expresión normalizado (log 2 (CPM + 1)) de las transcripciones de los marcadores T FH (arriba), T H 1 (medio) y T H 17 (abajo) en grupos designados en comparación con una agregación de los restantes células (descanso). El color indica el porcentaje de células que expresan la transcripción indicada.

(F) UMAP que muestra las puntuaciones de firma de respuesta de T  $_{\rm FH}$ , CD4-CTL, T  $_{\rm H}$  17 e interferón (IFN) para cada célula.

Ver también Figura S2y Tabla S2 .

Los grupos enriquecidos con linfocitos T CD4 + reactivos a la gripe (grupos 1 y 10) mostraron características sugestivas de linfocitos T auxiliares (T H) 1 polifuncionales que se han asociado con respuestas inmunitarias antivirales protectoras (Seder et al., 2008). Tales características incluyen la expresión de transcripciones que codifican las citocinas vinculadas a la polifuncionalidad como IFN-y, IL-2 y TNF $\alpha$ , y varias otras citocinas y quimiocinas como IL-3, CSF2, IL-23A y CCL20 (Figuras 2D, 2E, 2E, S2E, S2E y S2F). Las células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 estaban subrepresentadas en estos grupos (grupo 1 y 10, <2%) en comparación con las células reactivas con FLU (> 70%) o las células reactivas con HMPV y HPIV (~ 5% –20%) (Figura S2C). Además, SARS-CoV-2-reactivos CD4 + células T en el grupo 1 expresaron niveles significativamente más bajos de IFNG y IL2 transcripciones cuando se compara con células FLU-reactiva (Tabla S2 G). Juntos, estos datos sugirieron una falla en la generación de células T<sub>H</sub> 1 polifuncionales robustas en la infección por SARS-CoV-2. También se observó un patrón similar en las células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 de sujetos sanos no expuestos (Figuras 2B y y S2C)S2C) pero no para los linfocitos T CD4 + reactivos al VPH o al HMPV, lo que sugiere que el defecto en la generación de linfocitos T<sub>H</sub> 1 polifuncionales puede ser una característica común de los coronavirus, aunque se realizarán estudios adicionales que analicen específicamente los linfocitos T CD4 + reactivos al VHC en individuos sanos. se le pedirá que verifique esto.

Otros grupos que estaban relativamente subrepresentados para las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 incluían los grupos 2 y 8, que estaban enriquecidos en genes de firma T <sub>H</sub> 17, con el grupo 2 altamente enriquecido para células que expresan transcripciones de *IL17A* e *IL17F*, lo que

representa células T<sub>H</sub> 17 auténticas (<u>Figuras 2</u>B – 2F y <u>y S2C – S2ES2</u>C – S2E y <u>Tabla</u> <u>S2</u> F). Las células T<sub>H</sub> 17 se han asociado con respuestas inmunitarias protectoras en ciertos modelos de infecciones virales (<u>Acharya et al., 2016</u>; <u>Wang et al., 2011</u>); sin embargo, en otros contextos se ha demostrado que promueven la patogénesis de enfermedades virales ( Acharya et al., 2016; Ma et al., 2019). Por lo tanto, la relevancia funcional de una respuesta T<sub>H</sub> 17 deteriorada en COVID-19 no está clara y requiere más investigación.

Los grupos que se distribuyeron uniformemente en todas las células T CD4 <sup>+</sup> específicas del virus incluyen los grupos 3 y 4. El grupo 3 mostró un perfil transcripcional consistente con el enriquecimiento de genes de *respuesta al* interferón (IFN) (*IFIT3*, *IFI44L*, *ISG15*, *MX2*, *OAS1*) y el grupo 4 se enriqueció para las transcripciones CCR7, *IL7R* y *TCF7*, que probablemente representan el subconjunto de células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria central (Figuras 2B – 2F y <u>y S2C – S2ES2</u>C – S2E y <u>Tabla S2</u> F). El grupo 12, que expresó altos niveles de transcripciones vinculadas a los genes del ciclo celular *MKI67* y *CDK1*, también contenía una gran proporción de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 (<u>Figuras 2</u>B – 2D), indicativo de células en proliferación activa que responden a los antígenos del SARS-CoV-2. El grupo 6, también dominado por células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2, se caracterizó por altos niveles

de *transcripciones* de *PRF1*, *GZMB*, *GZMH*, *GNLY* y *NKG7*, que codifican moléculas vinculadas a la citotoxicidad ( <sup>Patil et al., 2018).</sup> ) (Figuras 2B – 2F y y S2C – S2ES2C – S2E y <u>Tabla S2</u> F). El análisis de enriquecimiento del conjunto de genes (GSEA) mostró un enriquecimiento positivo significativo de los genes característicos de la citotoxicidad en los grupos 6 y 9 (Figura S2G y Tabla S2 H), lo que confirma que estos grupos representan células T CD4 <sup>+</sup> citotóxicas (CD4-CTL).

Los conglomerados 0, 5 y 7, que estaban colocalizados en la gráfica de aproximación y proyección de variedad uniforme (UMAP), estaban dominados por células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 (<u>Figuras 2</u>A y 2B). Las células de estos grupos se enriquecieron de manera uniforme para las transcripciones que codifican citocinas, marcadores de superficie y coactivadores transcripcionales asociados con la función de las células auxiliares foliculares T (T <sub>FH</sub>)

(*CXCL13*, *IL21*, *CD200*, *BTLA* y *POU2AF1*) ( Locci et al., 2013) (Figuras 2B – 2F y y S2C – S2ES2C – S2E y Tabla S2 F). GSEA independiente mostró un enriquecimiento positivo significativo de genes de firma T <sub>FH</sub> en estos grupos, lo que confirma que las células en estos grupos representan células T <sub>FH</sub> circulantes (Figura S2G y Tabla S2 H). Las células T <sub>FH</sub> auténticas residen en el centro germinal; sin embargo, se han descrito células T <sub>FH</sub> en la sangre donde se ha informado un mayor número durante infecciones virales y después de vacunaciones ( Bentebibel et al., 2013; Koutsakos et al., 2018; Smits et al., <sup>2020</sup>). Por lo tanto, el aumento en los subconjuntos circulantes de T <sub>FH</sub> reactiva al SARS-CoV-2 observado en pacientes con COVID-19 es consistente con los informes publicados sobre infecciones agudas. En general, nuestro análisis transcriptómico unicelular reveló diferencias sustanciales en la naturaleza de CD4 + Las respuestas de las células T a las infecciones virales y resaltan los subconjuntos que están específicamente enriquecidos o agotados en la enfermedad COVID-19.

Subconjuntos de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 asociados con la gravedad de la enfermedad

A continuación, evaluamos si las proporciones de células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 en cualquier grupo eran mayores o menores en los pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con los pacientes no hospitalizados. El agrupamiento no supervisado de pacientes, basado en las proporciones de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 en diferentes grupos, mostró que los pacientes con una mayor proporción de células T FH en el grupo O se agruparon de forma distinta de aquellos con mayores proporciones de células T FH en el grupo 5 o células CD4-CTL (grupo 6) (figura 3 A). La frecuencia total de linfocitos T CD4 + reactivos al SARS-CoV-2 con un perfil T FH (grupo 0, 5 y 7) no fue significativamente diferente entre los pacientes con COVID-19 hospitalizados y no hospitalizados (figura 3B). Sin embargo, la proporción relativa de células T FH en el grupo 5 fue significativamente mayor en los pacientes hospitalizados (enfermedad grave) en comparación con los pacientes no hospitalizados (enfermedad leve), y se observó lo contrario para la proporción de células T FH en el grupo 0 (<u>Figuras 3</u>C y <u>y S3 AS3</u> A y <u>Tabla S2</u> B). Este patrón se mantuvo independientemente de si las muestras de los pacientes se analizaron temprano (<3 semanas desde el inicio de los síntomas) o más tarde (>3 semanas) en el curso de la enfermedad (Figura S3B). En particular, la proporción de células T FH en el grupo 7 no fue significativamente diferente entre pacientes con COVID-19 hospitalizados y no hospitalizados (Figura S3C).



#### figura 3

Abrir en una ventana separada

Subconjuntos de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 asociados con la gravedad de la enfermedad

(A) Agrupación no supervisada de pacientes con COVID-19 basada en las proporciones de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 en diferentes agrupaciones después de la estimulación con péptidos de 6 h. No se representan los clústeres con menos del 5% del conjunto de datos total. El sexo y el estado de hospitalización por paciente se indican mediante diferentes esquemas de color sobre el mapa de calor.

(B) Porcentaje de células T ℍ (grupos 0, 5 y 7) en el conjunto total de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 para pacientes con COVID-19 no hospitalizados y

hospitalizados; los puntos indican datos de un solo sujeto. Los datos son la media  $\pm$  SEM; la significación de las comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; ns, valor de p no significativo.

(C) Proporción de células de los grupos 5 y 0 en células T FH reactivas al SARS-CoV-2 (grupos 0, 5 y 7) en pacientes con COVID-19 no hospitalizados y hospitalizados. Los datos son la media ± SEM; la significación de las comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; \*\*\*\* p <0,0001.

(D) Gráficos de violín que muestran el nivel de expresión normalizado (log 2 (CPM + 1)) de las *transcripciones* de *ZBTB32* y *ZBED2* en células reactivas con SARS-CoV-2 de los grupos 0, 5 y 7 (parte superior); el color indica el porcentaje de células que expresan la transcripción indicada. Los siguientes gráficos muestran la expresión promedio y el porcentaje de células que expresan transcripciones seleccionadas en los grupos indicados.

(E) Diagrama de dispersión que muestra el nivel de coexpresión normalizado (log 2 (CPM + 1)) entre las transcripciones de *PRF1* y *GZMB* en células reactivas con SARS-CoV-2 presentes en los grupos 5 (izquierda) y 0 (derecha). Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

(F) Correlación entre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> T  $\bowtie$  reactivas al SARS-CoV-2 y los títulos de anticuerpos S1 / S2 en 15 pacientes con COVID-19 no hospitalizados (izquierda) y 20 hospitalizados (derecha). El coeficiente de correlación *ry* el valor *P* relacionado se calcularon utilizando la correlación de Spearman; <sup>\*</sup> p <0,05.

(G) Correlación entre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> T FH reactivas al SARS-CoV-2 que forman el grupo 5 como una frecuencia de títulos de anticuerpos CD4 <sup>+</sup> T FH y S1 / S2 totales (dos gráficos de la izquierda) y el intervalo entre el inicio de los síntomas y la extracción de sangre (dos parcelas a la derecha) en 15 pacientes con COVID-19 no hospitalizados y 20 hospitalizados (izquierda). El coeficiente de correlación *ry* el valor *P* relacionado se calcularon utilizando la correlación de Spearman; <sup>\*\*</sup> p <0,01; <sup>\*\*\*</sup> p <0,001; ns, valor de *p* no significativo .

(H) Análisis de la trayectoria de una sola célula de las células en el grupo 5 y 0 que muestra el pseudotiempo, la expresión de los genes indicados y la puntuación de la firma de respuesta de IFN.

Ver también Figura S3y Tabla S3 .



#### Figura S3

# Abrir en una ventana separada

Subconjuntos de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 asociados con la gravedad de la enfermedad, relacionada con<u>figura 3</u>

(A) Frecuencia promedio de células por grupo de pacientes COVID-19 hospitalizados y no hospitalizados.

(B) Proporción de células del grupo 5 en células T FH citotóxicas reactivas al SARS-CoV-2 (grupo 0, 5 y 7) en pacientes con COVID-19 no hospitalizados y hospitalizados que proporcionaron muestras de sangre en menos de 21 días (izquierda) y más de 21 días (derecha) después de la aparición de los síntomas. Los datos son la media ± SEM; la significación de las comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.

(C) Proporción de células del grupo 7 en células T FH reactivas con SARS-CoV-2 en pacientes con COVID-19 no hospitalizados y hospitalizados. Los datos son la media ± SEM. La significancia para las comparaciones se calculó usando la prueba U de Mann-Whitney; ns identifica el valor de *P* no significativo.

(D) Gráfico de volcán que muestra genes expresados diferencialmente entre células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 en el grupo 5 frente al grupo 0.

(E) Gráficos de violín que muestran el nivel de expresión (log 2 (CPM + 1)) de las *transcripciones* de *PRF1* y *GZMB* en células de los grupos 0, 5 y 7.

(F) Diagrama de dispersión que muestra el nivel de coexpresión (log <sup>2</sup> (CPM + 1)) de las *transcripciones* de *PRF1* y *GZMB* en células reactivas con SARS-CoV-2 presentes en el grupo 7. Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

(G) Concentración de anticuerpos S1 / S2 en la circulación de 22 pacientes COVID-19 hospitalizados y 16 hospitalizados no hospitalizados. Los datos son la media ± SEM; la significación de las comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; \* p <0,05.

(H) Correlación entre el porcentaje de células CD4 <sup>+</sup> T FH reactivas al SARS-CoV-2 que forman el grupo 0 como una frecuencia del total de células CD4 <sup>+</sup> T FH y títulos de anticuerpos S1 / S2 (dos gráficos de la izquierda) y el intervalo entre el inicio de los síntomas y la sangre Dibuje (dos parcelas a la derecha) en 15 pacientes con COVID-19 no hospitalizados y 20 hospitalizados (izquierda). El coeficiente de correlación *ry* el valor *P* relacionado se calcularon utilizando la correlación de Spearman; \*\*\* p <0,001.

(I) Gráficos de FACS que muestran células B específicas de S1 / S2 en 9 pacientes con COVID-19. Se especifica la identificación del paciente y la proporción de células T FH reactivas al SARS-CoV-2 en el grupo 5.

(J) Análisis de la vía del ingenio (IPA) de genes con expresión aumentada (p ajustado <0,05 y cambio de log <sup>2</sup> veces> 1) entre células del grupo 5 frente al grupo 0. Análisis de la red reguladora aguas arriba de los genes en la vía del IFN alfa.

(K) GSEA para genes de firma de respuesta a IFN en el grupo 5 frente al grupo 0; \*\*\* p <0,001.

Para determinar las características transcripcionales que diferenciaron las células T<sub>FH</sub> reactivas al SARS-CoV-2 presentes en el grupo 5 de las del grupo 0, realizamos un análisis de expresión génica diferencial de una sola célula (<u>Figura S3</u>D y <u>Tabla S3</u> A). Las transcripciones que codifican para factores de transcripción dedo de zinc que contiene el tipo BED 2 (ZBED2) y dedo de zinc y la proteína 32 que contiene el dominio BTB (ZBTB32) se enriquecieron en células T<sub>FH</sub> en el grupo 5 y también se expresaron a niveles significativamente más altos en COVID-

hospitalizados. 19 pacientes (Figuras <u>3</u>D y <u>y S3DS3</u>D y <u>Tablas S3</u> A y S3B). ZBTB32, también conocido como PLZP, pertenece a una familia de represores transcripcionales de complejo ancho, tramtrack y bric-à-brac zinc finger (BTB-ZF) como PLZF, linfoma de células B 6 (BCL6) y T-helper-inducing POZ-Kruppel-like factor (ThPOK) y se ha demostrado que desempeña un papel en el deterioro de las respuestas inmunitarias antivirales al regular negativamente la proliferación de células T, la producción de citocinas y el desarrollo de células de memoria a largo plazo (Piazza et al., 2004; Shin et al., 2017). ZBED2, un nuevo factor de transcripción con dedos de zinc sin ortólogo de ratón, se ha relacionado con la disfunción de las células T en el contexto de la respuesta inmune antitumoral (Li et al., 2019) y, más recientemente, se ha demostrado que reprime la expresión de genes diana de IFN (Somerville et al., <sup>2020</sup>). En apoyo de las posibles propiedades disfuncionales de las células en elgrupo 5 deT FH, encontramos una mayor expresión de varias transcripciones que codifican moléculas vinculadas a la función inhibidora, como TIGIT, LAG3, TIM3 y PD1 (Thommen y Schumacher, 2018 ), y regulación negativa de la activación y proliferación de células T, como DUSP4 y CD70 (Huang et al., 2012; O'Neill et al., 2017) (Figuras 3D y y S3DS3D y Tabla S3 A).

Lo más sorprendente es que las células T FH en el grupo 5 expresaron altos niveles de transcripciones asociadas a citotoxicidad (PRF1, GZMB) (Figuras 3MI, E, S3D,S3D, y S3E), que recuerda a las células T FH citotóxicas descritas recientemente, que se demostró que matan directamente las células B y se asocian con la patogenia de la amigdalitis recurrente en niños ( Dan et al., 2019 ). De relevancia, estudios recientes informaron una pérdida sorprendente de células B del centro germinal en los ganglios linfáticos torácicos y el bazo de pacientes que murieron de infección por SARS-CoV-2 (Kaneko et al., 2020), así como un SARS-CoV-ligeramente más bajo. 2 anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM) específicos de proteína (S) de pico en pacientes con COVID-19 fallecidos ( Atyeo et al., 2020 ). Sobre la base de estos hallazgos, planteamos la hipótesis de que el citotóxico T FHLas células (grupo 5) observadas en pacientes hospitalizados con COVID-19 pueden alterar las respuestas inmunes humorales (células B) al SARS-CoV-2. Para probar esta asociación, evaluamos la correlación entre las proporciones de subconjuntos de células T FH reactivas al SARS-CoV-2 y los títulos de anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) contra el SARS-CoV-2 S1 / S2 (subunidades S1 y S2), que fue mayor en pacientes hospitalizados (Figuras 3F, 3G y y S3G). S3GRAMO). Aunque la frecuencia total de T <sub>FH</sub> reactiva al SARS-CoV-2 células (grupos 0, 5 y 7) mostró una correlación positiva con los niveles de anticuerpos en pacientes COVID-19 hospitalizados, pero no en pacientes COVID-19 no hospitalizados (figura 3F), las proporciones relativas de células T FH citotóxicas (células T FH en el grupo 5) mostraron una fuerte correlación negativa con los niveles de anticuerpos anti-S1 / S2 en pacientes COVID-19 hospitalizados (figura 3G y Tabla S3 C). Por el contrario, las proporciones de células T FH en el grupo O (no citotóxicas) se correlacionaron positivamente con las concentraciones de anticuerpos en pacientes COVID-19 hospitalizados (Figura S3H). Observamos que la magnitud de la respuesta citotóxica de T FH (grupo 5) también mostró una correlación negativa significativa con el intervalo de tiempo entre el inicio de la enfermedad y la recolección de muestras, lo que sugiere que su asociación con los niveles de anticuerpos podría verse confundida por el momento del análisis de los

pacientes. muestras<u>figura 3</u>G y <u>Tabla S3</u> C). Además, no observamos esta asociación negativa entre las células T <sub>FH</sub> citotóxicas y los niveles de anticuerpos anti-S1 / S2 en pacientes no hospitalizados, lo que sugirió que otros mecanismos como títulos virales más bajos podrían explicar los niveles bajos de anticuerpos anti-S1 / S2. en pacientes no hospitalizados. Para evaluar aún más los efectos sobre la función de las células B, analizamos las células B específicas para la proteína de pico del SARS-CoV-2 (subunidades S1 y S2) de nueve pacientes con una proporción variable de células T <sub>FH</sub> citotóxicas. En particular, en los pacientes hospitalizados con altas proporciones de células T <sub>FH</sub> citotóxicas (pacientes 08, 09 y 16), observamos un número mucho menor de células B específicas de S1 / S2 en comparación con aquellos con proporciones más bajas de estas células T citotóxicas. Células <sub>FH</sub> (Figura <u>S3</u>I). Es probable que los estudios longitudinales futuros que examinen la cinética de las respuestas de las células T y B al SARS-CoV-2 proporcionen asociaciones más definitivas y resueltas en el tiempo entre las células T <sub>FH</sub> citotóxicas y las respuestas de los anticuerpos.

A continuación, para caracterizar los reguladores aguas arriba que pueden inducir la diferenciación y el mantenimiento de las células T FH citotóxicas, realizamos un análisis de la vía de ingenio (IPA) de las transcripciones aumentadas en las células T FH reactivas al SARS-CoV-2 en el grupo 5 (citotóxico) cuando en comparación con los del grupo 0 (Tablas S3 D y S3E). Sorprendentemente, encontramos que los IFN de tipo 1 y 2 emergieron como los principales activadores aguas arriba de genes enriquecidos en el grupo citotóxico T FH (Figura S3 y Tablas S3 D y S3E). GSEA confirmó que las firmas de respuesta de IFN también se enriquecieron significativamente en el grupo citotóxico T FH (grupo 5) (Figura S3K). El análisis de la trayectoria de una sola célula mostró que una gran fracción de células T FH citotóxicas (grupo 5) siguió una trayectoria separada de las células del grupo 0 (figura <u>3</u>H), y las células de esta pista se enriquecieron para la firma de respuesta de IFN. Además, encontramos que las transcripciones que codifican la perforina (PRF1) y el factor de transcripción ZBED2 también se enriquecieron en la trayectoria de las células T FH citotóxicas, lo que sugirió la hipótesis de que ZBED2 puede contribuir a la diferenciación o función de las células T FH citotóxicas, aunque estudios adicionales será necesario para verificar esto.

# Expansión clonal masiva de CD4-CTL

Si bien se cree que las células T con función citotóxica consisten principalmente en células T CD8 <sup>+</sup> restringidas por MHC de clase I convencionales, también se han informado células T CD4 <sup>+</sup> restringidas por MHC de clase II con potencial citotóxico (CD4-CTL) en varias infecciones virales en humanos y se asocian con mejores resultados clínicos ( <u>Cheroutre y Husain, 2013</u>; <u>Juno et al., 2017</u>; <u>Meckiff et al., 2019</u>; <u>Weiskopf et al.,</u> <u>2015a</u>). Paradójicamente, en la infección por SARS-CoV-2, encontramos que las células de los grupos CD4-CTL (<u>Figura 4</u> A; grupo 6 y 9) estuvieron presentes con mayor frecuencia en algunos pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con los pacientes no hospitalizados, lo que podría contribuir a la



gravedad de la enfermedad, aunque observamos una heterogeneidad sustancial en las respuestas entre los pacientes (<u>Figuras 4</u>B y <u>and3A3</u>A y <u>Tabla S2</u> B).

#### Figura 4

## Abrir en una ventana separada

Análisis de secuencia de CD4-CTL reactivos al SARS-CoV-2 y TCR de una sola célula

(A) UMAP que muestran el nivel de expresión normalizado por Seurat de las *transcripciones* de *PRF1*, *GZMB*, *GNLY* y *NKG7* en cada célula reactiva al virus.

(B) Porcentaje de CD4-CTL (grupos 6 y 9) en el conjunto total de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 para pacientes con COVID-19 no hospitalizados y hospitalizados; los puntos indican datos de un solo sujeto. Los datos son la media ± SEM; la significación de las

comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; ns, valor de p no significativo .

(C) Gráficos de violín que muestran el nivel de expresión normalizado (log 2 (CPM + 1)) de los factores de transcripción *HOPX* y *ZEB2* y las transcripciones de moléculas efectoras *CD72, GPR18* y *SLAMF7* en células reactivas a virus de grupos designados (6 y 9) en comparación con un agregación de células restantes (resto).

(D) UMAP muestran expresión Seurat-normalizada de CCL3 , CCL4 , CCL5 , XCL1 , y XCL2 transcripciones en cada celda virus reactiva.

(E) UMAP que muestra el tamaño del clon de TCR (log <sup>2</sup>, escala de colores) de células reactivas al SARS-CoV-2 de pacientes con COVID-19 (condición de estimulación de 6 h).

(F) Gráfico de barras del histograma (arriba) que muestra el análisis de la secuencia de TCR de una sola célula de las células reactivas al SARS-CoV-2. Cada barra muestra el número de TCR compartidos entre células de grupos individuales (filas, conectadas por líneas). Las líneas conectadas (abajo) indican qué grupos comparten TCR. Los grupos 6 (verde), 9 (azul) y 11 (rosa), es decir, CD4-CTL, están resaltados.

(G) Análisis de trayectoria de una sola célula que muestra la relación entre células en diferentes grupos (línea), construido usando Monocle 3. Sólo se muestran células reactivas al SARS-CoV-2 de pacientes con COVID-19 (condición de estimulación de 6 h).

Ver también Figura S4y Tabla S4.

El interrogatorio de las transcripciones enriquecidas en los subconjuntos CD4-CTL señaló varias moléculas interesantes y factores de transcripción que probablemente desempeñarán un papel importante en su mantenimiento y función efectora. Estos incluyen moléculas como CD72 y GPR18 que se sabe que mejoran la proliferación de células T y el mantenimiento de subconjuntos de células T de la mucosa, respectivamente ( Jiang et al., 2017; Wang et al., 2014 ) (Figuras 4C y y S4 A). S4 A). Los ejemplos adicionales incluyen factores de transcripción HOPX y ZEB2 (Figuras 4C y y S4A)S4A) que se ha demostrado que regulan positivamente la diferenciación, función, persistencia y supervivencia de los efectores de las células T (<u>Albrecht et al., 2010</u>; <u>Omilusik et al., 2015</u>). Además de las transcripciones asociadas a la citotoxicidad, los subconjuntos CD4-CTL (grupos 6 y 9) y las células T FH citotóxicas (grupo 5) estaban altamente enriquecidos para transcripciones que codifican una serie de quimiocinas como CCL3 (también conocida como proteína inflamatoria de macrófagos [MIP] - 1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) y CCL5 (<u>Figuras 4</u>D y <u>andS2F); S2</u>F); estas quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento de células mieloides (neutrófilos, monocitos, macrófagos), células NK y células T que expresan receptores de quimiocinas de tipo CC (CCR) 1, CCR3 y CCR5 (Hughes y Nibbs, 2018). El subconjunto CD4-CTL en el grupo 6 y las células T FH citotóxicas (grupo 5) también expresaron altos niveles de transcripciones que codifican para las quimiocinas XCL1 y XCL2 (Figuras 4D, D, S4B,S4B y S4C) que reclutan específicamente células dendríticas de tipo 1 convencionales que expresan XCR1 (cDC1) en sitios de respuestas inmunitarias donde desempeñan un papel clave en la promoción de las respuestas de las células T CD8 + mediante la presentación cruzada de antígenos (Lei y Takahama, 2012). En general, las características transcriptómicas de los CD4-CTL

reactivos al SARS-CoV-2 y las células T FH citotóxicas sugieren que es probable que desempeñen un papel importante en la orquestación de las respuestas inmunitarias al reclutar células inmunitarias innatas para mejorar las respuestas de las células T CD8 + , mientras que también que media directamente la muerte citotóxica de células infectadas por virus que expresan MHC de clase II.



#### Figura S4

Análisis de secuencia de TCR de célula única y análisis de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 de estimulación de 24 h y condiciones *ex vivo*, relacionadas con<u>Figura 4</u>

(A) Expresión promedio y expresión porcentual de las transcripciones seleccionadas en los grupos indicados.

Parcelas (B) violín que muestran el nivel de expresión normalizado (log 2 (CPM + 1)) de CCL3, CCL4, CCL5, XCL1, y XCL2 transcripciones en grupos designados (6 y 9) en comparación con una agregación de células restantes (de reposo).

(C) Diagramas de dispersión que muestran el nivel de coexpresión (log <sup>2</sup> (CPM + 1)) de las *transcripciones* de *XCL1* y *XCL2* en células reactivas con SARS-CoV-2 presentes en grupos designados. Los números indican el porcentaje de células en cada cuadrante.

(D) Proporción de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 expandidas (tamaño del clon> 2) en pacientes con COVID-19 hospitalizados y no hospitalizados (condición de estimulación de 6 h). Los datos son la media  $\pm$  SEM; la significación de las comparaciones se calculó mediante la prueba U de Mann-Whitney; <sup>\*</sup> p <0,05.

(E) Transcriptomas unicelulares de células T CD4 <sup>+</sup> de memoria que expresan marcadores de activación (CD38, HLA-DR, PD-1) *ex vivo* (0 h; azul) y células T CD4 <sup>+</sup> <sup>de</sup> memoria CD154 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> clasificadas después de 6 h de estimulación con megapools de péptidos específicos de virus (6 h; rojo) se muestran mediante UMAP. Agrupación basada en Seurat de 122,292 células.

(F) UMAP que muestra la activación, T FH y puntuaciones de firma de CD4-CTL para cada célula.

Parcelas (G) violín que muestran el nivel de expresión (log 2 (CPM + 1)) de *TNFRSF4*, *TNFRSF18*, *MIR155HG*, *CD200*, *IFNG*, *IL2*, *TNF*, y *POU2AF1* transcripciones en 0- y 6 puntos de tiempo h.

(H) Número de células de pacientes emparejados con TCR compartidos (amarillo) y únicos (azul) entre las células positivas al marcador de activación clasificadas *ex vivo* (0 h) y las poblaciones estimuladas con péptido de 6 h (izquierda). Diagrama de Venn que ilustra el número de clones compartidos entre células T CD4 <sup>+</sup> positivas al marcador de activación clasificadas *ex vivo* (0 h) y poblaciones estimuladas con péptido de 6 h.

La recuperación de secuencias de TCR emparejadas de células individuales individuales nos permitió vincular los datos del transcriptoma con la información del clonotipo y evaluar la relación clonal entre diferentes subconjuntos de células T CD4 <sup>+</sup>, así como determinar la naturaleza de los subconjuntos que muestran la mayor expansión clonal (<u>Tablas S4</u> A y S4B). En la infección por SARS-CoV-2, los pacientes hospitalizados se caracterizaron por una gran expansión clonal de las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al virus (media de 55,8%); por el contrario, en los pacientes no hospitalizados, los TCR recuperados se expandieron menos clonalmente (media de 38,0%) (<u>Figura S4</u>D). Entre las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 , los subconjuntos CD4-CTL (grupos 6 y 9) mostraron la mayor expansión clonal (> 75% de las células se expandieron clonalmente), lo que indica una expansión y persistencia preferencial de CD4-CTL en algunos pacientes con enfermedad COVID-19 (Figura 4E y Tablas S4 A y S4B). El análisis de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 clonalmente expandidas de pacientes con COVID-19 mostró un amplio intercambio de TCR entre las células de los grupos 6 y 9, así como las del grupo 11 (Figura 4F), que, en particular, se enriqueció para la expresión de las transcripciones *XCL1* y *XCL2* y también para las transcripciones asociadas a la citotoxicidad, aunque a niveles más bajos en comparación con los grupos establecidos de CD4-CTL (Figuras 4D y andS4CS4C y Tabla S2 F). Por lo tanto, es probable que las células en el grupo 11 sean una población de transición intermedia, una hipótesis respaldada por el análisis de la trayectoria de una sola célula que mostró una posible conexión temporal y similitud transcripcional entre estos subconjuntos (Figura 4GRAMO).

Los informes iniciales en pacientes con COVID-19 agudo han sugerido que las células T circulantes que expresan marcadores de activación como CD38, HLA-DR y PD-1 ex vivo (sin estimulación peptídica in vitro ) están enriquecidas para reacciones reactivas al SARS-CoV-2. Células T ( Braun et al., 2020; Thevarajan et al., 2020 ). Sin embargo, un estudio reciente indicó que las células T transeúntes reactivas a otros antígenos (p. Ej., CMV y EBV) también pueden expresar estos marcadores de activación, que probablemente no se activan específicamente sin la participación de TCR ( Sekine et al., 2020). Por lo tanto, es poco probable que los estudios en la infección activa por SARS-CoV-2 que solo examinen las células T que expresan marcadores de activación revelen la función efectora potencial completa de las células T reactivas contra el SARS-CoV-2. Para determinar la especificidad y las características moleculares de dichas células T que expresan marcadores de activación ex vivo, aislamos CD38 de alta aislamos células T CD4 + de memoria HLA-DR y alto PD-1 + <sup>de</sup> memoria de pacientes hospitalizados con COVID-19 y se realizó un análisis de secuencia de TCR y transcriptoma de célula única de> 20.000 células. Las células T CD4 + que expresan marcadores de activación ex vivo se agruparon de forma distinta a las células T CD4 + reactivas con SARS-CoV-2, que se aislaron despuésestimulación in vitro con péptidos del SARS-CoV-2 durante 6 h (Figura S4E y Tablas S2 C – S2E, S4 C y S4D). Las células T CD4 <sup>+</sup> que expresan marcadores de activación *ex vivo* mostraron una activación reducida y puntuaciones de firma T FH y tenían una menor expresión de transcripciones que codifican citocinas efectoras (IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF $\alpha$ ), marcadores de activación (OX40) y genes asociados a T <sub>FH.</sub> (CD200, POU2AF1) (Figuras S4F y S4G). Además, al comparar las secuencias de TCR de una sola célula, encontramos que el 33,8% de las células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 compartían clonotipos con las células T CD4 + que expresan marcadores de activación ex vivo, y el 12,2% de las células T CD4 + que expresan Los marcadores de activación ex vivo compartieron sus TCR con células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 (Figura S4H y Tablas S4 E y S4F). Nuestros hallazgos indican que el uso de marcadores de activación de superficie como una estrategia para enriquecer las células T reactivas al SARS-CoV-2 sin estimulación del péptido SARS-CoV-2 (ensayo ARTE) puede no capturar el espectro completo de T reactivo al SARS-CoV-2 células, como la biología T  $_{\rm FH}$  y sus perfiles de citocinas, aunque las

características transcriptómicas de tales células activadas *in vitro* pueden verse afectadas por las células presentadoras de antígenos presentes en los cultivos.

# Las células T <sub>REG</sub> reactivas al SARS-CoV-2 se reducen en pacientes hospitalizados con COVID-19

Para capturar células T CD4 + reactivas al SARS-CoV-2 que pueden no regular positivamente los marcadores de activación (CD154 y CD69) después de 6 h de estimulación in vitro con grupos de péptidos SARS-CoV-2, estimulamos PMBC de los mismos cultivos durante un total de 24 h (ver Métodos STAR ) y células capturadas basadas en la coexpresión de los marcadores de activación CD137 (4-1BB) y CD69, una estrategia que nos permitió capturar adicionalmente células T reguladoras específicas de antígeno (T<sub>REG</sub>) (<u>Bacher et al., 2016</u>) (<u>Figuras 5</u> A y <u>y S5 A</u>). S5 A). Nuestro análisis de un total de 38,519 transcriptomas de células T CD4 <sup>+</sup> unicelulares reveló 6 grupos distintos (Figuras 5A – 5C y Tablas S5 A – S5C). El subconjunto T <sub>FH</sub> (grupo D) fue detectable a frecuencias relativamente más bajas en la condición de 24 h, aunque representaron los principales subconjuntos de células T CD4 <sup>+</sup> en la condición de estimulación de 6 h (<u>Figuras 2</u>A y <u>y 5A). 5</u>A). De acuerdo con la cinética retardada de la activación de las células T de memoria central (T <sub>CM</sub>), identificamos una mayor proporción de células T CD4 <sup>+</sup> que expresan transcripciones vinculadas a las células de memoria central (CCR7, IL7R y TCF7) (grupo C) (Figuras 2A, A, 5A,5A y 5C).



### Figura 5

#### Abrir en una ventana separada

Análisis de células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 a partir de una condición de estimulación de 24 h

(A) UMAP muestra los transcriptomas de una sola celda de células CD137<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> memoria CD4<sup>+</sup> T ordenadas después de la estimulación de 24 h con megapools de péptidos específicos de SARS-CoV-2. Agrupación basada en seurat de 38.519 celdas coloreadas en función del tipo de clúster.

(B) Mapa de calor que muestra la expresión de las transcripciones más significativamente enriquecidas en cada clúster (véase <u>la Tabla S5</u>C). El análisis genético del marcador seurat (comparación del grupo de intereses con todas las demás células) mostrados son las 200 transcripciones principales con valor P ajustado < 0,05, el registro<sup>2</sup> veces el cambio > 0,25 y > diferencia del 10% en el porcentaje de células que expresan transcripción expresada diferencialmente entre dos grupos en comparación.

(C) Trazado que muestra la expresión media (escala de color) y el porcentaje de expresión (escala de tamaño) de las transcripciones de genes de marcador seleccionadas en cada clúster.

(D) UMAP que muestra el nivel de expresión normalizado de Seurat de las transcripciones de *FOXP3* (izquierda). Porcentaje decélulas  $T_{REG}$  (cluster A) en el total de células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T para pacientes no hospitalizados y hospitalizados covid-19; puntos indican datos de un solo sujeto (parcela derecha). Los datos son ± SEM; importancia para las comparaciones se calculó utilizando la prueba Mann-Whitney U; \*\*\*p < 0,001.

(E) Frecuencia media de las células por grupo de pacientes hospitalizados y no hospitalizados covid-19.

(F) UMAP que muestra la puntuación total de la firma CD4-CTL para cada célula (izquierda) y porcentaje de CD4-CTLs (clusters B y F) en el total de SARS-CoV-2 reactiva CD4<sup>+</sup> T cell pool para pacientes covid-19 no hospitalizados y hospitalizados; los puntos indican datos de un solo sujeto (trama izquierda). Los datos son malos ± SEM. Significance para comparaciones se calculó usando la prueba Mann-Whitney U; ns, valor *P* no significativo.

(G) Correlación entre porcentaje de SARS-CoV-2-reactivo CD4<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> y porcentaje de SARS-CoV-2-reactivo CD4-CTLs en 13 pacientes no hospitalizados y 17 hospitalizados (izquierda) COVID-19. Coeficiente de correlación r y el valor P relacionado se calcularon utilizando la correlación spearman; \*\*\*\*p < 0,0001.

(H) UMAP que muestra el nivel de expresión normalizado de Seurat de las transcripciones *il1R2* (izquierda) y el porcentaje decélulas T<sub>FR</sub> (*IL1R2*-células que expresan en el grupo A) en el total de sars-cov-2 reactiva CD4<sup>+</sup> T cell pool para pacientes no hospitalizados y hospitalizados COVID-19; los puntos indican datos de un solo sujeto (trama izquierda). Los datos son ± SEM; importancia para las comparaciones se calcularon utilizando la prueba Mann-Whitney U; \*\*\*p < 0,001.

(I) Correlación entre porcentaje de células<sup>FH</sup> citotóxicas citotóxicas sars-cov-2 reactivas (proporción decélulas T<sub>FH</sub> en el grupo 5, desde dataset de estimulación de 6 h como en la Figura <u>3</u>C) y porcentaje decélulas T<sub>FR</sub> (célulasque expresan/*L1R2*en el grupoA) en 25 pacientes COVID-19 (izquierda). Coeficiente de correlación *r* se calculó mediante correlación Spearman; ns, valor *P* no significativo..

Consulte también la figura S5 y la tabla S5.





Análisis de células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T de 24 h Condición de estimulación, relacionada con **la Figura** <u>5</u>

(A) Parcelas representativas de FACS que muestran manchas superficiales de CD137 y CD69 en memoria CD4<sup>+</sup> células T estimuladas durante 24 h con piscinas de péptidos SARS-CoV-2, post-enriquecimiento (basado en CD137), en pacientes hospitalizados y no hospitalizados COVID-19 (izquierda). Resumen del número de células ordenadas en 14 pacientes hospitalizados y 17 no hospitalizados COVID-19 (derecha); datos son medios ± SEM.

(B) GSEA para T<sub>REG</sub>,citotoxicidad, genes dela firma T<sub>FH</sub> y TH17 en un grupo determinado en comparación con el resto de las células; <sup>\*\*</sup>p < 0,01; <sup>\*\*\*</sup>p < 0,001.

(C) Agrupación no supervisada de 17 hospitalizados y 13 pacientes no hospitalizados con COVID-19 en función de las proporciones de células CD4<sup>+</sup> T reactivas del SRAS-CoV-2 en

diferentes grupos después de la estimulación del péptido de 24 h. Los clústeres con menos del 5% del conjunto de datos total no se representan. El estado de hospitalización (rojo versus verde) y el sexo (rosa versus azul) se indican en las filas de anotación inmediatamente debajo del dendrograma.

(D) UMAP que muestra el tamaño del clon TCR (log<sup>2</sup>.escala de color) de células reactivas SARS-CoV-2 de pacientes con COVID-19 (condición de estimulación de 24 h).

(E) Proporción de clonally expandido (tamaño del clon >2) y células no expandidas en cada cúmulo (condición de estimulación de 24 h).

(F) GSEA para genes de firma T<sub>FH</sub> y T<sub>FR</sub> en *IL1R2*<sup>+</sup> células en comparación con *IL1R2*<sup>-</sup> células en el grupo A; \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001.

El clúster más grande (cluster A) se caracterizó por la alta expresión de las transcripciones de FOXP3, que codifica para la caja P3 (FOXP3) (Rudensky,<sup>2011)</sup>(Figuras<u>5</u>A-5D y Tabla <u>S5</u>C). El análisis independiente de GSEA mostró un enriquecimiento positivo significativo delos genes de firma TREG en este grupo, lo que sugiere que las células de este grupo representaban células SARS-CoV-2 reactivas  $T_{REG}$  (Figura<u>S5</u>By Tabla <u>S2</u>H). En particular, la proporción de células en elgrupo T<sub>REG</sub> fue significativamente menor en pacientes hospitalizados con COVID-19 en comparación con pacientes no hospitalizados (Figuras5D, 5E y YS5CS5Cy Tablas <u>S5</u>A yS5B), lo que sugiere un defecto potencial en la generación de células inmunosupresoras SARS-CoV-2 reactivas T<sub>REG</sub> en pacientes hospitalizados. De acuerdo con nuestros datos de la condición de estimulación de 6 h, encontramos que las células en los clusters CD4-CTL (clusters B y F) estaban presentes a frecuencias más altas en algunos pacientes hospitalizados covid-19 (Figuras5E, 5F, yS5C S5C y Tablas <u>S5</u>A y S5B). También mostraron la mayor expansión clonal en comparación con otros grupos (Figuras S5D un S5E y Tabla S4B), lo que sugiere la importancia potencial del subconjunto CD4-CTL para impulsar las respuestas inmunes a la infección sars-cov-2.

El análisis de correlación de la proporción de CD4-CTLs y T<sub>REG</sub> en nuestro conjunto de datos de 24 h reveló una correlación negativa significativa, que indicaba que los pacientes con unarespuesta T<sub>REG</sub> deteriorada al SARS-CoV-2 montaron una respuesta CD4-CTL más fuerte (Figura5G y Tabla S5D). Un estudio reciente en un modelo murino mostró que las respuestas citotóxicas T<sub>FH</sub> se reducen por un subconjunto decélulas T<sub>REG</sub> llamadas células reguladoras foliculares T (T<sub>FR</sub>)(Xie et al., 2019). Para determinar si dicha asociación se observa en nuestros conjuntos de datos, primero cuantificamoslas células T<sub>FR</sub> basadas en la expresión de *IL1R2* (Eschweiler et al., 2020) de las celdas delclúster T<sub>REG</sub> A (Figura5H). GSEA independiente confirmó que las células que expresan *IL1R2*se enriquecieron significativamente para genes foliculares y dela firma T<sub>FR</sub> (Figura<u>S5</u>F), que indicaban que representancélulas T<sub>FR</sub>. Más del 40% de las células delclúster T<sub>REG</sub> expresaron *IL1R2*; esto indica que se genera una fuerte respuesta T<sub>FR</sub> circulante en la infección SARS-CoV-2. Es importante destacar que la proporción decélulas TFR fue significativamente menor en pacientes hospitalizados con COVID-19 (Figura<u>5</u>H) y mostró una modesta correlación negativa con la proporción de células T<sub>FH</sub> citotóxidas (Figura5ıy Tabla S5E). Sobre la base de estos hallazgos y la función

conocida de estos subconjuntos T REG, hipotéticamos que la magnitud de lasrespuestas de T<sub>REG</sub> y T<sub>FR</sub> al SARS-CoV-2 probablemente modulan las respuestas citotóxicas de células CD4<sup>+</sup> T y B en la enfermedad COVID-19, aunque se requieren más estudios para confirmar esta hipótesis.

Vete a:

#### discusión

Existe una necesidad urgente de comprender mejor los determinantes moleculares de las respuestas inmunes protectoras y patógenas en COVID-19. Dada la importancia de las células CD4<sup>+</sup> T en la inmunidad antiviral, es probable que el estudio de esta población de células inmunes adaptativas proporcione información sobre la naturaleza de las respuestas del huésped observadas en pacientes con COVID-19. Los estudios actuales sobrecélulas CD4<sup>+</sup> T específicas de antígeno se limitan al fenotipado basado en citometría de flujo de células que responden al SARS-CoV-2 utilizando conjuntos limitados de marcadores (Braun etal., 2020; Grifoni et al., 2020; Thieme et al., 2020), Thieme et al., 2020), que por lo tanto no logran capturar exhaustivamente la amplitud delas células CD4<sup>+</sup> T que responden al SARS-CoV-2. Los enfogues imparciales que emplean ensayos de ARN-seg de una sola célula pueden proporcionar estos conocimientos; sin embargo, hasta donde sabemos, los estudios unicelulares hasta la fecha sólo han examinadoel total de células CD4<sup>+</sup> T en muestras de sangre o lavado broncoalveolar de pacientes con enfermedad COVID-19<sup>(Vabret et al., 2020).</sup> Debido a la rareza de las células específicas del SARS-CoV-2 en laspoblaciones totales de células CD4<sup>+</sup> T, es probable que las señales de estas células se enmascaran por la abundancia relativa de otras células CD4<sup>+</sup> T no específicas de antígeno. Además, a pesar de la profusión de estudios transcriptómicos unicelulares, el análisis de células T específicas del virus o de cualquier antígeno específico, como tal en los seres humanos, se ha quedado atrás, en parte debido a los desafíos impuestos por los métodos para aislar las células T específicas de antígeno en cantidades suficientes. Aquí, hemos superado estos problemas y realizado un estudio transcriptómico unicelular de células CD4 + T reactivas > 100.000 virus reactivas, centradas en células sars-cov-2 reactivas de 40 pacientes con COVID-19 con gravedad variable de la enfermedad, y compararon su perfil molecular concélulas CD4<sup>+</sup> T reactivas con otros virus respiratorios comunes.

Encontramos una heterogeneidad notable en la naturaleza de los subconjuntos de células CD4<sup>+</sup> T que son reactivos para el SRAS-CoV-2 y otros virus respiratorios y en pacientes individuales y con diferente gravedad de COVID-19. Las células polifuncionales T<sub>H</sub>1, que son abundantes entrelas células CD4<sup>+</sup> T reactivas por FLU y consideradas protectoras<sup>(Seder et al., 2008),</sup>estuvieron presentes en frecuencias más bajas entre las célulasSARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T. Tambiénse observaron frecuencias más bajas de células T<sub>H</sub>17 entre células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T. Por el contrario, encontramos un aumento de las proporciones de células T FH citotóxicas reactivas sars-cov-2 en pacientes hospitalizados con COVID-19. Las células citotóxicas T<sub>FH</sub> pueden matar células B y amortiguar las respuestas del centro germinal (Xieet<sup>al., 2019),</sup>y a nuestro conocimiento esta es la primera descripción de las célulasT FH citotóxicas circulantes en humanos. Es importante destacar que la magnitud de la respuesta

citotóxica de T<sub>FH</sub> al SARS-CoV-2 fue más fuerte al principio del curso de la enfermedad y se correlacionó negativamente con los niveles de anticuerpos con el SARS-CoV-2 S. Informes recientes han encontrado que los pacientes con infecciones mortales covid-19 tienen respuestas celulares germinales abrogadas<sup>(Kaneko et al., 2020)</sup>y niveles muy ligeramente reducidos de anticuerpos IgM específicos de S (Atyeoet<sup>al., 2020)</sup>Ia base mecanicista de la cual no se conoce. Nuestros hallazgos de fuertes respuestas citotóxicas de T<sub>FH</sub> al principio de la enfermedad pueden proporcionar el vínculo con defectos en las respuestas de las células B en algunos pacientes con enfermedad grave y mortal de COVID-19.

Otra observación llamativa es la abundancia en células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T de CD4-CTLs que expresan altos niveles de transcripciones codificando para múltiples quimioquinas (XCL1, XCL2, CCL3, CCL4 y CCL5), particularmente de algunos pacientes hospitalizados covid-19. Esto sugiere que las respuestas CD4-CTL en la enfermedad COVID-19 pueden estar relacionadas con la patogénesis, aunque se requieren más estudios en modelos animales y estudios de asociación a gran escala en pacientes con COVID-19 para verificar o refutar esta hipótesis. En particular, algunos pacientes hospitalizados con COVID-19 mostraron unarespuesta T<sub>REG</sub> deteriorada al SARS-COV-2, y estos pacientes montaron una fuerte respuesta CD4-CTL, planteando otra asociación interesante que justifica pruebas en estudios más grandes.

#### Limitaciones y direcciones futuras

La limitación de este estudio es el tamaño relativamente pequeño de la muestra teniendo en cuenta la heterogeneidad observada en la naturaleza de las respuestas de células CD4<sup>+</sup> T al SARS-CoV-2. El análisis de pacientes en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad no discrimina el efector yla memoria a largo plazo CD4<sup>+</sup> respuestas de células T. Es probable que el muestreo en serie de los mismos pacientes en la fase recuperada proporcione información sobre la naturaleza y persistencia de lasrespuestas de la memoria CD4<sup>+</sup> células T al SARS-CoV-2.

Debido a que la asociación negativa entre las respuestas celulares citotóxicas de  $T_{FH}$ y los niveles de anticuerpos anti-pico no se observó en pacientes no hospitalizados, el papel potencial de las células citotóxicas  $T_{FH}$  en las respuestas de anticuerpos no se puede generalizar. Además, las proporciones más altas de células citotóxicas de  $T_{FH}$  en pacientes hospitalizados pueden simplemente reflejar mayores títulos virales y producción de IFN. Se requieren estudios longitudinales para aclarar la asociación entre las respuestas citotóxicas aberrantes  $T_{FH}$  y su impacto en la modulación de la magnitud y duración de las respuestas protectoras de anticuerpos al SARS-CoV-2. El papel de los CD4-CTLs en las respuestas inmunes protectoras o patógenas al SRAS-CoV-2 debe aclararse en los modelos preclínicos. Estudios futuros en pacientes con COVID-19 también deben examinar las relaciones entre los subconjuntos de células SARS-CoV-2 reactivas CD4<sup>+</sup> T en la sangre y las observadas en los tejidos mucosos donde el control de la infección SARS-CoV-2 es crítico.

# Métodos star ★

#### Tabla de recursos clave

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
anticuerpos		
CD3	Biolegend	SK7; RRID: <u>AB_10640737</u>
CD3	Biolegend	UCHT1; RRID: <u>AB 314060</u>
CD4	Biolegend	OKT4; RRID: <u>AB 2561866</u>
CD8a	Biolegend	RPA-T8; RRID: <u>AB 314134</u>
CD8b	eBiociencia	SIDI8BEE; RRID: <u>AB_2762625</u>
CD14	Biolegend	HCD14; RRID: <u>AB_830693</u>
CD14	Biolegend	M5E2; RRID: <u>AB_493695</u>

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
CD19	Biolegend	HIB19; RRID: <u>AB 314248</u>
CD27	Biolegend	M-T271; RRID: <u>AB_2561825</u>
CD38	Biolegend	HIT-2; RRID: <u>AB_2072782</u>
CD38	Biolegend	SK1; RRID: <u>AB 2564510</u>
CD40 (bloqueo)	Miltenyi Biotec	HB14; RRID: <u>AB 10839704</u>
CD45	Biociencia BD	HI30; RRID: <u>AB_2744399</u>
CD45RA	Biolegend	HI100; RRID: <u>AB 493763</u>
CD56	Biolegend	HCD56; RRID: <u>AB 10896424</u>
CD69	Biolegend	FN50; RRID: <u>AB_2563696</u>
CD137 (4-1BB)	Biolegend	4B4-1; RRID: <u>AB_2566258</u>

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
CD137 (4-1BB)	Miltenyi Biotec	REA765; RRID: <u>AB_2654994</u>
CD138	Biolegend	MI15; RRID: <u>AB_2562899</u>
CD154 (CD40L)	Biolegend	24-31; RRID: <u>AB 314829</u>
CD154 (CD40L)	Miltenyi Biotec	5C8; RRID: <u>AB 2751206</u>
CD197 (CCR7)	Biociencia BD	3D12; RRID: <u>AB 2744306</u>
CD279 (PD-1)	Biociencia BD	EH12.1; RRID: <u>AB_2739399</u>
CD298 (2M; TotalSeq-C)	Biolegend	LNH-94; 2M2; RRID: <u>AB 2801031</u> , <u>AB 2801032</u> , <u>AB 2801033</u> , <u>AB 2820042</u> , <u>AB 2820043</u> , <u>AB 2820044</u> , <u>AB 2820045</u> , <u>AB 2820046</u>
HLA-DR	Biociencia BD	G46-6; RRID: <u>AB_2732846</u>

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
IgD	Biolegend	IA6-2; RRID: <u>AB_2563269</u>
lgG	Biolegend	M1310G05; RRID: <u>AB 2565788</u>
lgm	Biolegend	MHM-88; RRID: <u>AB_2562916</u>
Ki-67	Biociencia BD	B56; RRID: <u>AB 2732007</u>
nucleoproteína	Sino Biológico	
Proteína S1/S2	Sino Biológico	

#### Muestras biológicas

Criopreservados Hospital

<b>REACTIVO O</b>	fuente	identificador
RECURSO		
PBMCs de	Universitario	
pacientes	de	
hospitalizados y	Southampto	
no hospitalizados	n	
COVID-19		
PBMCs	Banco de	
criopreservados	Sangre de	
de sujetos sanos	San Diego	
no expuestos		
Criopreservados	Instituto de	
PBMCs de	Inmunología	
sujetos antes y/o	La Jolla	
después de		
recibir		
vacunación		
contra la gripe		

Productos químicos, péptidos y proteínas recombinantes

<b>REACTIVO O</b>	fuente		identificador
RECURSO			
Peptivador SARS-	Miltenyi	130-126-703	
CoV-2 Prot M	Biotec		
(glicoproteína de			
membrana)			
Peptivator SARS-	Miltenyi	130-126-701	
CoV-2 Prot S	Biotec		
(glicoproteína de			
espiga)			
Megapools SARS-	Instituto de		
CoV-2 (CD4-R y	Inmunología		
CD4-S)	La Jolla -		
	Sette		
Megapool de	Instituto de		
Parainfluenza	Inmunología		
Humana (HPIV)	La Jolla -		
	Sette		
Megapool del	Instituto de		

Metapneumoviru	Inmunología
s Humano	La Jolla -
(HMPV)	Sette

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
Megapool de la Gripe Humana (HA)	Instituto de Inmunología La Jolla - Sette	
Viabilidad reparable Tinte eFluor 780	eBiociencia	<u>C34557</u>
Datos depositados		

Datos de

Expresión <u>GSE152522</u>

secuenciación génica

Ómnibus

Software y algoritmos

REACTIVO O RECURSO	fuente	identificador
Flowjo v10	Flowjo	https://www.flowjo.com/
Prisma 8	Graphpad	https://www.graphpad.com
Cellranger v3.1.0	10x Genómica	https://www.10xgenomics.com
Seurat v3.1.5	(Stuart <sup>et al.,</sup> 2019)	https://www.satijalab.org/seurat
R v3.6.1	Equipo de R Core	www.R-project.org
UpSetR v1.4.0	<u>(Conway et al.,</u> 2017)	<u>https://github.com/hms-dbmi/UpSetR</u>
Monocle3 v0.2.1	( <u>Trapnell et al.,</u> 2014)	https://cole-trapnell-lab.github.io/monocle3/
MAST v1.10.0	(Finak et al., 2015)	https://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/MAST.h

<b>REACTIVO O</b>	fuente	identificador
RECURSO		
		tml
FGSEA	<u>(Korotkevich et al.,</u>	https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/fgsea.html
	<u>2019)</u>	

#### Otro

Biblioteca de	10x	1000080
códigos de barras	Genómica	
de función		
Chromium Single		
Cell 5¢		

Biblioteca	10x	1000006
Chromium Single	Genómica	
Cell 5¢ & Kit		
de cuentas de gel		

Kit de 10x 1000020

construcción de Genómica

REACTIVO O fuente

identificador

RECURSO

la biblioteca

Chromium Single

Cell 5¢

Kit de10x1000005enriquecimientoGenómicaC(D)J de célulasindividuales decromo, célula Thumana

Kit de chip A de	Genómica	1000151
celda única de	10x	
cromo		

Kit multiplex de	Genómica	120262
Cromo i7	10x	

Kit de	1000084
multiplexación	
Chromium i7 N,	
conjunto A	

TexMACS Miltenyi 130-097-19 Biotec

#### Disponibilidad de recursos

#### **Contacto principal**

Se puede dirigir más información y solicitudes de reactivos al contacto principal, Pandurangan Vijayanand (<u>vijay@lji.org</u>).

#### Disponibilidad de materiales

Los grupos de epítopos de SARS-CoV-2, influenza humana (FLU), parainfluenza (HPIV) y metapneumovirus (HMPV) utilizados en este documento se pondrán a disposición de la comunidad científica previa solicitud y ejecución de un acuerdo de transferencia de material (MTA) dirigido al Dr. . Alessandro Sette (<u>alex@lji.org</u>). Puede haber restricciones en la disponibilidad de los reactivos peptídicos debido al costo y la cantidad limitada.

#### Disponibilidad de datos y códigos

Los scripts están disponibles en nuestro repositorio en GitHub (<u>https://github.com/vijaybioinfo/COVID19\_2020</u>). Los datos de secuenciación para este estudio se han depositado en el Gene Expression Omnibus con el número de acceso <u>GSE152522</u>.

#### Modelo experimental y detalles del sujeto

#### Pacientes y muestras de COVID-19

Se obtuvo la aprobación ética para este estudio del Comité de Ética de Investigación de Berkshire 20 / SC / 0155 y el Comité de Ética del Instituto de Inmunología de La Jolla (LJI). Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los sujetos. 22 pacientes hospitalizados en un gran hospital universitario en el sur de Inglaterra con infección por SARS-CoV-2, confirmada por el ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para detectar el SARS-CoV-2, entre abril y mayo de 2020 fueron reclutados para el estudio. También se reclutó durante el mismo período una cohorte adicional de 18 participantes que consistía en trabajadores de la salud que no fueron hospitalizados con la enfermedad COVID-19, confirmada en base a un ensayo de RT-PCR o evidencia serológica de anticuerpos contra el SARS-CoV-2. Todos los sujetos proporcionaron hasta 80 ml de sangre para estudios de investigación. Los datos clínicos y demográficos se obtuvieron de los registros de los pacientes hospitalizados, incluidas las comorbilidades, los resultados de sangre, la intervención farmacológica, la afectación radiológica, los eventos trombóticos, los resultados de microbiología y virología (Tabla S1A). Los 22 pacientes hospitalizados tenían una edad media de 60 (33-82), 17 de estos pacientes (77%) eran hombres y esta cohorte consistía en 16 (73%) blancos británicos / blancos otros, 4 (18%) indios y 2 (9%) pacientes negros británicos. Todos los pacientes hospitalizados sobrevivieron hasta el alta hospitalaria. Todos los pacientes hospitalizados aún presentaban síntomas en el momento de la extracción de sangre, mientras que algunos de los

pacientes no hospitalizados (4/18) no presentaban síntomas (Tabla S1A). Los 18 participantes no hospitalizados tenían una mediana de edad de 39 (22-50), 8 (44%) de estos participantes eran hombres y esta cohorte consistía en 15 (83%) blancos británicos / blancos otros, 2 (11%) participantes árabes y 1 (6%) chinos. Observamos que la mediana de edad de los pacientes no hospitalizados fue menor que la de los pacientes hospitalizados con COVID-19.

## **Controles saludables**

Estudiar los CD4 <sup>+</sup> reactivos al VPH, HMPV y SARS-CoV-2Células T de sujetos sanos no expuestos (pandemia anterior a COVID-19), utilizamos muestras de capa leucocitaria anónimas de 5 donantes adultos sanos que donaron sangre en el Banco de Sangre de San Diego antes de 2019, antes de la pandemia de Covid-19. Se consideró que los donantes gozaban de buena salud, no presentaban síntomas de resfriado o gripe y no tenían antecedentes de hepatitis B o hepatitis C. La mediana de edad fue 50 (32-71) y 4 de estos pacientes (80%) eran hombres. Para estudiar las células reactivas a la gripe, obtuvimos muestras de sangre anónimas de 8 donantes inscritos en el Programa de donantes de sangre normales de LJI antes y / o después (12 a 14 días) de recibir la vacuna FLUCELVAX (septiembre y octubre de 2019). La mediana de edad fue 37 (26-57) y 5 de estos pacientes (63%) eran mujeres. La aprobación para el uso de este material se obtuvo del Comité de Ética de LJI.

## Detalles del método

### Procesamiento de PBMC

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de hasta 80 ml de sangre anticoagulada mediante centrifugación por densidad sobre Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Noruega) y se criopreservaron en suero de anticuerpo humano descomplementado al 50%, medio RMPI 1640 completo al 40%. y DMSO al 10%.

### Grupos de péptidos SARS-CoV-2

Se obtuvieron grupos de péptidos liofilizados que cubren la secuencia inmunodominante de la glicoproteína de pico y la secuencia completa de la glicoproteína de membrana del SARS-CoV-2 (secuencias de 15 meros con superposición de 11 aminoácidos) de Miltenyi Biotec (<u>Thieme et al., 2020</u>) resuspendido y almacenado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### Prueba de anticuerpos contra el SARS-CoV-2

El LIAISON SARS-CoV-2 S1 / S2 IgG (DiaSorin SpA, Saluggia, Italia) se utilizó según las instrucciones del fabricante para obtener resultados cuantitativos de anticuerpos a partir de muestras de plasma mediante un inmunoensayo de quimioluminiscencia indirecta (CLIA) en un Servicio de Acreditación del Reino Unido (UKAS). ) laboratorio de diagnóstico en el Hospital Universitario de Southampton. Los

resultados de la muestra se interpretaron como positivos ( $\geq$  15 AU / mL), Equivocados ( $\geq$  12,0 y <15,0 AU / mL) y negativos (<12 AU / mL).

#### Respuestas de células B específicas de proteína de pico de SARS-CoV-2

Para evaluar el nivel de células B específicas de SARS-CoV-2 S1 / S2, se prepararon células en tampón de tinción (PBS con FBS al 2% y EDTA 2 mM), se bloqueó con FcyR (clon 2.4G2, BD Biosciences), se tiñeron con el indicado anticuerpos primarios y proteínas S1 / S2 biotiniladas (Sino Biological) durante 30 min a 4 ° C; lavado y posteriormente teñido con estreptavidina-BV421. Los pacientes 10, 24 y 49 fueron analizados en un día diferente con un láser violeta de menor intensidad y requirieron diferentes puertas.

### Epítopo Megapool de diseño de péptidos (MP)

Los megapools (MP) de péptidos de células T CD4 <sup>+ de</sup> parainfluenza humana (HPIV) y metapneumovirus (HMPV) se produjeron mediante liofilización secuencial de epítopos específicos de virus como se describió anteriormente ( Carrasco Pro et al., 2015, Weiskopf et al., 2015b ). Las listas completas de las secuencias de proteínas virales derivadas de la base de datos uniprot y utilizadas para los diseños HPIV y HMPV MP están disponibles en la Tabla S1F. La predicción de linfocitos T se realizó mediante la herramienta TepiTool, disponible en los recursos de análisis de bases de datos de epítopos de identificación (IEDB-AR, LJI), aplicando el método de predicción de 7 alelos y una mediana de corte ≤20 (Dhanda et al., 2019, Paul et al., 2015, Paul et al., 2016). Para la HAinfluenza MP, seleccionamos 177 epítopos definidos experimentalmente, recuperados consultando la base de datos IEDB ( www.IEDB.org ) el 12/07/19 con los parámetros de búsqueda "solo ensayo positivo, sin ensayos de células B, sin ensayo de ligando MHC, Anfitrión: Homo Sapiens y MHC clase de restricción II". La lista de epítopos se enriqueció con péptidos predichos derivados de las secuencias de HA de las cepas vacunales disponibles en 2017-2018 y 2018-2019 (A / Michigan / 45/2015 (H1N1), B / Brisbane / 60/2008, A / Hong Kong / 4801/2014 (H3N2), A / Michigan / 45/2015 (H1N1), A / Alaska / 06/2016 (H3N2), B / Iowa / 06/2017 y B / Phuket / 3073/2013). Luego, los péptidos resultantes se agruparon utilizando la herramienta IEDB cluster 2.0 y el método recomendado por IEDB (método de ruptura de grupo) con un corte del 70% para la identidad de secuencia aplicada ( Dhanda et al., 2019, Dhanda et al., 2018 ) (Tabla S1E). Los péptidos se sintetizaron como material crudo (A&A, San Diego, CA), se resuspendieron en DMSO, se agruparon de acuerdo con cada composición de MP y finalmente se liofilizaron secuencialmente (Carrasco Pro et al. 2015). Para el cribado de sujetos sanos no expuestos (muestras proporcionadas antes de la pandemia actual) que reaccionan de forma cruzada al SARS-CoV-2, analizamos a 20 sujetos sanos no expuestos utilizando conjuntos de péptidos CD4-R y CD4-S del SARS-CoV-2, como se describe (Grifoni et al., 2020).

#### Ensayo de enriquecimiento de células T reactivas a antígenos (ARTE)

El enriquecimiento y la clasificación FACS de las células T de memoria CD154 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> reactivas al virus después de la estimulación del grupo de

péptidos se adaptó de Bacher et al. 2016 (Bacher et al., 2016). Brevemente, las PBMC de cada donante se descongelaron, lavaron, sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 5 × 10 6 células / ml en 1 ml de medio TexMACS sin suero (Miltenyi Biotec) y se dejaron durante la noche (5% CO 2, 37 ° C). Las células se estimularon mediante la adición de grupos de péptidos específicos de virus individuales (1 μg / mL) durante 6 h en presencia de un anticuerpo CD40 de bloqueo (1 µg / mL; Miltenyi Biotec). Para el enriquecimiento posterior de CD154 basado en MACS<sup>+</sup>, las células se tiñeron secuencialmente con anticuerpos de superficie marcados con fluorescencia (lista de anticuerpos en la Tabla S1G), anticuerpo Cell-hashtag TotalSeq-C (0,5 µg / condición) y un anticuerpo CD154 conjugado con biotina (clon 5C8; Miltenyi Biotec) seguido de anti -microperlas de biotina (Miltenyi Biotec). Las células marcadas se añadieron a columnas MS (Miltenyi Biotec) y las células seleccionadas positivamente (CD154 \* ) se eluyeron y se usaron para la clasificación FACS de células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria CD154 <sup>+</sup> . El flujo de la columna se recogió y se volvió a sembrar para cosechar las células que respondieron 24 h después de la estimulación con péptidos. Análogo al enriquecimiento para CD154 +, CD4 + que expresa CD137Las células T de memoria se seleccionaron positivamente mediante tinción con anticuerpo CD137 conjugado con biotina (clon REA765; Miltenyi Biotec) seguido de MicroBeads anti-biotina y se aplicaron a una nueva columna MS. Después de la elución, las poblaciones enriquecidas se clasificaron inmediatamente usando un clasificador de células de fusión FACSAria (Becton Dickinson) basado en la expresión dual de CD154 y CD69 para la condición de estimulación de 6 h, y CD137 y CD69 para la condición de estimulación de 24 h. La estrategia de puerta utilizada para la clasificación se muestra en las Figuras S1A y S4B. Todos los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el software FlowJo (versión 10).

#### Aislamiento celular y ensayo de secuenciación de ARN unicelular (plataforma 10x)

Para los ensayos combinados de RNA-seq y TCR-seq (10x Genomics), se agruparon un máximo de 60.000 células T CD4 <sup>+ de</sup> memoria reactiva al virus de hasta 8 donantes clasificándolas en tubos de recogida de 1,5 ml de baja retención, que contenían 500 µl de una solución 1: 1 de PBS: FBS suplementada con inhibidor de RNasa recombinante (1: 100, Takara). En el caso de donantes sanos, cuando fue posible, se aislaron cantidades iguales de células de cada donante y se combinaron antes de 10 experimentos de secuenciación de ARN de una sola célula de Genomics. Para el análisis de las respuestas de células T CD4 + reactivas a la gripe, secuenciamos muestras emparejadas antes y después de la vacunación de 4 donantes y las complementamos con 2 muestras no emparejadas para antes y después de la vacunación. Las muestras de antes y después de la vacunación se combinaron para el análisis de CD4 reactivo a la gripe. + Células T. Después de la clasificación, se añadió PBS helado para completar un volumen de 1400 µl. A continuación, las células se centrifugaron durante 5 min (600 ga 4 ° C) y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente dejando de 5 a 10 μl. Se añadieron al tubo 25 µl de tampón de resuspensión (0,22 µm de PBS filtrado y enfriado con hielo suplementado con albúmina de suero bovino ultrapura; 0,04%, Sigma-Aldrich) y el sedimento se resuspendió suave pero completamente. Después de una mezcla cuidadosa, se transfirieron 33  $\mu$ l de la suspensión celular a un tubo de PCR para su procesamiento según las instrucciones del fabricante (10x Genomics).

Brevemente, la preparación de la biblioteca de secuenciación de ARN de una sola célula se realizó según las recomendaciones del fabricante para la química 10x Genomics 5 'TAG v1.0 con perfil inmunológico y tecnología de proteínas de superficie celular. Tanto la amplificación inicial del ADNc como la preparación de la biblioteca se llevaron a cabo con 13 ciclos de amplificación; Se generaron bibliotecas de proteínas de superficie celular y V (D) J correspondientes a cada biblioteca de expresión génica TAG de 5 '' usando 9 ciclos y 8 ciclos de amplificación, respectivamente. Las bibliotecas se cuantificaron y combinaron de acuerdo con concentraciones molares equivalentes y se secuenciaron en la plataforma de secuenciación Illumina NovaSeq6000 con las siguientes longitudes de lectura: lectura 1 - 101 ciclos; leer 2 - 101 ciclos; e índice i7 - 8 ciclos.

#### Análisis de transcriptoma unicelular

Las lecturas de RNA-seq de una sola célula se alinearon y colapsaron en recuentos de identificadores moleculares únicos (UMI) utilizando el software Cell Ranger de 10x Genomics (v3.1.0) y se asignaron al genoma de referencia GRCh37 (v3.0.0). Los recuentos de Hashtag UMI para cada biblioteca de captura de anticuerpos TotalSeq-C se generaron con la tubería de análisis de códigos de barras de funciones de Cell Ranger. Para demultiplexar donantes, los recuentos de UMI de códigos de barras de células se obtuvieron primero a partir de la salida de datos sin procesar, y solo las células con al menos 100 UMI para el hashtag con los recuentos de UMI más altos se consideraron para la asignación de donantes. Las identidades de los donantes fueron inferidas por *MULTIseqDemux*(autoThresh = TRUE y maxiter = 10) de Seurat (v3.1.5) usando los recuentos UMI. A cada código de barras de la celda se le asignó una identificación de donante, marcada como un doblete o con un enriquecimiento negativo. Las células se volvieron a clasificar como dobletes si la proporción de recuentos de UMI entre los 2 códigos de barras superiores era inferior a 3. Las células etiquetadas como doblete o negativo se eliminaron de los análisis posteriores. Los datos sin procesar de 10x se agregaron de forma independiente utilizando la función aggr de Cell Ranger (v3.1.0). Los donantes P28 y P48 no se tiñeron con anticuerpos hashtag y, por lo tanto, no contribuyeron a ningún dato específico del donante. Los datos fusionados se transfirieron al entorno estadístico R para su análisis utilizando el paquete Seurat (v3.1.5) (<u>Stuart et al., 2019</u>). Para minimizar aún más los dobletes y eliminar las células con transcriptomas de baja calidad, se excluyeron las células que expresan <800 y> 4400 genes únicos, <1500 y> 20.000 contenido total de UMI y> 10% de los UMI mitocondriales. Las estadísticas resumidas para todas las bibliotecas de transcriptomas unicelulares se proporcionan en la Tabla S2C-E e indican datos de buena calidad sin diferencias importantes en las métricas de control de calidad en varios lotes, donde los lotes son grupos de donantes cuyas bibliotecas se secuenciaron juntas (Figura S2A). Este procedimiento se aplicó de forma independiente para los datos de CD4 <sup>+</sup> T estimuladas durante 0 y 6 h, 6 y 24 h.

Para el análisis del transcriptoma de una sola célula, solo se incluyeron los genes expresados en al menos el 0,1% de las células. Luego, los datos del transcriptoma se transformaron en logaritmos y se normalizaron (en un factor de 10,000) por celda, utilizando la configuración predeterminada en el software Seurat ( Stuart et al., <sup>2019</sup>). Los genes variables con una expresión media de UMI superior a 0,01 y que explican el 25% de la varianza total se seleccionaron utilizando el método de transformación estabilizadora de varianza, como se describe ( Stuart et al., 2019 ). Los datos transcriptómicos de cada célula se escalaron posteriormente mediante la regresión del número de UMI detectados y el porcentaje de recuentos mitocondriales. Para datos de CD4 \*Células T estimuladas durante 6 h, el análisis de componentes principales se realizó utilizando los genes variables y, basándose en la desviación estándar de los PC en el "diagrama de codo", se seleccionaron los primeros 38 componentes principales (PC) para análisis adicionales. Las celdas se agruparon utilizando las funciones *FindNeighbors* y *FindClusters* en Seurat con una resolución de 0.6. La solidez de la agrupación se verificó de forma independiente mediante otros métodos de agrupación y modificando el número de PC y genes variables utilizados para la agrupación. El análisis de los patrones de agrupación en varios lotes no reveló evidencia de efectos de lote fuertes (Figura S2A). Para datos de CD4 <sup>+</sup>Con células T estimuladas durante 24 h, se seleccionaron las primeras 16 PC para análisis adicionales. El grupo 6 (G) en el conjunto de datos de 24 h se fusionó con el grupo 0 (A) después de ser identificado como T<sub>REG</sub>. Para el análisis de agregación de 0 y 6 h, se tomaron 30 PC. Finalmente, las celdas se agruparon usando FindNeighbors y FindClustersfunciones en Seurat con una resolución de 0,6 y 0,2 para 6 y 0 h de agregación y 24 h, respectivamente. Se generaron más visualizaciones de datos normalizados exportados, como gráficos UMAP o "violín", utilizando el paquete Seurat y scripts R personalizados. La forma del violín representa la distribución de las células que expresan la transcripción de interés (basada en un modelo de estimación de densidad del núcleo de Gauss) y están coloreadas según el porcentaje de células que expresan la transcripción de interés.

### Análisis de expresión génica diferencial unicelular

El análisis de expresión génica diferencial de una sola célula por pares se realizó utilizando el paquete MAST en R (v1.8.2) ( $_{\text{Finak et al., 2015}}$ ) después de la conversión de datos a log  $_2$  recuentos por millón (log  $_2$  (CPM + 1)). Se consideró que un gen se expresaba diferencialmente cuando el valor de *P* ajustado de Benjamini-Hochberg era <0,05 y un cambio log  $_2$  veces mayor de 0,25. Para encontrar marcadores de conglomerados (transcripciones enriquecidas en un conglomerado determinado) se utilizó la función *FindAllMarkers* de Seurat.

# Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes y puntuaciones del módulo de firma

Las puntuaciones de GSEA se calcularon con el paquete *fgsea* en R utilizando la relación señal / ruido (o el cambio de log 2 veces para la comparación del grupo 5 frente al grupo 0) como métrica. Los conjuntos de genes estaban limitados por

minSize = 3 y maxSize = 500. Las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas se presentaron como gráficos GSEA. Las puntuaciones de los módulos de firma se calcularon con la función *AddModuleScore*, utilizando la configuración predeterminada en Seurat. Brevemente, para cada célula, la puntuación se define por la media de la lista de genes distintivos después de restar la expresión media de un agregado de listas de genes de control. Se tomaron muestras de listas de genes de control (del mismo tamaño que la lista de firmas) de contenedores creados en función del nivel de expresión de la lista de genes de firmas. Las listas de genes utilizadas para el análisis se proporcionan en la Tabla S2H.

#### Análisis de trayectoria unicelular

La trayectoria "ramificada" se construyó utilizando Monocle 3 (v0.2.1, configuración predeterminada) ( Trapnell et al., 2014 ) con el número de UMI, el porcentaje de UMI mitocondrial como fórmula del modelo e incluyendo los genes altamente variables de Seurat para mayor consistencia. . Después de establecer una sola partición para todas las células, la trayectoria de la célula se proyectó en el PCA y el UMAP generado a partir del análisis de Seurat. La 'raíz' fue seleccionada por la función get\_earliest\_principal\_node proporcionada en el paquete. Se usó Monocle 3 alpha para analizar los conglomerados 0 y 5 usando el algoritmo DDRTree para la reducción dimensional después de seleccionar los 500 genes altamente variables con Seurat.

### Análisis de la secuencia del receptor de células T (TCR)

Las lecturas de bibliotecas enriquecidas con secuencias de TCR V (D) J de celda única (Tabla S2D) se procesaron con *vdj*canalización de Cell Ranger (v3.1.0 y las anotaciones humanas hacen referencia a GRCh38, v3.1.0, como se recomienda). En resumen, se reunieron las transcripciones de V (D) J y se obtuvieron sus anotaciones para cada biblioteca independiente. Para realizar un análisis combinado del transcriptoma de una sola célula y la secuencia de TCR de las mismas células, primero se agregaron las bibliotecas V (D) J utilizando un script personalizado. Luego, los sufijos de códigos de barras celulares de estas bibliotecas se revisaron de acuerdo con el orden de sus bibliotecas de expresión génica. Se identificaron clonotipos únicos, tal como los define 10x Genomics como un conjunto de secuencias productivas de la Región 3 que determina la complementariedad (CDR3), en todos los archivos de la biblioteca y su frecuencia y proporción (estadísticas de clones) se calcularon en función del resultado de agregación considerando solo las células presentes en las bibliotecas de expresión génica. \* Células T estimuladas durante 6 y 24 h. Con base en los archivos de agregación de vdj, los códigos de barras capturados por nuestros datos de expresión génica y previamente filtrados para mantener solo células de buena calidad, se anotaron con un ID de clonotipo específico junto con su tamaño de clon (número de células con los mismos clonotipos en uno o ambos Cadenas alfa y beta de TCR) y otras estadísticas (Tabla S4A, B, E y F). Las células que comparten el clonotipo con más de 1 célula se denominaron expandidas clonalmente (tamaño del clon> 2). El tamaño del clon para cada célula se visualizó en UMAP,

representando sólo células T CD4 <sup>+</sup> reactivas con SARS-CoV-2 . El uso compartido del clonotipo entre células en diferentes grupos se representó utilizando la herramienta UpSetR ( <sup>Conway et al., 2017</sup>). Finalmente, para evaluar el intercambio entre los conjuntos de datos de 0 y 6 h, se aplicó el mismo proceso de agregación para todas las bibliotecas de *vdj a* partir de estos datos y solo las células T CD4 <sup>+</sup> reactivas al SARS-CoV-2 aisladas específicamente de pacientes emparejados. entre conjuntos se consideraron.

### Cuantificación y análisis estadístico

El procesamiento de datos, los métodos aplicados y los códigos se describen en la sección respectiva de los Métodos STAR. El número de sujetos, muestras, réplicas analizadas y la prueba estadística realizada se indican en las leyendas de las figuras o métodos STAR. El análisis estadístico para la comparación entre dos grupos se evaluó con la prueba U de Mann Whitney y la correlación se evaluó con la prueba de Spearman utilizando GraphPad Prism.

<u>y:</u>

# **Expresiones de gratitud**

Agradecemos a Luke Smith por el reclutamiento de pacientes y la recolección de muestras; Callum Dixon, Benjamin Johnson, Lydia Scarlett y Silvia Austin para la recopilación de datos clínicos; Céline Galloway, Oliver Wood, Katy McCann y Lindsey Chudley para el procesamiento de muestras; y Sharon Gilchrist para la ilustración. Agradecemos al Núcleo de Citometría de Flujo del Instituto La Jolla (LJI) por ayudar con la clasificación celular y el Núcleo de Estudios Clínicos de la LJI para organizar la recolección de muestras. Agradecemos a Peter Friedmann y Anusha Preethi Ganesan por proporcionar comentarios críticos sobre el manuscrito. Esta obra fue financiada por las subvenciones de los NIH U19AI14274, U19AI142742-OS1 (a P.V., A.S., y C.H.O.), U19AI118626 (a P.V., A.S., y G.S.), R01HL114093 (a P.V., F.A., y G.S.), R35-GM128938 (F.A), S10RR027366 (BD FACSAria-II) y S100D025052 (Illumina Novaseq6000); la Fundación William K. Bowes, Jr. (P.V.); y Fundación Whittaker (C.H.O.). Apoyado por la Red de Investigación Clínica Wessex y el Instituto Nacional de Investigación de la Salud del Reino Unido.

### **Contribuciones del autor**

B.J.M., S.J.C., C.H.O., y P.V. concibieron la obra. B.J.M., S.J.C, C.H.O., y P.V. diseñaron el estudio y escribieron el manuscrito. S.J.C. supervisó la identificación, el reclutamiento, la recolección de muestras y el procesamiento de muestras. E.P. supervisó el análisis de pruebas virales de PCR y serología. A.G., D.W., y A.S. proporcionaron reactivos esenciales para el aislamiento de células CD4<sup>+</sup> T reactivas por viral. B.J.M. y A.K. realizaron ensayos ARTE y clasificación FACS, S.E. realizaron análisis de células B y H.S. realizaron secuenciación de ARN de una sola célula bajo la supervisión de G.S., C.H.O., y P.V.C.R.-S. y V.F. realizó análisis bioinformáticas bajo la supervisión de G.S., F.A., C.H.O., y P.V.

#### Declaración de intereses

Los autores no declaran intereses competidores.

#### Notas

Publicado: 5 de octubre de 2020

#### Notas

La información suplementaria se puede encontrar en línea en

https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.001.

Vete a:

### Información suplementaria

Tabla S1. Detalles del sujeto humano, Resumen de todos los datos de FACS, Secuencias de proteínas virales y Anticuerpos, Relacionados con las Figuras 1 y S1:

Haga clic aquí para ver. (40K, xlsx)

Tabla S2. Controles de calidad de secuenciación unicelular y números de células específicos del sujeto, transcripciones enriquecidas por clúster para la condición de estimulación de 6 h, análisis diferencial de expresiones génicas que comparan células CS-CoV-2 frente a células CD4+ T reactivas por FLU y listas de genes utilizadas para el análisis de enriquecimiento de conjunto genético y puntuaciones de módulos de firma, relacionadas con las figuras 2, 3, S2 y S3: Haga clic aquí para ver. <sup>(2,2 M, xlsx)</sup>

Tabla S3. Análisis de expresión génica diferencial unicelular, datos resumidos para análisis de correlación para la condición de estimulación de 6 h que se muestran en la figura 3 y el análisis del IAP, relacionados con las figuras 3 y S3: Haga clic aquí para ver. <sup>(683K, xlsx)</sup>

Tabla S4. Datos de clonotipo TCR específicos del sujeto y específicos del clúster; Números de celda específicos del sujeto y transcripciones enriquecidas del clúster para celdas que expresan marcadores de activación ex vivo, relacionados con las figuras 4 y S4:

Haga clic aquí para ver. (23M, xlsx)

Tabla S5. Números de celda específicos del sujeto de secuenciación de células únicas para la condición de estimulación de 24 h, genes enriquecidos en racimo para la condición de estimulación de 24 h y datos resumidos para todos los análisis de correlación que se muestran en la figura 5, relacionados con las figuras 5 y S5:

Vete a:

Vete a:

## Referencias

- Acharya D., Wang P., Paul A.M., Dai J., Gate D., Lowery J.E., Stokic D.S., Leis A.A., Flavell R.A., Town T. Interleukin-17A promueve la citotoxicidad de células T CD8+ para facilitar la eliminación del virus del Nilo Occidental. *Revista de Virología*. 2016;91 e01529–e16. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Albrecht I., Niesner U., Janke M., Menning A., Loddenkemper C., Kühl A.A., Lepenies I., Lexberg M.H., Westendorf K., Hradilkova K. Persistencia de la memoria efectora Th1 células está regulada por Hopx. *Revista Europea de Inmunología*. 2010;40:2993–3006. [PubMed] [GoogleScholar]
- Atyeo C., Fischinger S., Zohar T., Slein M.D., Burke J., Loos C., Mcculloch D.J., Newman K.L., Wolf C., Yu J. Distinct Early Serological Signatures Track with Sars-Cov-2 Survival. *Inmunidad*. 2020;53:524–532.e4. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Bacher P., Schink C., Teutschbein J., Kniemeyer O., Assenmacher M., Brakhage A.A., Scheffold A. Enriquecimiento de células T reactivos por antígeno para el análisis directo y de alta resolución del repertorio humano ingenuo y de memoria. *J Immunol.* 2013;190:3967–3976. [PubMed] [GoogleScholar]
- Bacher P., Heinrich F., Stervbo U., Nienen M., Vahldieck M., Iwert C., Vogt K., Kollet J., Babel N., Sawitzki B. La especificidad regulatoria de las células T dirige tolerancia versus alergia contra los aeroanágenos en humanos. *La celda*. 2016;167:1067–1078.e16. [PubMed] [GoogleScholar]
- Bacher P., Hohnstein T., Beerbaum E., Rocker M., Blango M.G., Kaufmann S., Rohmel J., Eschenhagen P., Grehn C., Seidel K. Human Anti-Fungal Th17 Immunity and Pathology Confían en la reactividad cruzada contra Candida Albicans. *La celda*. 2019;176:1340–1355.e15. [PubMed] [GoogleScholar]
- Bentebibel S.E., López S., Obermoser G., Schmitt N., Mueller C., Harrod C., Flano E., Mejías A., Albrecht R.A., Blankenship D. Inducción de células ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH se correlaciona con respuestas de anticuerpos a la vacunación antigripal. *Sci Transl Med.* 2013;5:176ra32. [<u>Artículo gratuito</u> <u>pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- Braun J., Loyal L., Frentsch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., Hippenstiel S., Dingeldey M., Kruse B., Fauchere F. Sars-Cov-2-Reactive T Cells en Donantes Sanos y Pacientes con Covid-19. *La naturaleza*. Doi 2020: 10.1038/s41586-020-2598-9. [PubMed] [CrossRef] [GoogleScholar]
- Carrasco Pro S., Sidney J., Paul S., Lindestam Arlehamn C., Weiskopf D., Peters B., Sette A. Generación automática de conjuntos de epítopos específicos validados. *J Inmunol Res.* 2015;2015:763461. [<u>Artículo gratuito</u> <u>pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>

- 10. Cheroutre H., Husain M.M. CD4 CTL: a la altura del desafío. *Semin Immunol.* 2013;25:273–281. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Conway J.R., Lex A., Gehlenborg N. UpSetR: un paquete R para la visualización de conjuntos intersecantes y sus propiedades. *Bioinformática*. 2017;33:2938–2940. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 12. Dan J.M., Havenar-Daughton C., Kendric K., Al-Kolla R., Kaushik K., Rosales S.L., Anderson E.L., Larock C.N., Vijayanand P., Seumois G. Recurrent Group A Streptococcus Tonsillitis es una enfermedad de inmunosusceptibilidad que involucra deficiencia de anticuerpos y células tfh aberrantes. *Sci Transl Med.* 2019;11:Eaau3776. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Dhanda S.K., Vaughan K., Schulten V., Grifoni A., Weiskopf D., Sidney J., Peters B., Sette A. Desarrollo de una nueva herramienta de agrupación en clústeres para secuencias de péptidos lineales. *Inmunología*. 2018;155:331– 345. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed]</u>[Google<u>Scholar]</u>
- Dhanda S.K., Mahajan S., Paul S., Yan Z., Kim H., Jespersen M.C., Jurtz V., Andreatta M., Greenbaum J.A., Marcatili P. IEDB-AR: recurso de análisis de bases de datos de epítopos inmunes en 2019. *Ácidos nucleicos Res.* 2019;47(W1):W502–W506. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- Eschweiler S., Clarke J., Ramírez Suastegui C., Panwar B., Madrigal A., Chee S., Karydis I., Woo E., Alzetani A., Elsheikh S. T Fr Cells Inhiben la inmunidad antitumoral y responden al bloqueo del punto de control inmune. *Ssrn.* 2020 doi: 10.2139/Ssrn.3596586. [CrossRef] [GoogleScholar]
- 16. Finak G., McDavid A., Yajima M., Deng J., Gersuk V., Shalek A.K., Slichter C.K., Miller H.W., McElrath M.J., Prlic M. MAST: un marco estadístico flexible para evaluar los cambios transcripcionales y caracterizar la heterogeneidad en los datos de secuenciación de ARN de una sola célula. *Biol genoma*. 2015;16:278. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 17. Grifoni A., Weiskopf D., Ramírez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi Targets of T Cell Responses to Sars-Cov-2 Coronavirus in Humans with Covid-19 Disease y Unexposed Individuals. *La celda*. 2020;181:1489–1501.e15. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Huang C.Y., Lin Y.C., Hsiao W.Y., Liao F.H., Huang P.Y., Tan T.H. DUSP4 deficiencia mejora la expresión CD25 y CD4 + proliferación de células T sin obstaculizar el desarrollo de células T. *Eur J Immunol.* 2012;42:476– 488. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- 19. Hughes C.E., Nibbs R.J.B. Una guía para las quimioquinas y sus receptores. *FEBS J.* 2018;285:2944-2971. [<u>Artículo gratuito</u> pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 20. Jiang X., Björkström N.K., Melum E. Interacción CD100-CD72 intacta necesaria para la proliferación de células T inducida por TCR. *Inmunol frontal.* 2017;8:765. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 21. Juno J.A., van Bockel D., Kent S.J., Kelleher A.D., Zaunders J.J., Munier C.M. Cytotoxic CD4 T Cells-Friend or Foe durante la infección viral? *Inmunol frontal.* 2017;8:19. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]

- 22. Kaneko N., Kuo H.-H., Boucau J., Farmer J.R., Allard-Chamard H., Mahajan V.S., Piechocka-Trocha A., Lefteri K., Osborn M., Bals J. La pérdida de Bcl-6 expresando células auxiliares foliculares T y la ausencia de centros germinales en Covid-19. *La celda.* 2020;183:143–157. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Korotkevich G., Sukhov V., Sergushichev A. Análisis rápido de enriquecimiento del conjunto genético. *BioRxiv.* doi 2019: 10.1101/060012. [CrossRef] [GoogleScholar]
- 24. Koutsakos M., Wheatley A.K., Loh L., Clemens E.B., Sant S., Nussing S., Fox A., Chung A.W., Laurie K.L., Hurt et al Circulating Tfh Cells, Serological Memory y Tissue Compartmentalization Shape Human Influenza-Specific B Cell Immunity. *Sci Transl Med.* 2018;10:Eaan8405. [PubMed] [GoogleScholar]
- Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, y controles no infectados. *La naturaleza*. 2020;584:457–462. [PubMed] [GoogleScholar]
- 26. Lei Y., Takahama Y. XCL1 y XCR1 en el sistema inmunitario. *Infectan microbios.* 2012;14:262–267. [PubMed] [GoogleScholar]
- Li H., Van Der Leun A.M., Yofe I., Lubling Y., Gelbard-Solodkin D., Van Akkooi A.C.J., Van Den Braber M., Rozeman E.A., Haanen J., Blank C.U. Dysfunctional Cd8 T Cells Forman un compartimento proliferante y dinámicamente regulado dentro del melanoma humano. *La celda.* 2019;176:775–789.e18. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- Locci M., Havenar-Daughton C., Landais E., Wu J., Kroenke M.A., Arlehamn C.L., Su L.F., Cubas R., Davis M.M., Sette A., International AIDS Vaccine Initiative Protocol C Principal Investigators Human circulating PD-1+CXCR3-CXCR5+ memory Tfh cells son altamente funcionales y neutralizan con respuestas ampliamente anticuerpos contra el VIH. *Inmunidad*. 2013;39:758–769. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Ma W.T., Yao X.T., Peng Q., Chen D.K. Las funciones protectoras y patógenas de la IL-17 en infecciones virales: ¿amigo o enemigo? *Abre Biol.* 2019;9:190109. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- Meckiff B.J., Ladell K., McLaren J.E., Ryan G.B., Leese A.M., James E.A., Price D.A., Long H.M. Infección primaria por EBV induce una onda aguda de células citotóxicas citotóxicas específicas de antígeno<sup>activados.</sup> *J Immunol.* 2019;203:1276–1287. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 31. O'Neill R.E., Du W., Mohammadpour H., Alqassim E., Qiu J., Chen G., McCarthy P.L., Lee K.P., Cao X. T Derivado de células CD70 ofrece una función de punto de control inmune en respuestas inflamatorias de células T. J Immunol. 2017;199:3700–3710. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 32. Omilusik K.D., Best J.A., Yu B., Goossens S., Weidemann A., Nguyen J.V., Seuntjens E., Stryjewska A., Zweier C., Roychoudhuri R. El represor transcripcional ZEB2 promueve la diferenciación terminal de las poblaciones

de células T de memoria y efector CD8+ durante la infección. *J Exp Med.* 2015;212:2027–2039. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]

- Patil V.S., Madrigal A., Schmiedel B.J., Clarke J., O'rourke P., De Silva A.D., Harris E., Peters B., Seumois G., Weiskopf D., Sette A., Vijayanand P. Precursores de Linfocitos T citotóxicos humanos cd4(+) identificados por el análisis de transcriptomas unicelulares. *Inmunol sci.* 2018;3:Eaan8664. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 34. Paul S., Lindestam Arlehamn C.S., Scriba T.J., Dillon M.B., Oseroff C., Hinz D., McKinney D.M., Carrasco Pro S., Sidney J., Peters B., Sette A. Desarrollo y validación de un amplio esquema para la predicción de epítopos celulares T restringidos clase II de HLA. *Métodos de inmunodemundo J.* 2015;422:28– 34. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 35. Paul S., Sidney J., Sette A., Peters B. Tepitool: Una tubería para la predicción computacional de los candidatos a epitopos de células T. *Inmunol Curr Protoc.* 2016;114:18.19.1–18.19.24. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 36. Piazza F., Costoya J.A., Merghoub T., Hobbs R.M., Pandolfi P.P. Interrupción del PLZP en ratones conduce a una mayor proliferación de linfocitos T, producción de citoquinas y homeostasis alterada de células madre hematopoyéticas. *Biol de células ardientes.* 2004;24:10456–10469. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 37. Rudensky A.Y. Células T reguladoras y Foxp3. *Inmunol Rev.* 2011;241:260–268. [<u>Artículo gratuito pmc</u>][PubMed][GoogleScholar]
- Sallusto F. Heterogeneidad de células T CD4(+) humanas contra microbios. Annu Rev Immunol. 2016;34:317–334. [PubMed] [GoogleScholar]
- Schmiedel B.J., Singh D., Madrigal A., Valdovino-Gonzalez A.G., White B.M., Zapardiel-Gonzalo J., Ha B., Altay G., Greenbaum J.A., Mcvicker G., Seumois G., Rao A., Kronenberg M., Peters B., Vijayan y P. Impacto de polimorfismos genéticos en la expresión genética de células inmunes humanas. *La celda*. 2018;175:1701–1715.e16. [<u>Artículo gratuito pmc</u>][<u>PubMed</u>][Google<u>Scholar</u>]
- Seder R.A., Darrah P.A., Roederer M. Calidad de células T en memoria y protección: implicaciones para el diseño de la vacuna. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:247–258. [PubMed] [GoogleScholar]
- Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.-B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic o Mild Covid-19. *La celda*. 2020;183:158–168.e14. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 42. Shin H.M., Kapoor V.N., Kim G., Li P., Kim H.R., Suresh M., Kaech S.M., Wherry E.J., Selin L.K., Leonard W.J. Expresión transitoria de ZBTB32 en células T CD8+ antivirales limita la magnitud de la respuesta del efector y la generación de memoria. *PLoS Pathog.* 2017;13:e1006544. [<u>Artículo gratuito</u> <u>pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- 43. Smits M., Zoldan K., Ishaque N., Gu Z., Jechow K., Wieland D., Conrad C., Eils R., Fauvelle C., Baumert T.F. Follicular T helper cells dan forma al repertorio

de células T CD4+ específico del VHC después de la eliminación del virus. *J Clin Invest.* 2020;130:998–1009. [<u>Artículo gratuito</u> pmc][PubMed][Google<u>Scholar]</u>

- 44. Somerville T.D.D., Xu Y., Wu X.S., Maia-Silva D., Hur S.K., de Almeida L.M.N., Preall J.B., Koo P.K., Vakoc C.R. ZBED2 es antagonista del factor regulador de interferón 1 y modifica la identidad celular en el cáncer de páncreas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117:11471–11482. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 45. Stuart T., Butler A., Hoffman P., Hafemeister C., Papalexi E., Mauck W.M., 3º, Hao Y., Stoeckius M., Smibert P., Satija R. Integración Integral de Datos unicelulares. *La celda*. 2019;177:1888–1902 E21. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 46. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. La trinidad del COVID-19: inmunidad, inflamación e intervención. *Nat Rev Immunol.* 2020;20:363– 374. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- 47. Thevarajan I., Nguyen T.H.O., Koutsakos M., Druce J., Caly L., van de Sandt C.E., Jia X., Nicholson S., Catton M., Cowie B. Amplitud de respuestas inmunes concomitantes antes de la recuperación del paciente: un informe de casos de COVID-19 no grave. *Nat Med.* 2020;26:453–455. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- Thieme C., Anft M., Paniskaki K., Blázquez Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Brenner T., Tempfer C. La inmunidad a las células T Sars-Cov-2 se dirige contra la proteína de espiga, membrana y nucleocapsidos y se asocia con la gravedad de Covid 19. *Ssrn.* 2020 doi: 10.2139/Ssrn.3606763. [CrossRef] [GoogleScholar]
- Thommen D.S., Schumacher T.N. Disfunción celular en el cáncer. Célula cancerosa. 2018;33:547–562. [<u>Artículo gratuito</u> pmc][<u>PubMed</u>][Google<u>Scholar</u>]
- 50. Trapnell C., Cacchiarelli D., Grimsby J., Pokharel P., Li S., Morse M., Lennon N.J., Livak K.J., Mikkelsen T.S., Rinn J.L. La dinámica y los reguladores de las decisiones sobre el destino celular se revelan mediante el orden pseudotemporal de células individuales. *Nat Biotechnol.* 2014;32:381–386. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 51. Vabret N., Britton G.J., Gruber C., Hegde S., Kim J., Kuksin M., Levantovsky R., Malle L., Moreira A., Park M.D., Proyecto de Revisión de Inmunología del Sinaí Inmunología del COVID-19: Estado actual de la Ciencia. *Inmunidad*. 2020;52:910–941. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 52. Wang X., Chan C.C., Yang M., Deng J., Poon V.K., Leung V.H., Ko K.H., Zhou J., Yuen K.Y., Zheng B.J., Lu L. Un papel crítico de il-17 en la modulación de la respuesta de células B durante la infección por el virus de la gripe H5N1. *Inmunol de mol celular*. 2011;8:462–468. [<u>Artículo gratuito</u> <u>pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>
- 53. Wang X., Sumida H., Cyster J.G. GPR18 es necesario para un compartimento normal de linfocitos intraepitheliales intestinales CD8ααα. *J Exp Med.* 2014;211:2351–2359. [<u>Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>

- 54. Weiskopf D., Bangs D.J., Sidney J., Kolla R.V., De Silva A.D., de Silva A.M., Crotty S., Peters B., Sette A. Infección por el virus del dengue provoca células T CX3CR1+ citotóxicas altamente polarizadas asociadas con inmunidad protectora. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:E4256– E4263. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 55. Weiskopf D., Cerpas C., Angelo M.A., Bangs D.J., Sidney J., Paul S., Peters B., Sanches F.P., Silvera C.G., Costa P.R. Human CD8+ T-Cell Responses Against the 4 Dengue Virus Serotypes están asociados con patrones distintos de dianas proteicas. *J Infect Dis.* 2015;212:1743–1751. [Artículo gratuito pmc][PubMed][GoogleScholar]
- 56. Xie M.M., Fang S., Chen Q., Liu H., Wan J., Dent A.L. Las células T foliculares reguladoras inhiben el desarrollo de células T foliculares que expresan granzima B. JCI Insight. 2019;4:E128076. [<u>Artículo gratuito</u> <u>pmc][PubMed][GoogleScholar]</u>