













SOURCE
DATATRANSPARENT
PROCESSOPEN
ACCESSCHECK FOR
UPDATES

Persistentes epigenetisches Gedächtnis der SARS-CoV-2-mRNA-Impfung in aus Monozyten stammenden Makrophagen

Alexander Simonis ^{1,2,3,16}, Sebastian J Theobald^{1,2,3,16}, Anna E Koch ², Ram Mummadavarapu ⁴, Julie M Mudler ^{1,2}, Andromachi Pouikli⁴, Ulrike Göbels⁵, Richard Acton ^{5,6}, Sandra Winter^{1,2}, Alexandra Albus^{1,2}, Dmitriy Holzmann^{1,2}, Marie-Christine Albert^{5,7}, Michael Hallek^{1,2}, Henning Walczak ^{5,7,8}, Thomas Ulas^{9,10,11}, Manuel Koch ^{7,12}, Peter Tessari ^{4,5,13}, Robert Hänsel-Hertsch ^{2,5,14,15,16}  und Jan Rybniker ^{1,2,3,16} 

Abstrakt

Das Immungedächtnis spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung dauerhafter antimikrobieller Immunantworten. Wie genau mRNA-Impfstoffe angeborene Immunzellen trainieren, um schützende Abwehrmechanismen des Wirtes zu entwickeln, ist noch unbekannt. Hier zeigen wir, dass die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung die Histon-H3-Lysin-27-Acetylierung (H3K27ac) an Promotoren menschlicher, aus Monozyten stammender Makrophagen signifikant etabliert, was auf ein epigenetisches Gedächtnis hindeutet. Wir fanden jedoch heraus, dass zwei aufeinanderfolgende Impfungen für die Persistenz von H3K27ac erforderlich waren, was mit proinflammatorischen, angeborenen immunassoziierten transkriptionellen Veränderungen und antigenvermittelter Zytokinsekretion übereinstimmte. H3K27ac in Promotorregionen blieb sechs Monate lang erhalten, und eine einzige mRNA-Auffrischimpfung stellte deren Spiegel und die Freisetzung von Makrophagen-abgeleiteten Zytokinen wirksam wieder her. Interessanterweise stellten wir fest, dass H3K27ac an Promotoren in Makrophagen-abgeleiteten, nukleosomarmen Regionen mit Sequenzen angereichert ist, die die Sekundärstruktur von G-Quadruplex-DNA bilden. Dies verknüpft das epigenetische Gedächtnis mit der Nukleinsäurestruktur. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass mRNA-Impfstoffe ein hochdynamisches und anhaltendes Training angeborener Immunzellen induzieren, das eine anhaltende proinflammatorische Immunantwort ermöglicht.

Schlüsselwörter Epigenetisches Gedächtnis; trainierte angeborene Immunität; SARS-CoV-2 mRNA-Impfung; H3K27ac; G-Quadruplex

Themenkategorien Chromatin, Transkription und Genomik; Immunologie;

Mikrobiologie, Virologie und Wirt-Pathogen-Interaktion

<https://doi.org/10.1038/s44320-025-00093-6> Empfangen am

15. Juni 2023; Überarbeitet am 10. Februar 2025; Akzeptiert

am 24. Februar 2025

Published online: 25 March 2025

Einführung

SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffe waren für die Eindämmung der Coronavirus-Pandemie 2019 (COVID-19) von entscheidender Bedeutung (Baden et al., 2021; Polack et al., 2020; Yang et al., 2023). Wie genau diese neuartigen Impfstoffkonstrukte, die die mRNA-abhängige Expression des SARS-CoV-2-Spike-Proteins (SP) steuern, verschiedene Schichten des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktivieren, ist noch nicht vollständig verstanden (Verbeke et al., 2022). Es gibt starke Hinweise darauf, dass pathogenspezifische Immunantworten eine dauerhafte Aktivierung angeborener Immunzellen wie Makrophagen oder dendritischer Zellen über Adjuvantien und pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP) erfordern. Qualität, Quantität und Ausmaß der Aktivierung angeborener Immunzellen bestimmen die langlebigen Gedächtnisreaktionen adaptiver Immunzellen wie B- und T-Zellen (Fitzgerald und Kagan, 2020; Iwasaki und Medzhitov, 2010; Sonnenberg und Hepworth, 2019).

Kürzlich konnten wir zeigen, dass sowohl eine SARS-CoV-2-Infektion als auch eine mRNA-Impfung menschliche, aus Monozyten stammende Makrophagen nach einer erneuten Stimulation mit dem SARS-CoV-2 SP *ex vivo* zur starken Sekretion proinflammatorischer Zytokine anregen (Theobald et al., 2021; Theobald et al., 2022). In unseren Studien konzentrierten wir uns auf das Schlüsselzytokin Interleukin-1 β (IL-1 β), das wir mithilfe autologer Kokultorexperimente mit der Makrophagen-gesteuerten Aktivierung von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in Verbindung brachten (Theobald et al., 2022). Die Sekretion von IL-1 β hängt von der Aktivierung des hochregulierten NOD-, LRR- und Pyrin-Domänen-haltigen Proteins 3 (NLRP3)-Inflammasoms in Makrophagen ab (Swanson et al., 2019). Sowohl bei Impfstoffen als auch bei natürlichen Infektionen spielen das vom Inflammasom stammende IL-1 β und die damit verbundenen Rezeptoren eine Schlüsselrolle bei der Übertragung stimulierender Signale zwischen angeborenen und adaptiven Immunzellen (Tahtinen et al., 2022; Van Den Eeckhout et al., 2020). Überraschenderweise fanden wir SP-abhängige

¹Klinik I für Innere Medizin, Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Köln, Universität zu Köln, 50937 Köln, Deutschland. ²Zentrum für Molekulare Medizin Köln (CMCC), Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Köln, Universität zu Köln, 50931 Köln, Deutschland. ³Deutsches Zentrum für Infektionsforschung (DZIF), Standort Bonn-Köln, Köln, Deutschland. ⁴Max-Planck-Forschungsgruppe „Chromatin und Altern“, Max-Planck-Institut für Biologie des Alterns, Joseph-Stelzmann-Str. 9b, 50931 Köln, Deutschland. ⁵Exzellenzcluster für zelluläre Stressreaktionen bei altersbedingten Erkrankungen (CECAD), Universität zu Köln, Köln, Deutschland. ⁶Abraham Institute, Cambridge, Großbritannien. ⁷Institut für Biochemie I, Medizinische Fakultät, Universitätsklinikum Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland. ⁸Zentrum für Zelltod, Krebs und Entzündung, UCL Cancer Institute, University College London, London, Vereinigtes Königreich. ⁹Systemmedizin, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), Universität Bonn, Bonn, Deutschland. ¹⁰PRECISE-Plattform für Einzelzellgenomik und Epigenomik, DZNE, Universität Bonn, Bonn und Westdeutsches Genomzentrum, Bonn, Deutschland. ¹¹Genomik und Immunregulation, Life & Medical Sciences (LIMES) Institut, Universität Bonn, Bonn, Deutschland. ¹²Institut für Zahnmedizinische Forschung und orale Muskuloskeletale Biologie, Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Zentrale Einrichtungen), Medizinische Fakultät und Universität zu Köln, Köln, Deutschland. ¹³Abteilung für Humanbiologie, Radboud-Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fakultät für Naturwissenschaften, Radboud-Universität, Nijmegen, Niederlande. ¹⁴Abteilung für Translationale Genomik, Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Köln, Universität zu Köln, Köln, Deutschland. ¹⁵Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Köln, Köln, Deutschland. ¹⁶Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen: Alexander Simonis, Sebastian J Theobald, Robert Hänsel-Hertsch, Jan Rybniker.  E-Mail: robert.haensel-hertsch@uni-koeln.de; jan.rybniker@uk-koeln.de

Die Reifung von IL-1 β war hochselektiv, wobei in stimulierten Makrophagen von nicht geimpften oder nicht mit SARS-CoV-2 infizierten Personen kein oder nur sehr wenig IL-1 β sezerniert wurde. Darüber hinaus könnte die impfinduzierte Makrophagen-Priming durch wiederholte Antigenexposition nach der zweiten SARS-CoV-2-mRNA-Impfung verstärkt werden (Theobald et al.,2022). Nach einem vorübergehenden Rückgang der Makrophagenreaktion beobachteten wir nach der dritten (zweiten Auffrischungs-)Impfung, die nach sechs Monaten verabreicht wurde, eine starke Sekretion von IL-1 β aus Makrophagen. Folglich deuten die Daten darauf hin, dass aus Monozyten stammende Makrophagen nach der SARS-CoV-2-mRNA-Impfung mehrere Monate lang dauerhafte Veränderungen aufweisen, obwohl zirkulierende Monozyten typischerweise eine Lebensdauer von nicht mehr als sieben Tagen haben (Whitelaw,1966). Jüngste Studien, hauptsächlich an Mäusen, zeigten, dass angeborene Immunzellen nach Kontakt mit pathogenen Antigenen ein langlebiges epigenetisches Gedächtnis bewahren, das schnelle und wirksame Reaktionen auf nachfolgende Herausforderungen ermöglicht. Dieses angeborene Immungedächtnis, auch als trainierte angeborene Immunität bezeichnet, wurde mit langlebigen Chromatinmodifikationen in hämatopoetischen Vorläuferzellen in Verbindung gebracht. Diese dienen als epigenetische Markierungen, die es reifen angeborenen Immunzellen ermöglichen, ihr Transkriptionsprofil als Reaktion auf pathogene Antigene schnell anzupassen (Netea et al.,2016).

Bemerkenswerterweise geht die epigenetische Umgestaltung über Chromatinmodifikationen hinaus und wurde auch mit alternativen DNA-Sekundärstrukturen in Verbindung gebracht. Menschliche DNA kann G-Quadruplex-Strukturen (G4) in repetitiven Elementen wie Telomeren sowie in nukleosomarmen Regionen, insbesondere bei hochtranskribierten Genen, annehmen (Biffi et al.,2013; Hansel-Hertsch et al.2016; Hansel-Hertsch et al.2020). G4-DNA wird mit epigenetischer Umgestaltung und der Regulierung angeborener Immunantworten in Verbindung gebracht (Guilbaud et al.,2017; Makowski et al.,2018; Miglietta et al.,2021).

Epigenetische Veränderungen wurden nach Impfungen mit Bacillus Calmette-Guérin (BCG) beobachtet, einem Lebendimpfstoff aus *Mycobacterium bovis*. Der Impfstoff wird hauptsächlich zur Tuberkuloseprävention eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass dieser Impfstoff epigenetische Veränderungen hervorruft und das angeborene Immungedächtnis verbessert (Sun et al., 2024). Es wird angenommen, dass diese Gedächtnisreaktion auch Schutz vor nicht damit verbundenen Infektionskrankheiten bietet (Kaufmann et al., 2018; Kleinnijenhuis et al.,2012). Ähnliche Beispiele wurden für andere Lebendimpfstoffe wie das Vacciniavirus oder den Grippeimpfstoff angeführt (Sanchez-Ramon et al.,2018). Ob inaktivierte Impfstoffe oder mRNA-basierte Impfstoffe, die zukünftige Impfstrategien revolutionieren sollen, zu langfristigen Veränderungen der angeborenen Immunzellen mit entsprechenden epigenetischen Veränderungen führen, ist unbekannt. Hier zeigen wir, dass SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffe anhaltende epigenetische und transkriptomische Veränderungen in aus Monozyten stammenden Makrophagen induzieren, die zu einer erhöhten Reaktivität gegenüber einer Reihe von SARS-CoV-2-verwandten und nicht-verwandten PAMPs führen.

Ergebnisse

Zwei SARS-CoV-2-mRNA-Impfungen sind erforderlich, um eine breite proinflammatorische Immunantwort in Makrophagen auszulösen

In früheren Studien konnten wir zeigen, dass die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung und die SARS-CoV-2-Infektion zu signifikanten Veränderungen in Monozyten und aus Monozyten stammenden Makrophagen führen können, die über die

typische Lebensdauer der Zellen (Theobald et al.,2021; Theobald et al.,2022). Diese phänotypischen Studien beruhten hauptsächlich auf der Restimulation von Makrophagen mit dem affinitätsgereinigten SARS-CoV-2-Spike-Protein (SP) ex vivo. Um im Detail zu untersuchen, ob die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung eine umfassende und unspezifische Reprogrammierung von aus Monozyten stammenden Makrophagen induziert, die ein Schlüsselmerkmal des angeborenen Immungedächtnisses ist, führten wir umfangreiche Restimulationstests mit verschiedenen PAMPs und gefahrassozierten molekularen Mustern (DAMP) durch, die auf mehrere Mustererkennungsrezeptoren abzielen (Abb.,1A,B). Anhand unserer großen Längsschnittkohorte von SARS-CoV-2-mRNA-geimpften Personen untersuchten wir zunächst das Ausmaß der IL-1 β -Sekretion in Makrophagen, die mit einzelsträngiger RNA (ssRNA) (Toll-like-Rezeptor (TLR) 7 und TLR8-Agonist), Zymosan (TLR2- und Dectin-1-Agonist) und Pam3CSK4 (TLR2/TLR1-Agonist) inkubiert wurden (Datensatz EV1). Durch Stimulation von aus Monozyten stammenden Makrophagen geimpfter Personen vor der Impfung (t0), 2 Wochen nach der ersten (t1) und zweiten (t2) Impfung sowie 10 Wochen nach der zweiten Impfung (t3) beobachteten wir einen Anstieg des sekretierten IL-1 β im Vergleich zu t0 (Abb.1C-E). Bemerkenswerterweise wurden für alle verwendeten Rezeptorliganden statistisch signifikante IL-1 β -Spiegel erst zwei Wochen nach der zweiten Impfung (t2) beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass für eine substanzielle Aktivierung und Reprogrammierung der Makrophagen ein Prime-Boost-Schema erforderlich ist. Bei mit ssRNA stimulierten Zellen blieb die Reaktivität bis zu zehn Wochen nach der zweiten Impfung erhalten (Abb.,1C).

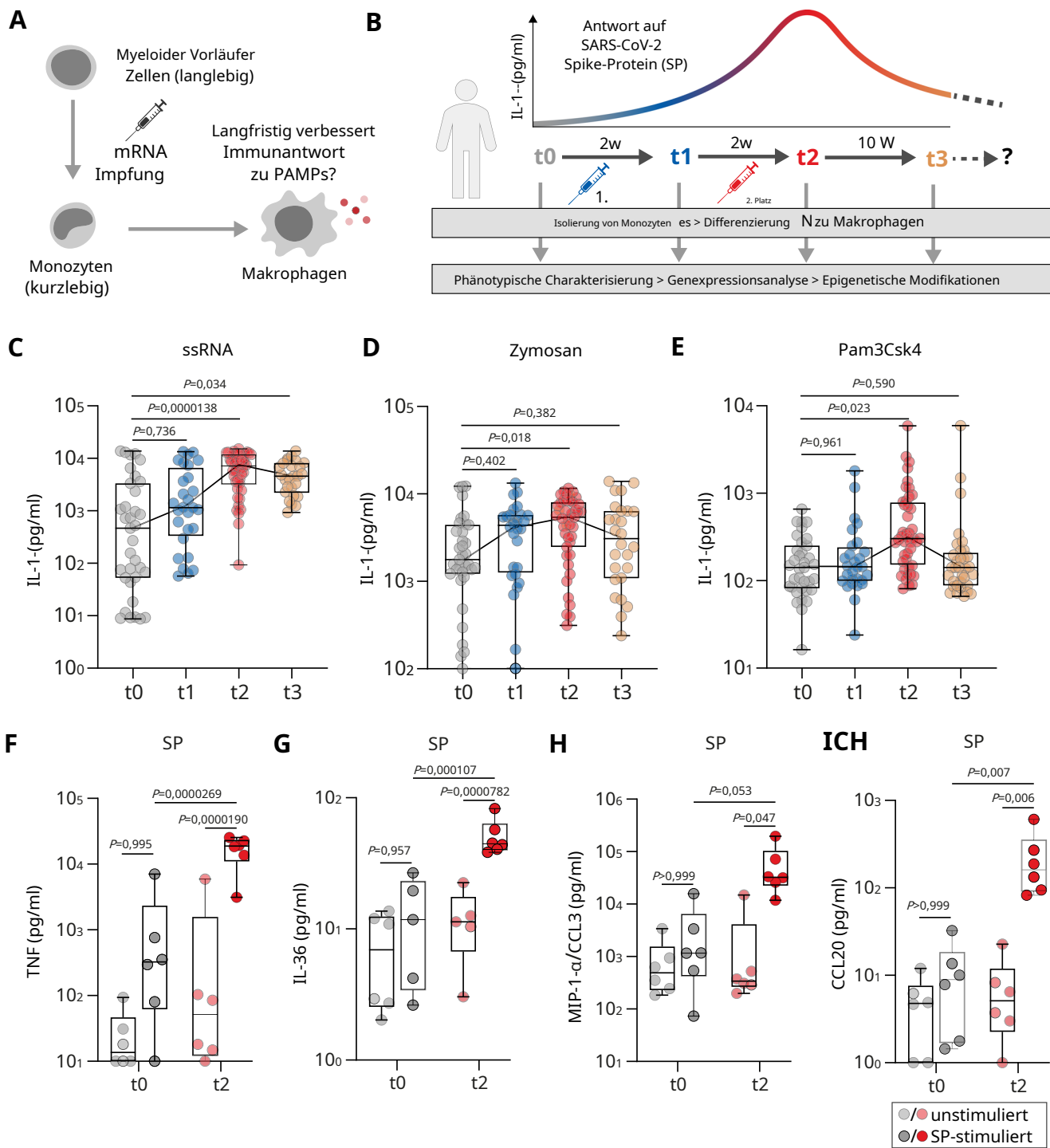
Die durch die verschiedenen Rezeptorliganden, die für die Ex-vivo-Stimulation verwendet wurden, induzierte IL-1 β -Sekretion ist mit der Aktivierung von Inflammasomen und Pyroptose verbunden, einer stark entzündungsfördernden Form des programmierten Zelltods, die durch Membranruptur gekennzeichnet ist (Man et al.,2017). Um zu bestätigen, dass in aus Monozyten stammenden Makrophagen geimpfter Personen zusätzliche entzündungsfördernde Signalwege aktiviert werden, führten wir Multiplex-Zytokinanalysen an SP-stimulierten Makrophagen durch. Dabei zeigte sich, dass mehrere Zytokine und Chemokine (TNF- α , IL-36, CCL3, CCL20, CCL4, CXCL1) in den Überständen der Makrophagen zum Zeitpunkt t2 im Vergleich zu den aus ungeimpften Personen isolierten Zellen signifikant erhöht waren (Abb.1F-I und EV1A,B). Andere Analyten wie CCL7, CXCL13 und CXCL10 wurden durch die SP-Stimulation in Makrophagen zu t0 und t2 nicht beeinflusst (Abb. EV1C-E).

Um die essentielle Rolle des nukleären Hauptregulators „kappa-light-chain-enhancer“ aktivierter B-Zellen (NF- κ B) bei der Zytokinsekretion stimulierter Makrophagen zu demonstrieren, behandelten wir T2-Makrophagen mit KINK-1 (einem Kinaseinhibitor von NF- κ B) und quantifizierten IL-1 β in den Zellüberständen. MCC950, ein selektiver NLRP3-Inflammasominhibitor, diente als Kontrollsubstanz. Beide Inhibitoren verhinderten die IL-1 β -Sekretion als Reaktion auf alle drei Rezeptoragonisten signifikant (Abb. EV1F-H).

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung die Reaktionsfähigkeit in vivo geprimter Makrophagen auf verschiedene immunologische Auslöser erhöht, was durch NF- κ B und Inflammasom-Signale vermittelt wird. In unserer Kohorte waren zwei Impfungen erforderlich, um signifikante Mengen an Zytokinen in stimulierten Zellen freizusetzen. Dies deutet darauf hin, dass die erste Priming-Impfung in aus Monozyten stammenden Makrophagen eine Gedächtnisreaktion auslöst.

Zytokinreaktionen stimmen mit globalen transkriptomischen Veränderungen in aus Monozyten stammenden Makrophagen geimpfter Personen überein

Fasziniert von unserer Beobachtung, dass die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung die Zytokinreaktion auf verschiedene PAMPs allgemein verstärkt,



fürten RNA-Sequenzanalysen von SP-stimulierten und unstimulierten Monozyten-abgeleiteten Makrophagen zu t0 und t2 durch, um den Einfluss der Impfung auf genomweiter Transkriptionsebene umfassend zu quantifizieren. Dabei beobachteten wir erhebliche Unterschiede in den Genexpressionsmustern zwischen den verschiedenen Gruppen. Die SP-Stimulation von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen ungeimpfter Personen (t0) induzierte im Vergleich zu unstimulierten t0-Zellen nur moderate Veränderungen der Genexpression (Abb. 2A; Datensatz EV2). Im Gegensatz dazu führte die SP-Stimulation von Zellen, die bei t2 isoliert wurden, zu einer enormen

Verschiebung des Transkriptom, was auf einen Priming-Effekt der Impfung auf die nachfolgende Genexpression nach SP-Stimulation hindeutet (Abb.2B; Datensatz EV3). Beim Vergleich des Transkriptom der SP-stimulierten Zellen beider Gruppen (ungeimpft versus geimpft) waren die beiden Gruppen anhand ihrer Genexpressionsprofile klar unterscheidbar (Abb.2C). Die Analyse der Genexpression in Makrophagen nach SP-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen ergab 2519 Gene, die differentiell exprimiert wurden (definiert durch eine log₂-fache Veränderung von ±1 und eine angepasste P-Wert < 0,05) ausschließlich in

Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:66a3:220e:8372.

Abbildung 1. Zytokinfreisetzung in Makrophagen nach SARS-CoV-2-mRNA-Impfung.

(A) Grafische Darstellung der Arbeitshypothese. (B) Studiendesign: Blutproben gesunder Spender wurden longitudinal zur Monozytenisolation gesammelt, anschließend durch Kultivierung mit M-CSF zu Makrophagen differenziert und für nachfolgende Anwendungen, einschließlich Ex-vivo-Stimulationsexperimenten, RNA-Sequenz- und CUT&RUN-Analysen, verwendet. Die Proben wurden vor (t0) und zwei Wochen nach der ersten Impfung (t1) sowie zwei Wochen nach der zweiten Impfung (t2) gesammelt, die vier Wochen nach der ersten Impfung und zehn Wochen nach der zweiten Impfung (t3) verabreicht wurde. Die obere Grafik veranschaulicht die IL-1 β -Sekretion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation mit dem SARS-CoV-2-Spike-Protein (SP), wie in früheren Studien gezeigt. (C) Monozyten wurden durch CD14 isoliert-Selektion aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs). Die Zellen wurden ausgesät und 5 Tage lang in Gegenwart von M-CSF inkubiert. Differenzierte Makrophagen wurden mit ssRNA stimuliert (t0: n=35, t1: n=28; t2: n=42; t3: n=26), Zyosan (t0: n=35, t1: n=28; t2: n=43; t3: n=26) (D) oder Pam3Csk4 (t0: n=35, t1: n=28; t2: n=44; t3: n=33) (E) für 4 Stunden. Die IL-1 β -Sekretion wurde mittels ELISA quantifiziert. Für die statistische Analyse wurde eine einfaktorische ANOVA mit Dunnetts multiplem Vergleichstest verwendet, der t1-t3 mit t0 verglich. (F) Es wurden aus Monozyten stammende Makrophagen von ungeimpften (t0) (grau) und geimpften Personen (t2) (rot) erzeugt und mit SP stimuliert (t0: dunkelgraue Punkte; t2: dunkelrote Punkte) oder unstimuliert gelassen (t0: hellgraue Punkte; t2: hellrote Punkte), wie in (C) beschrieben. (G) Konzentrationen von TNF, IL-36 (G), MIP-1 α (CCL3) (H), und CCL20 (ICH), wurden mittels Multiplexanalysen gemessen. Für die statistische Analyse wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit Sidak-Multiple-Vergleichsanalyse verwendet. Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren den technischen Mittelwert eines unabhängigen Experiments. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Quelldaten für diese Abbildung sind online verfügbar.

Makrophagen von geimpften Personen. Darüber hinaus waren 268 differentiell exprimierte Gene (DEGs) in beiden Gruppen vorhanden, während nur 50 DEGs spezifisch für Makrophagen von ungeimpften Personen waren (Abb. 2D).

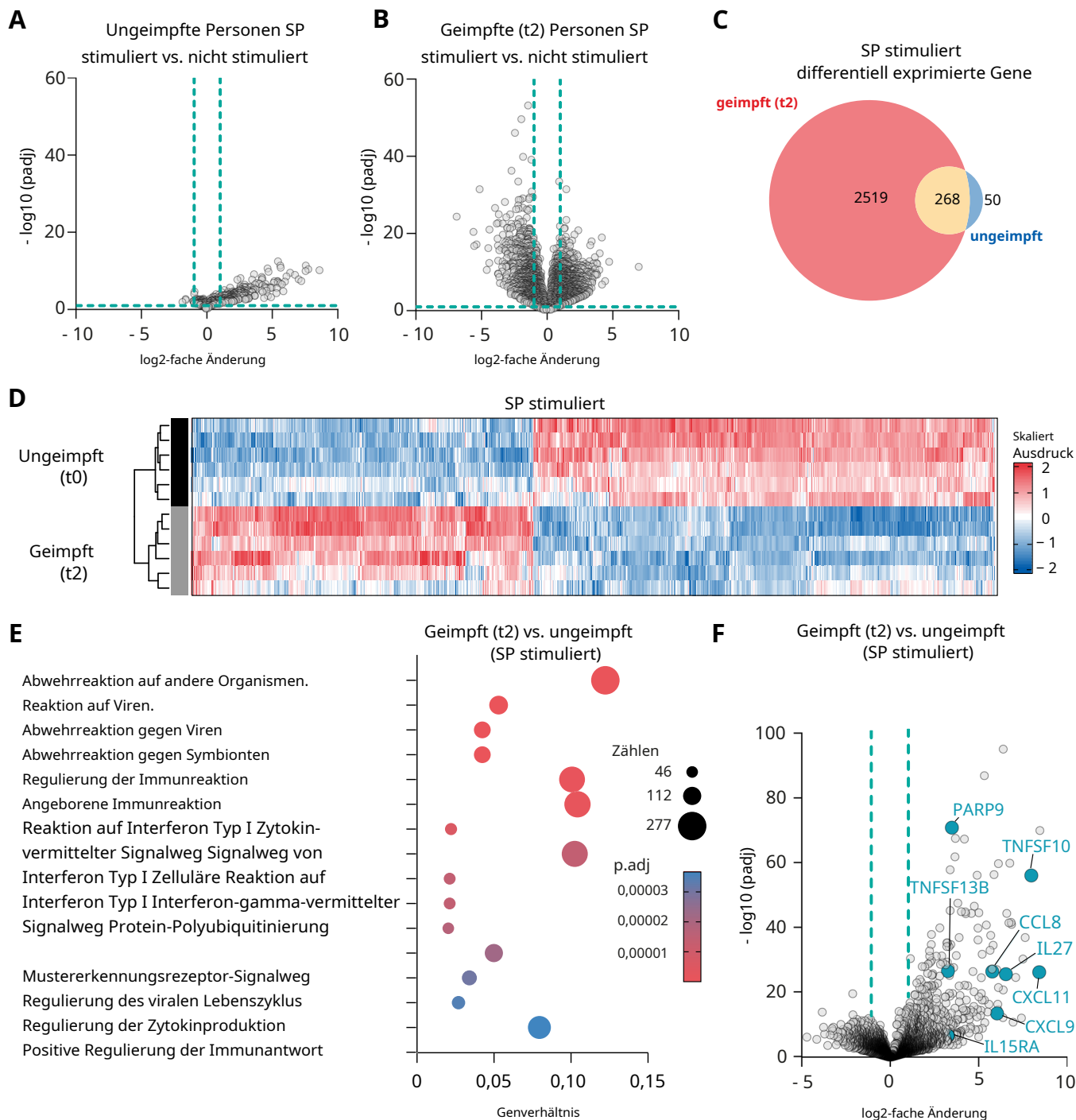
Darüber hinaus ergaben Genanreicherungsanalysen eine starke Hochregulierung von Genen, die mit der angeborenen Immunantwort, der Zytokinsignalisierung und der Abwehrreaktion auf Viren in Makrophagen von geimpften Personen, die zum Zeitpunkt t2 mit SP stimuliert wurden, im Vergleich zu denen von ungeimpften Personen verbunden sind (Abb. 2E, F; Datensätze EV4 und EV5). Diese Beobachtungen stützen unsere Hypothese weiter, dass die mRNA-Impfung einen Priming-Effekt induziert, der die transkriptionelle Reaktivität bei Exposition gegenüber pathogenassoziierten Reizen ex vivo erhöht.

Impfung instruiert einen anhaltenden H3K27ac-Spiegel im Genpromotor

Epigenomische Veränderungen kurzlebiger myeloider Zellen sind notwendig, um die angeborene Immunsignalisierung nach erneuter Stimulation mit PAMPs und DAMPs zu verstärken, wie in unserer Studie beobachtet wurde (Kleinnijenhuis et al., 2012; Mitroulis et al., 2018; Quintin et al., 2012). Die Reaktionsfähigkeit trainierter angeborener Immunzellen auf zeitverzögerte Stimulation durch epigenetische Veränderungen stellt eines der Kennzeichen des angeborenen Immungedächtnisses dar (Netea et al., 2020; Sherwood et al., 2022). Diese Veränderungen erfordern eine Chromatin-Umgestaltung, die durch Histonmodifikationen wie Acetylierung oder Methylierung vermittelt wird, die zu einer Aktivierung oder Repression der Transkription führen (Foster et al., 2007; Saeed et al., 2014). Um diese Effekte bei Personen zu untersuchen, die SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffe erhalten hatten, konzentrierten wir uns auf die Histon-3-Lysin-27-Acetylierung (H3K27ac) als Marker für aktive Enhancer und Promotoren in aus Monozyten stammenden Makrophagen (Wang et al., 2008). Um den Spiegel und die Persistenz von H3K27ac in kurzlebigen Makrophagen zu bestimmen, erweiterten wir unsere Studie und schlossen zwei zusätzliche Zeitpunkte vor und nach der dritten (zweiten Auffrischungsimpfung) SARS-CoV-2-mRNA-Impfung (t4 und t5) ein. Dieser Impfstoff wurde 24 Wochen (6 Monate) nach Verabreichung der ersten beiden Impfstoffe verabreicht (Datensatz EV1).

Um den Spiegel und die genomweiten Positionen von H3K27ac zu den fünf Zeitpunkten nach der Impfung, t1 bis t5, zu bestimmen, führten wir CUT&RUN an LaubdunderT-Zellen und RVeröffentlichungsdusingenNuclease (CUT&RUN). Um zu beurteilen, ob die Impfung zu einem Anstieg und einer Persistenz von H3K27ac-Genen führt, haben wir H3K27ac auch vor der Impfung (t0) kartiert und die H3K27ac-Sequenzierungs-Read-Coverages der Zeitpunkte nach der Impfung (t1 bis t5) relativ zu t0 normalisiert. Interessanterweise ergab dieser Ansatz eine hochdynamische Landschaft von

Das H3K27ac-Verhältnis verändert sich zu verschiedenen Zeitpunkten. Eine beispielhafte Genom-Browser-Ansicht zeigt einen moderaten Anstieg nach der ersten Impfung (t1), gefolgt von einem deutlichen Anstieg nach der zweiten Impfung (t2), dann einen abnehmenden Trend von t2 über t3 bis t4 und schließlich einen deutlichen Anstieg nach der dritten Impfung (t5) (Abb. 3A). Um H3K27ac-Veränderungen über verschiedene Zeitpunkte hinweg systematisch zu erfassen, haben wir zunächst die Konzentrationen H3K27ac-angereicherter Genomregionen mittels Peak-Calling global ermittelt und diese H3K27ac-Peaks anhand ihrer geringsten Entfernung zu annotierten Genen zugeordnet. Aktive Enhancer finden sich in Genkörpern und in distalen regulatorischen Regionen. Um zu beurteilen, ob genassoziierte Peaks als Reaktion auf die Impfung H3K27ac in Enhancern oder Promotoren erhalten, haben wir H3K27ac-Peaks wie folgt kategorisiert: (a) Promotor, 1 kb stromaufwärts bis 250 bp stromabwärts der Transkriptionsstartstellen (TSS), (b) Genkörper, 251 bp stromabwärts von TSS bis zu Transkriptionendstellen (TES), und (c) distal, mehr als 1 kb bis 100 kb von TSS und TES entfernt (Fulco et al., 2019). Mithilfe dieser Klassifizierung stellten wir einen insgesamt erwarteten kurzfristigen Anstieg der H3K27ac-Werte nach allen Impfzeitpunkten (t1, t2, t5) in Promotor- und Enhancer-Regionen, einschließlich Genkörpern und distalen Regionen, fest (Abb. 3B–D; Datensatz EV6). Bemerkenswerterweise stellten wir zu t4, 34 Wochen nach der zweiten Impfung (t2), einen anhaltenden, nicht abnehmenden H3K27ac-Spiegel an Genpromotoren fest, jedoch nicht in Genkörpern und distalen Regionen von Makrophagen, die von geimpften Personen gewonnen wurden, im Gegensatz zu denen, die den Impfstoff nicht erhalten hatten (Abb. 3E und EV2A). Dies deutet stark darauf hin, dass Promotoren nach der Impfung ein epigenetisches Gedächtnis erwerben. Bahnbrechende Transkriptionsfaktoren können aktiv oder passiv zugängliches Chromatin in Monozyten etablieren, das Genexpressionprogramme steuert und als epigenetisches Gedächtnis an aus Monozyten stammende Makrophagen weitergegeben wird (Saeed et al., 2014; Zaret und Carroll, 2011). Endogene G4-DNA-Sekundärstrukturen sind in hochtranskribierten, zugänglichen Promotoren weit verbreitet, die Hotspot-Ziele für Transkriptionsfaktoren sind (Hansel-Hertsch et al., 2016; Hansel-Hertsch et al., 2020; Spiegel et al., 2021). Störungen der G4-DNA-Strukturen beeinflussen die Nukleosomendichte und eröffnen die Möglichkeit, dass sie die dauerhafte Zugänglichkeit von Promotoren für den Transkriptionsapparat unterstützen könnten (Esain-Garcia et al., 2024; Esnault et al., 2023). Um zu klären, ob die durch persistentes H3K27ac markierten Promotoren das Potenzial besitzen, die G4-Sekundärstruktur anzunehmen, betrachteten wir experimentell validierte G4-Sequenzen im menschlichen Genom, die sich mit annotierten zugänglichen genomischen Regionen von Makrophagen überschneiden (Marsico et al., 2019; Zou et al., 2022). Die Analyse der G4-Sequenzabdeckung in H3K27ac-Peaks ergab einen erheblichen Anstieg der G4-DNA-bildenden Sequenzen in Promotoren, jedoch nicht in Genkörpern und distalen Regionen, ebenfalls im Vergleich zur randomisierten Erwartung (siehe Methoden) (Abb. 3F). Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass H3K27ac für



Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:6e3:220e:8372.

mehrere Monate nach der Impfung an Promotoren und dass dies mit dem strukturellen Potenzial von G4 im zugänglichen Chromatin von Makrophagen zusammenhängt.

Das epigenetische H3K27ac-Gedächtnis ist in Promotoren impfstoffresponsiver Immungene etabliert

Um genspezifische Cluster zu identifizieren, die im Verlauf der Impfgeschichte (t1 bis t5 im Verhältnis zu t0) einen ähnlichen Zuwachs und Verlust von H3K27ac aufweisen, führten wir eine unüberwachte hierarchische Clustering von H3K27ac durch bei

Promotoren, Genkörper und distale Regionen über die Zeitpunkte hinweg im Vergleich zu nicht geimpften (t0) Personen (Abb.4A-C). Heatmaps, die diese Daten darstellen, zeigten deutlich einen dominanten Gencluster (Cluster 1, ~8000 Gene), der mit H3K27ac in Promotoren zusammenhängt (Abb. EV2B), während eine höhere Diversität verschiedener Gencluster in Genkörpern und distalen Regionen beobachtet wurde (Abb.4A-D). Bemerkenswerterweise stellten wir fest, dass die persistenten H3K27ac-Werte in den Genen von Cluster 1 zu t4 signifikant höher waren als in Makrophagen von t1. Dies war jedoch nur der Fall, wenn die Peaks in Promotoren von Cluster 1 lokalisiert waren, nicht in Genkörpern oder distalen Regionen. Diese Analyse deutet darauf hin, dass nicht alle, sondern

Abbildung 2. Transkriptomische Veränderungen in Makrophagen, bestimmt mittels RNA-Sequenzierung.

(A)Vulkandiagramm mit differentiell exprimierten Genen (graue Punkte) in SP-stimulierten Makrophagen (n =6) im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen (n =6) bei t0 für ungeimpfte (A)und geimpft (t2) (B) Einzelpersonen. Negativer log₁₀ angepasstPDie Werte sind gegen die log₂-fache Veränderung aufgetragen. Herunterregulierte Gene werden mit negativen log₂-fachen Veränderungswerten auf der linken Seite des Diagramms dargestellt, während hochregulierte Gene durch positive log₂-fachen Veränderungswerte auf der rechten Seite repräsentiert werden. Gepunktete Linien zeigen log₂-fache Veränderung ±1 und -log₁₀ korrigiert anPWerte von 1. Gene wurden als unterschiedlich exprimiert betrachtet, wenn sie einen log₂ (Fold Change) > 1 zeigten und unter einem FDR von 0,05 lagen. (C)Venn-Diagramm zeigt die Anzahl der differentiell exprimierten Gene (DEGs) in aus Monozyten stammenden Makrophagen von ungeimpften (blau) (n =6) und geimpft (rot) (n =6) Individuen nach SP-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Die rote Farbe stellt die Anzahl der DEGs dar, die nur bei geimpften Personen vorkommen, während die blaue Farbe die Anzahl der DEGs anzeigt, die nur bei ungeimpften Personen vorkommen. Die gelbe Farbe hebt die überlappenden DEGs der beiden Gruppen hervor. Die Kreisgrößen im Venn-Diagramm entsprechen der Anzahl der Gene. (D)Heatmap zeigt DEG-Muster, die die SP-Stimulation von aus Monozyten stammenden Makrophagen von ungeimpften (n =6) oder geimpft (t2) (n =6) Individuen. Die Genexpressionsniveaus (log₂ normalisierte Expressionswerte) sind wie angegeben farbcodiert. (E)Genontologie (GO)-Anreicherungsanalyse, basierend auf DEGs von Monozyten-abgeleiteten Makrophagen aus geimpften (rot) (n =6) Personen im Vergleich zu ungeimpften Personen (n =6) nach Stimulation mit SP.PDie angepassten Werte sind angegeben (Farbcode) und die Größe der Kreise stellt die Anzahl der DEGs dar (Anzahl). Das Genverhältnis (XAchse) geben den Prozentsatz der Anzahl der in diesem GO-Term vorhandenen Gene im Vergleich zur Gesamtzahl der Gene in dieser Kategorie an. Die Daten werden für die 15 wichtigsten biologischen Prozesse angezeigt, sortiert nach angepasstenP Werte. DiePDer Grenzwert lag durch Permutation bei 0,05 (unter Verwendung der Standardwerte in ClusterProfiler) für die nach der Faltungänderung (log₂) geordneten Gene. (F)Vulkandiagramm, das DEGs in SP-stimulierten Makrophagen von geimpften Personen zeigt (n =6) zum Zeitpunkt t2 im Vergleich zu stimulierten Zellen von ungeimpften Personen (n =6). Negativer log₁₀ angepasstPDie Werte werden gegen die log₂-fache Veränderung aufgetragen. Ausgewählte Gene sind gekennzeichnet. Gene galten als differentiell exprimiert, wenn sie eine Veränderung (log₂) > 1 aufwiesen und unter einem FDR von 0,05 lagen.

Bestimmte Promotoren weisen nach zwei Impfungen und einer Dauer von 34 Wochen einen anhaltenden H3K27ac-Spiegel auf (Abb.4Z.B).

Anschließend untersuchten wir, ob Gencluster aus allen Kategorien (Promotor, Genkörper, distal) mit Begriffen der Genontologie (GO) assoziiert sind, die mit Immunfunktionen in Zusammenhang stehen. Systematische Untersuchungen ergaben tatsächlich, dass 70 % aller GO-Begriffe im Gencluster 1 mit der menschlichen Immunantwort in Zusammenhang stehen (z. B. positive Regulierung der Leukozytenaktivierung; an der Immunantwort beteiligte Leukozytenaktivierung; Aktivierung und Differenzierung von Lymphozyten) (Datensatz EV7). Interessanterweise stellten wir eine signifikante Überlappung von H3K27ac-Peaks in Promotoren immunassoziiertes Gene fest (n =333), die eine Untergruppe von Cluster 1 mit unterschiedlich exprimierten Genen von SP-stimulierten Makrophagen geimpfter Individuen darstellen (Abb. EV2C,D). Eine ähnliche Überlappung wurde bei zufällig ausgewählten Promotoren nicht beobachtet, was auf eine Assoziation zwischen epigenetischen und transkriptomischen Datensätzen hindeutet (Abb. EV2C,D).

Wichtig ist, dass diese immunassoziierten Gene wieIL1B, IL-18, UndSYK, wurden zuvor mit der angeborenen Immunantwort auf eine SARS-CoV-2-Infektion und eine mRNA-Impfung in Verbindung gebracht (Cheong et al.,2023; Theobald et al.,2021; Theobald et al.,2022) (Feige.5A). Darüber hinaus zeigte persistentes H3K27ac an Promotoren dieser Gene eine erhöhte Abdeckung von G4-DNA-Sequenzen aus makrophagenspezifischen, nukleosomarmen Regionen, jedoch nicht in randomisierten annotierten Promotoren, was auf eine makrophagenspezifische Anreicherung von G4-DNA-Sequenzen an Immunpromotoren im Verhältnis zu ihrer zufälligen Verteilung in Promotoren hindeutet (Abb.)5B). Beim Vergrößern der jeweiligen genetischen Regionen, die für IL-1β, IL-18, SYK, NOD2 und mehrere Mitglieder der C-Typ-Lektin-Familie (CLEC) kodieren, die mit SYK und der Inflammation-Signalegebung in Verbindung stehen, stellten wir fest, dass die mit diesen Genen verbundenen H3K27ac-Peaks zu den Zeitpunkten t2, t3 und t5 stärker ausgeprägt waren als zu t1 und t4 (Abb.5 C, EV2E und EV3A,B).

Um das persistente Immungedächtnis in Makrophagen auch phänotypisch zu bestätigen, haben wir die IL-1β-Sekretion zu t4 und t5 als Reaktion auf PAMPs gemessen. Wie erwartet stellten wir in den Überständen simulierter t5-Makrophagen im Vergleich zu t4-Makrophagen signifikant erhöhte IL-1β-Spiegel fest. Dies deutet auf eine erhöhte Zytokinsekretion, H3K27ac-Spiegel und eine gesteigerte Immunantwort hin (Abb.)5D). Bemerkenswerterweise war die IL-1β-Freisetzung zu t5 im Vergleich zu t4 deutlich höher als zu t1 im Vergleich zu t0 (Zymosan-Stimulation: mediane Veränderung von 16,38 [t5/t4] vs. 1,63 [t1/t0]; Pam3CSK4-Stimulation: mediane Veränderung von 66,90 [t5/t4] vs. 0,92 [t1/t0]), was wiederum auf einen Memory-Effekt hindeutet, der über mehrere Monate anhält (Abb. EV4). Der geringere Effekt der ssRNA-Stimulation auf die IL-1β-Sekretion (mediane Veränderung von 2,59 [t5/t4] vs. 6,28 [t1/t0]) könnte

Dies lässt sich durch eine anhaltende Langzeitreaktion auf ssRNA nach zwei Impfungen (t3) erklären, die in diesem Ausmaß für Zymosan oder Pam3CSK4 nicht beobachtet wurde (Abb.5D).

Zusammenfassend zeigen wir, dass die SARS-CoV-2-Impfung langfristige epigenetische Modifikationen in H3K27ac in Promotorregionen induziert, was zu einer verstärkten Genexpression und angeborenen Immunantworten auf nicht verwandte PAMPs in Makrophagen führt, was auf die Induktion einer trainierten angeborenen Immunität hindeutet.

Diskussion

In unserer Studie nutzen wir die Möglichkeit, die Zytokinreaktion sowie transkriptionelle und epigenetische Veränderungen von aus Monozyten stammenden Makrophagen in einer immunologisch naiven Population, die mRNA-Impfungen erhält, umfassend zu untersuchen. Diese Impfungen stellen neuartige und vielversprechende Impfstoffkonstrukte für eine Vielzahl klinischer Anwendungen dar.

Wir konnten nachweisen, dass die SARS-CoV-2-mRNA-Impfung eine umfangreiche und persistente H3K27ac-Sequenz an Promotoren kurzlebiger Makrophagen etabliert. Um jedoch eine signifikante epigenetische Reprogrammierung zu erreichen, die mehrere Monate nach der zweiten Impfung anhält, war ein Prime-Boost-Impfschema erforderlich. Die Priming-Impfung allein hatte wenig Einfluss auf diese epigenetische Markierung, die mit einer veränderten Immunantwort einhergeht. Wichtig ist, dass die von uns beobachtete dynamische epigenetische Landschaft mit der Fähigkeit von Makrophagen in Verbindung gebracht werden könnte, nach Stimulation mit einer Reihe von pathogenen oder impfstoffbedingten Auslösern des angeborenen Immunsystems proinflammatorische Zytokine zu sezernieren. Unsere Beobachtungen stehen daher im Einklang mit den Merkmalen des angeborenen Immungedächtnisses bzw. der trainierten angeborenen Immunität, definiert als die langfristige funktionelle Reprogrammierung reifer myeloider Zellen (Netea et al., 2020). Das monatelange angeborene Immungedächtnis kurzlebiger Zellen wird durch epigenetische Reprogrammierung von Knochenmarks-Progenitorzellen und aus Blut gewonnenen Monozyten erreicht (Netea et al.,2020). Eine wichtige epigenetische Enhancer-Markierung in diesen Zellen ist die Akquisition der Histon-3-Lysin-27-Acetylierung (H3K27ac), die wir nach mRNA-Impfung an Promotoren verstärkt beobachteten. Tatsächlich ist diese nichtkanonische langfristige Etablierung des H3K27ac-Gedächtnisses an Promotoren angesichts seiner kanonischen Rolle in distalen Regionen wie Enhancern und Genkörpern überraschend, lässt sich aber möglicherweise durch die bemerkenswerte Anreicherung von G4-DNA-Sequenzen erklären, die als biophysikalische Gegenkraft wirken, um die nukleosomvermittelte DNA-Kondensation zu verhindern.

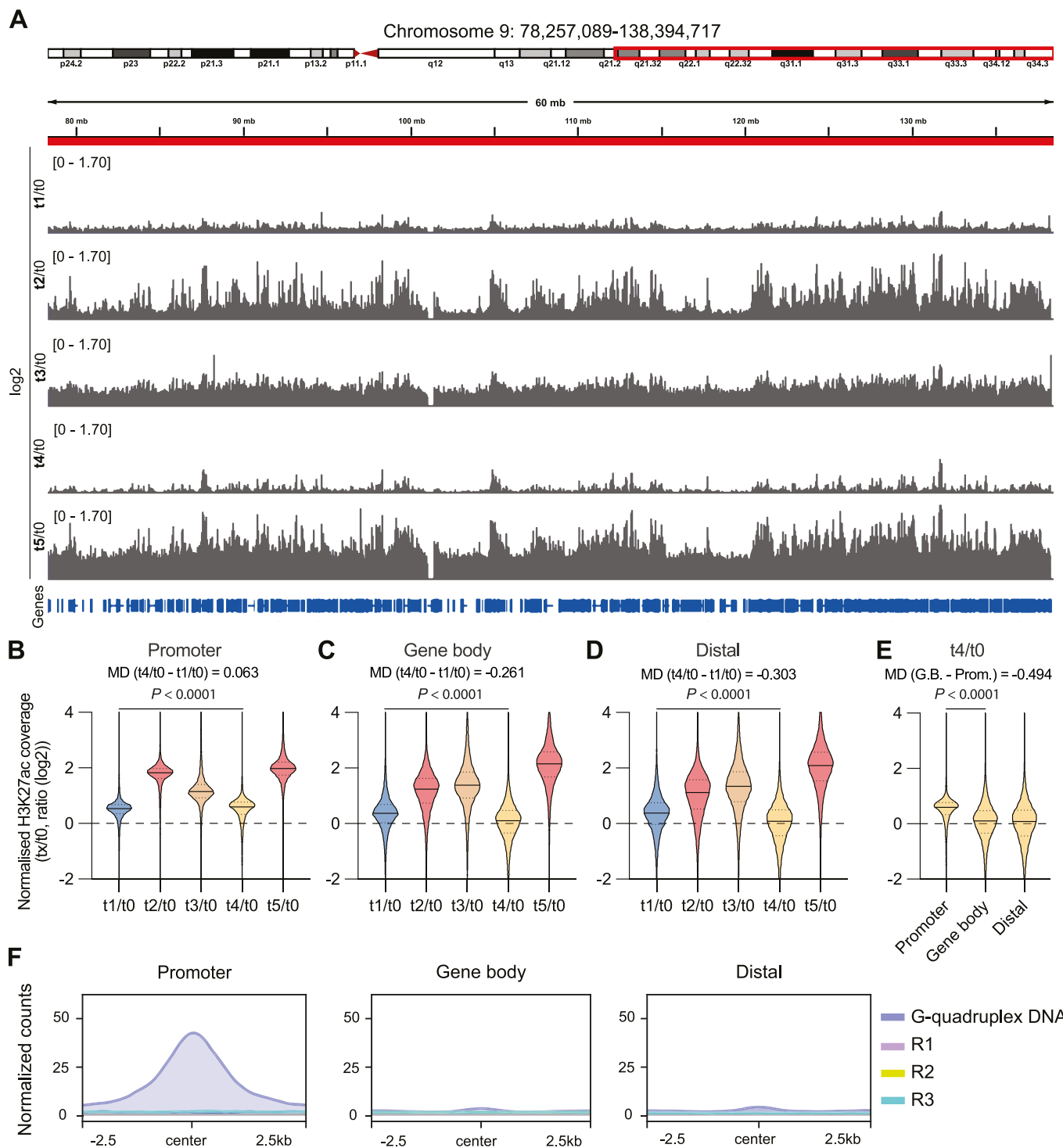
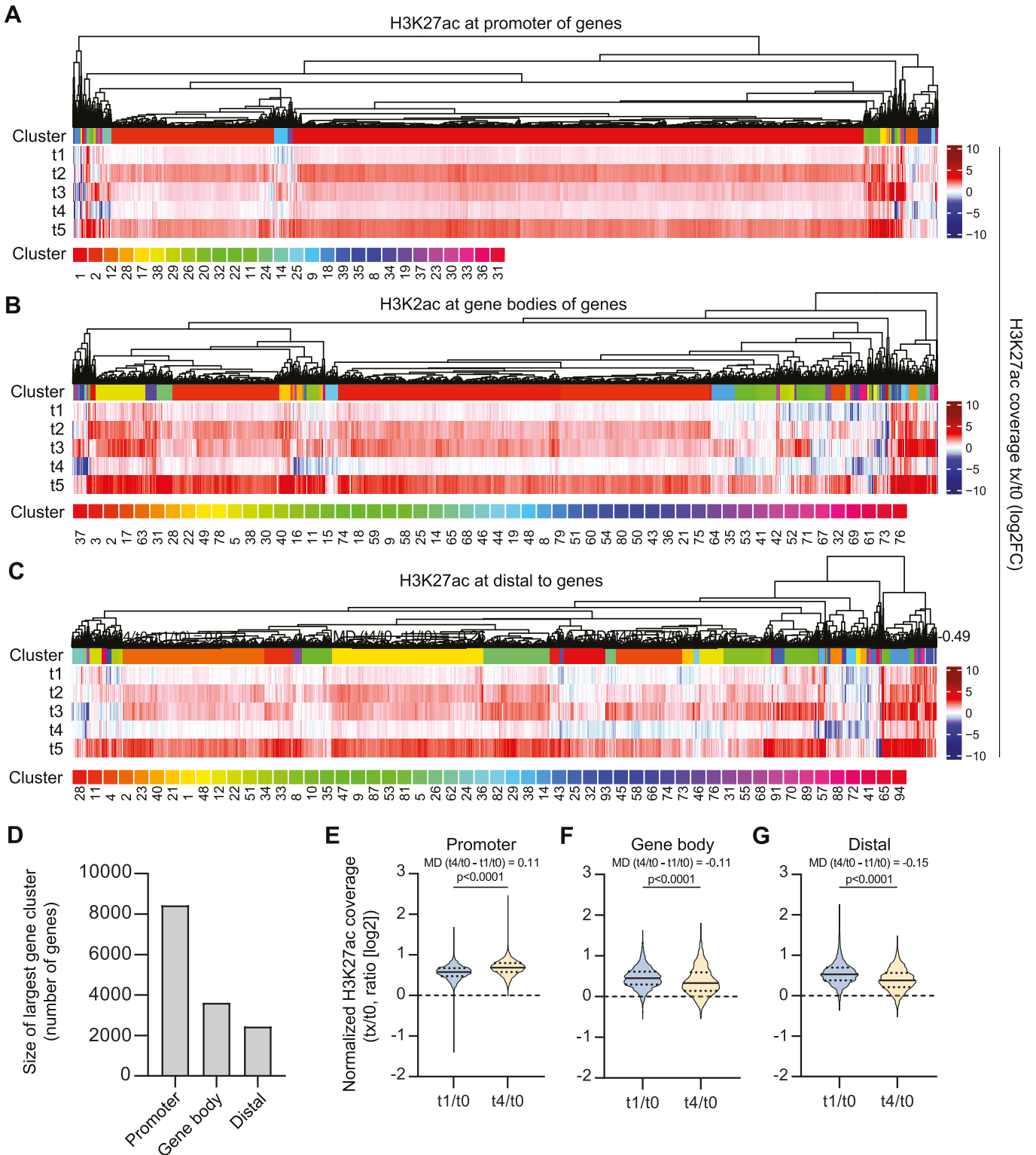


Abbildung 3. Die Impfung führt zu einer Zunahme und anhaltenden Persistenz von H3K27ac an Genpromotoren.

(A) Genom-Browser-Ansicht von 60 MB des Chromosoms 9, Anzeige des Verhältnisses (\log_2) von tx zur t0-durchschnittlichen H3K27ac-Abdeckung über die Zeitpunkte hinweg. (B) Verteilung der H3K27ac-Bedeckungsverhältnisse (\log_2) in den Peaks der Promotoren ($n = 17.026$) (1 kb stromaufwärts bis 250 bp stromabwärts der Transkriptionsstartstellen [TSS]), (C) Genkörper ($n = 19.583$) (251 bp stromabwärts von TSS bis zu den Transkriptionseinstellen [TES]), (D) und distalen Regionen ($n = 19.315$) (1 kb bis 100 kb von TSS und TES entfernt) (D) über tx relativ zu t0. (B-D) Alle Verteilungsvergleiche unterscheiden sich deutlich ($P < 0,001$) (siehe Datensatz EV6). Der Medianunterschied (MD) zwischen dem t4/t0- und dem t1/t0-Verhältnis ist für alle drei Genomregionen angegeben. (E) Die H3K27ac-Bedeckungsverhältnisse (\log_2) in den Peaks der Promotoren werden für t4 im Vergleich zu t0 für Promotoren, Genkörper und distale Gene dargestellt. Die MD ist zwischen Genkörpern (GB) und Promotoren angegeben. Alle Verteilungsvergleiche unterscheiden sich signifikant ($P < 0,0001$). Die Werte wurden mithilfe der einfaktoriellen ANOVA von RM mit Tukeys Mehrfachvergleichstest berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. (F) G-Quadruplex-DNA-Abdeckung in H3K27ac-Peaks in annotiertem, makrophagenspezifischem, zugänglichem Chromatin in Promotoren, Genkörpern und distalen Regionen. Die Quelldaten für diese Abbildung sind online verfügbar.

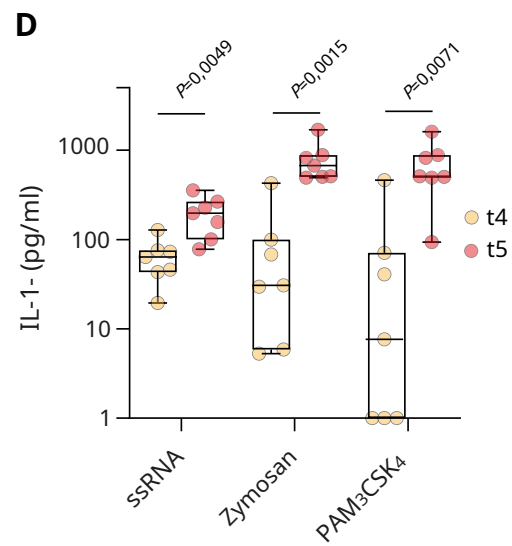
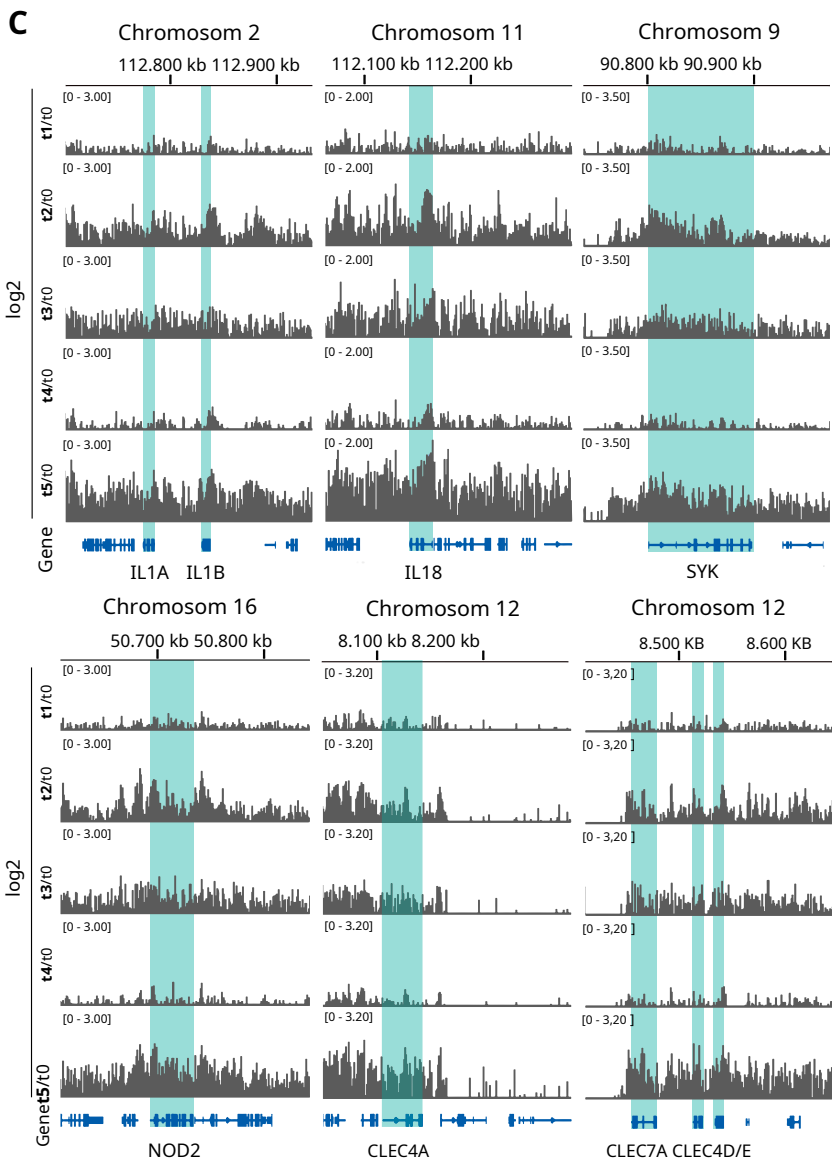
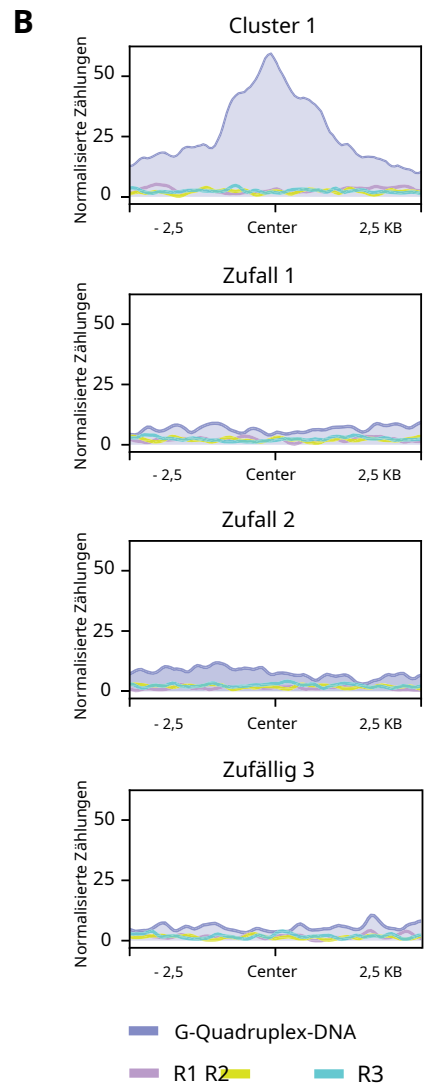
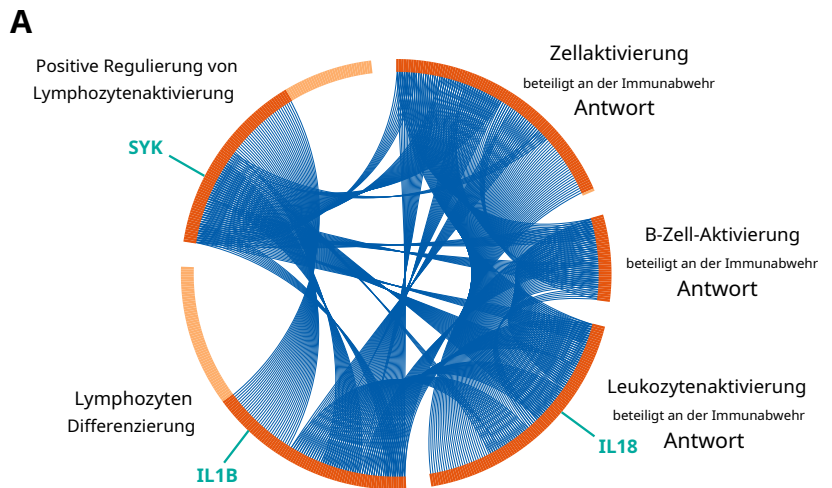
Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:66a3:220e:8372.



Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:66a3:220e:8372.

Abbildung 4. Gencluster mit ähnlichen H3K27ac-Veränderungen können an Promotoren über verschiedene Impfzeitpunkte hinweg identifiziert werden.

Unüberwachte Identifizierung von Genclustern mit ähnlichen H3K27ac-Veränderungen über Impfungen hinweg an Promotoren (A), Genkörper (B) und distal zu Genen (C). D) Größe der größten Gencluster, die bei der unbeaufsichtigten hierarchischen Clusterbildung von Genen im Zusammenhang mit H3K27ac gefunden wurden. (Z.B.) Vergleichende t1 vs t4 H3K27ac-Bedeckungsverhältnisse (log2) relativ zu t0 in Promotoren (n = 8417) (E), Genkörper (n = 3606) (F) und distalen Regionen (n = 2433) (G). Die mittlere Differenz (MD) zwischen den Verhältnissen t4/t0 und t1/t0 wird für jede Genomregion angezeigt. P Die Werte wurden mit einem Wilcoxon-Test berechnet. Die Werte waren hochsignifikant (P < 0,0001) für alle Vergleiche. P Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Quelldaten für diese Abbildung sind online verfügbar.



Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:d6e3:220e:8372.

Abbildung 5. H3K27ac in Promotoren immunassoziiierter Gene von Cluster 1.

(A)Circos-Diagramm ausgewählter immunbezogener Begriffe aus Cluster 1 (H3K27ac in Promotoren). Es veranschaulicht die Überlappung verschiedener Gene über verschiedene GO-Begriffe hinweg. Dunkle rote Halbkreise stellen Gene dar, die von mehreren GO-Begriffen gemeinsam genutzt werden, während Gene, die eindeutig mit bestimmten GO-Begriffen assoziiert sind, hellrot hervorgehoben sind. Einzelne Gene von Interesse, darunter IL1B, IL-18 und SYK, sind wie angegeben gekennzeichnet. (B)G-Quadruplex-DNA aus zugänglichem Chromatin von Makrophagen und ihre Abdeckung in H3K27ac-Peaks, die sich in Promotoren von Immungenen befinden, die Teil des Clusters 1 sind, und in passenden randomisierten Promotor-Sets. (C)Genom-Browseransichten verschiedener Chromosomensegmente, die das Verhältnis (log2) von tx zur t0-durchschnittlichen H3K27ac-Abdeckung über die Zeitpunkte hinweg anzeigen. (D)Monozyten bei t4 (n =7; gelb) und t5 (n =7; rot) wurden durch CD14 isoliert. Positive Selektion aus PBMCs. Die Zellen wurden ausgesät und 5 Tage lang in Gegenwart von M-CSF inkubiert. Differenzierte Zellen wurden 4 Stunden lang mit ssRNA, Zymosan oder Pam3Csk4 stimuliert. Die IL-1β-Sekretion wurde mittels ELISA quantifiziert. Für die statistische Analyse wurde ein multipler ungepaarter t-Test verwendet. Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren den technischen Mittelwert eines unabhängigen Experiments. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Quelldaten für diese Abbildung sind online verfügbar.

und Transkriptionsfaktoren anzuziehen, um diese Promotoren gemeinsam aktiv zu halten (Esain-Garcia et al.,2024; Esnault et al.,2023 ; Hansel-Hertsch et al.2020; Spiegel et al.,2021).

Unsere umfassende Studie, die zu fünf Zeitpunkten nach der Impfung durchgeführt wurde, ergab, dass es sich primär um veränderte H3K27ac-Spiegel handelt, die mit Genen assoziiert sind, die für Zytokine und angeborene Immunrezeptoren wie C-Typ-Lektine kodieren, die hochdynamisch geformt sind. Darüber hinaus fanden wir H3K27ac auf Genen, die für wichtige regulatorische Proteine der menschlichen Immunantwort kodieren. Insgesamt decken sich die Daten mit unseren jüngsten Ex-vivo-Befunden zu SP-ausgelösten Signalkaskaden, die die Inflammation aktiviert und Zytokinsekretion durch Aktivierung von C-Typ-Lektinen und SYK in Makrophagen geimpfter Personen vermitteln (Theobald et al.,2022).

Interessanterweise deuten epidemiologische Daten darauf hin, dass Lebendimpfstoffe wie Pocken-, Masern- und Polioimpfstoffe unspezifische Schutzeffekte gegen andere Infektionen als die Zielkrankheiten hervorrufen (Netea et al., 2020). Experimente an Mäusen zeigten, dass die BCG-Impfung epigenetische Veränderungen hervorruft, die sowohl das Rezeptorrepertoire als auch den Funktionszustand zirkulierender mononukleärer Zellen verändern und so zu einem Schutz vor Pilzinfektionen führen (Kleinnijenhuis et al.,2012). Ähnliche Effekte wurden für den BCG-Impfstoff postuliert, der den klinischen Verlauf einer schweren COVID-19-Erkrankung durch die Stärkung der trainierten angeborenen Immunität beim Menschen verbessert (Mantovani und Netea,2020). Eine Reihe prospektiver klinischer Studien zur Bewertung von BCG zur Verringerung der Morbidität und Mortalität aufgrund von COVID-19 zeigte jedoch keinen positiven Effekt (Moorlag et al.,2022; Ten Doeschate et al.,2022; Upton et al., 2022). Dennoch ist es faszinierend zu spekulieren, dass die breite und nicht-diskriminierende angeborene Immunantwort, die wir in Makrophagen nach der SARS-CoV-2-mRNA-Impfung beobachtet haben, Resilienzprogramme gegen andere, nicht verwandte Infektionskrankheiten induzieren könnte. Um das translationale Potenzial dieser Erkenntnisse vollständig zu verstehen, bedarf es weiterer Grundlagenforschung und klinischer Forschung.

In diesem Zusammenhang sind unsere Daten zur Immunantwort, die durch die dritte Auffrischungsimpfung ausgelöst wurde, äußerst interessant. Zunächst konnten wir nachweisen, dass in einer immunologisch naiven Population zwei mRNA-Impfungen erforderlich sind, um epigenetische Veränderungen und eine starke angeborene Immunantwort ex vivo hervorzurufen. Nach einem Zeitraum von 34 Wochen (~6 Monaten) reichte jedoch die Verabreichung einer einzigen Auffrischungsimpfung aus, um eine signifikante epigenetische Umprogrammierung von Makrophagen zu induzieren, die zum Auftreten markanter H3K27ac-Markierungen auf einer großen Anzahl von Genen führte, die für ein vielfältiges Repertoire an angeborenen immunassoziierten Genen kodieren. Dies konnte mit der starken Sekretion von Zytokinen aus Makrophagen korreliert werden, die mit verschiedenen PAMPs stimuliert wurden. Die Art dieser Immunantwort war wiederum unspezifisch, und SARS-CoV-2-unabhängige PAMPs konnten nach der Impfung Makrophagen aktivieren. Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich bei SARS-CoV-2-Infektionen erzielt, die lang anhaltende epigenetische und transkriptionelle Veränderungen in Makrophagen, Monozyten und

hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) (Cheong et al, 2023; Theobald et al.,2021). Daher ist es denkbar, dass Makrophagen geimpfter oder infizierter Personen auf andere Virusinfektionen als die Zielkrankheit ähnlich reagieren. Eine Einschränkung besteht darin, dass für unsere epigenetischen Studien das mRNA-1273-Impfstoffkonstrukt als dritter Booster eingesetzt wurde, während die ersten beiden Impfstoffe BNT162b2-mRNA-Impfstoffe waren. Die Daten zur Auswertung der Immunantwort der beiden Impfstoffkonstrukte sind jedoch vergleichbar, was darauf hindeutet, dass die Wahl des Impfstoffs nur einen geringen Einfluss auf unsere epigenetischen und transkriptomischen Ergebnisse hat (Naranbhai et al.,2022).

Insgesamt widersprechen unsere Daten den Ergebnissen einer anderen Studie, die postuliert, dass das Immungedächtnis nach zwei aufeinanderfolgenden mRNA-Impfungen nur von kurzer Dauer ist und sich nach einigen Wochen eine schnelle Entwicklung der Immunhomöostase einstellt (Yamaguchi et al.,2022). Zwar nehmen epigenetische Markierungen mit der Zeit ab, doch unsere Studie zeigt, dass aus Monozyten stammende Makrophagen verändert bleiben und bei erneuter Stimulation hochreaktiv sind. Promotorassoziierte H3K27ac-Markierungen blieben mehrere Monate nach den ersten beiden Impfungen bestehen, was eindeutig auf ein langlebiges angeborenes Immungedächtnis hindeutet. Wir gehen davon aus, dass diese persistenten Markierungen die tiefgreifenden epigenetischen Veränderungen und die starke Immunreaktion der Makrophagen nach einer einzigen Auffrischungsimpfung mit der dritten Dosis bewirken.

Die dynamischen Aspekte, die wir bei der epigenetischen Reprogrammierung klassischer angeborener Immunzellen beobachtet haben, könnten Auswirkungen auf die Verbesserung von Impfreaktionen und -designs, die allgemeine Immunantwort auf nicht-assoziierte Infektionen und sogar unser Verständnis von entzündlichen Erkrankungen nach Impfungen haben, die bei einer kleinen Anzahl Geimpfter auftreten. Die Ergebnisse dieser Studie erweitern somit unser aktuelles Verständnis der mRNA-basierten Impfung und liefern wichtige Erkenntnisse für die zukünftige Entwicklung mRNA-basierter Impfstoffe.

Methoden

Reagenzien- und Werkzeugtabelle

Reagenz/Ressource	Referenz oder Quelle	Kennung oder Katalognummer
Experimentelle Modelle		
Vom Patienten abgeleitet Makrophagen	Diese Studie	N / A
Rekombinante DNA		
S-Ektodomäne kodierendes pH-Plasmid	Wrapp et al.,2020; Hsieh et al.,2020	N / A
Antikörper		
H3K27ac	Aktives Motiv	Kat.-Nr. 39133

Reagenz/Ressource	Referenz oder Quelle	Kennung oder Katalognummer
Chemikalien, Enzyme und andere Reagenzien		
Bio-Mag Plus Concanavalin A-beschichtete Perlen	Polywissenschaften	Kat.-Nr. 86057
CD14 MicroBeads, human - lyophilisiert	Miltenyi Biotec	Kat.-Nr. 130-097-052
CUTANA pAG-MNase	EpiCypher	Kat.-Nr. 15-1016
Ficoll Paque Plus	GE Healthcare	Kat.-Nr. 17-1440-02
KINK-1	Sigma-Aldrich	Kat.-Nr. SML2098-5 mg
MCC950	Sigma-Aldrich	Kat.-Nr. 5381200001
M-CSF, Forschungsqualität (menschlich)	Miltenyi Biotec	Kat.-Nr. 130-096-491
Nigericin	Sigma-Aldrich	Kat.-Nr. N7143
ORN06/LyoVec™	InvivoGen	Kat.-Nr. tlr1-orn6
Pam3CSK4	InvivoGen	Kat.-Nr. tlr1-pms
SARS-CoV-2-Spike-Protein	Diese Studie	N / A
ssRNA	InvivoGen	
Zymosan	InvivoGen	Kat.-Nr. tlr1-zyn
Software		
Adobe Illustrator v26.4.1	Adobe	N / A
bcl2fastq2 v2.20.0	Illumina	N / A
bedtools v2.31	Quinlan und Hall, 2010	N / A
Bowtie2 v2.4.5	Langmead und Salzberg, 2012	N / A
ChippeakAnno v3.34	Liebe und andere, 2014	N / A
clusterProfiler v4.0.5	Yu et al., 2012	N / A
DESeq2 v1.32.0	Bioleiter	N / A
enrichplot v1.12.2	Bioleiter	N / A
EnhancedVolcano v1.13.2	Bioleiter	N / A
Excel	Microsoft	N / A
fgsea v1.18.0	Bioleiter	N / A
GraphPad Prism v9.5.1	GraphPad	N / A
LinRegPCR	Amsterdam UMC	N / A
Metascape	Zhou et al., 2019	N / A
nf-core RNA-seq-Pipeline v3.0	Ewels et al., 2020	N / A
plotProfile v3.5.4	deepTools	N / A
R-Version v4.1.1 (10.08.2021) R Core Team	2021	N / A
Samtools v1.17	Li et al., 2009	N / A
SEACR v1.3	Meers et al., 2019	N / A
xPONENT	Diasorin	N / A
Andere		
Unbeschichtetes ELISA-Kit für menschliches IL-1 beta	Thermo Fisher Scientific	Kat.-Nr. 88-7261-88
Menschliches Luminex®Discovery Biotechnologie-Assays		Kat.-Nr. LXSAMH
KAPA Bibliotheksquantifizierungskit	KAPA Biosystems	Kat.-Nr. KK4824

Reagenz/Ressource	Referenz oder Quelle	Kennung oder Katalognummer
mirVana miRNA-Isolierungskit	Thermo Fisher Scientific	Kat.-Nr. AM1561
TruSeq DNA nano Kit	Illumina	Kat.-Nr. 20015964

Isolierung von Monozyten und Differenzierung zu Makrophagen

Blutproben wurden zu verschiedenen Zeitpunkten von gesunden, ungeimpften Spendern oder von Spendern entnommen, die eine, zwei oder drei Dosen des SARS-CoV-2-mRNA-Impfstoffs (Comirnaty [Pfizer, New York City, NY, USA/BioNTech SE, Mainz, Deutschland] und/oder Spikevax [Moderna, Inc., Cambridge, MA, USA]) erhalten hatten. Für alle menschlichen Proben wurde eine schriftliche Einverständniserklärung gemäß der Deklaration von Helsinki eingeholt und die Experimente entsprachen den im Belmont-Bericht des Gesundheitsministeriums festgelegten Grundsätzen. Die Studie wurde von der Ethikkommission in Köln genehmigt (Referenznummer 21-1283). In die Studie wurden nur Erwachsene aufgenommen. Personen mit COVID-19-Infektionen vor oder nach der Impfung wurden ausgeschlossen.

PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll Plus, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) gereinigt. CD14-Zellen wurden aus PBMCs durch positive Selektion isoliert (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland). $2,5 \times 10^5/5 \times 10^4$ CD14-Zellen wurden in 24/96-Well-Platten (TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) ausgesät und 5 Tage lang in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit 10 % fötalem Rinderserum (Thermo Fisher Scientific) und 50 ng/ml M-CSF (Miltenyi Biotec) zur Makrophagendifferenzierung bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Ex-vivo-Stimulation von Makrophagen

Vor Experimenten wurde das Medium der differenzierten Makrophagen ausgetauscht, und die Makrophagen wurden für weitere 2 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach dem Mediumaustausch wurde SARS-CoV-2-Protein (0,1 µg/ml), das wie zuvor beschrieben rekombinant exprimiert wurde (Theobald et al.,[2021](#)), Zymosan (10 µg/ml; Invivogen, Toulouse, Frankreich) oder ssRNA (8 µg/ml, ORN06/LyoVec™, Invivogen) wurde für 4 Stunden zugegeben. Anschließend wurde Nigericin (5 µM) (Sigma-Aldrich) für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ zugegeben. Für Experimente mit Inhibitoren wurden die Zellen vor der ersten Stimulation entweder mit DMSO (Sigma-Aldrich), MCC950 (10 µM) (Sigma-Aldrich) oder KINK-1 (10 µM) (Sigma-Aldrich) inkubiert. Alle Untersuchungen wurden in technischen Duplikaten durchgeführt. Überstände wurden für die anschließende Zytokinanalyse bei -80 °C eingefroren.

Quantifizierung von Zytokinen

Der quantitative Nachweis von IL-1β erfolgte mit dem IL-1 beta Human Uncoated ELISA Kit (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Anweisungen des Herstellers. Überstände primärer Makrophagen wurden im ELISA-Verdünnungsmittel 1:5–1:50 verdünnt. Alle Proben wurden in technischen Duplikaten gemessen, und die Absorption wurde mit einem Mikroplatten-Reader (Hidex Oy, Turku, Finnland) gemessen. Für andere Zytokine wurde ein Zytokin-Array mittels Luminex Discovery Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mit den angegebenen Analyten gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden bei 1000 × zentrifugiert.

10 Minuten lang inkubiert und vor der Analyse 1:4 in Kalibratorverdünner (R&D Systems) verdünnt. Zytokine/Chemokine wurden mit dem Luminex 200 xMAP-System (Luminex) gemessen und durch Vergleich mit einer Standardkurve quantifiziert. Die Datenerfassung und -analyse erfolgte mit der xPONENT-Software.

Transkriptomsequenzierungsanalysen (RNA-Seq)

Menschliche Makrophagen wurden wie zuvor beschrieben isoliert und in 24-Well-Platten mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Well. Die Stimulation erfolgte wie zuvor beschrieben. Kurz gesagt: Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und die RNA-Isolierung mit dem mirVana miRNA-Isolationskit (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die RNA-Seq-Bibliotheksvorbereitung erfolgte mit 100 ng Gesamt-RNA und dem NEBNext Ultra RNA-Bibliotheksvorbereitungsprotokoll (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) gemäß Standardverfahren. Die Bibliotheken wurden validiert und quantifiziert (Tape Station 4200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Alle Bibliotheken wurden mit dem KAPA Library Quantification Kit (Roche, Basel, Schweiz) und dem 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) quantifiziert. Die Sequenzierung erfolgte mit NovaSeq6000-Sequenzern (Illumina, San Diego, CA, USA) mit einer Leselänge von 100 bp (PE) mit dem Ziel von 50 Mio. Reads/Probe (RNA-Seq) oder einer Leselänge von 50 bp (SR) mit dem Ziel von 5 Mio. Reads/Probe (kleine RNA). Demultiplexing und FastQ-Dateigenerierung erfolgten mit der Software bcl2fastq2 (v2.20.0) von Illumina.

Die RNA-Sequenzierung erfolgte mit einem gerichteten Protokoll. Qualitätskontrolle, Trimmen und Alignment wurden mithilfe der nf-core RNA-Sequenzierungs-Pipeline (v3.0) durchgeführt (Ewels et al., 2020). Details zur Software und den Abhängigkeiten für diese Pipeline finden Sie unter <https://github.com/nf-core/rnaseq/blob/master/CITATIONS.md> Als Referenzgenomsequenz und Transkriptannotation wurde das Homo sapiens-Genom GRCh38 aus Ensembl Version 103 verwendet. Die differentielle Expressionsanalyse wurde in R Version 4.1.1 (10.08.2021) (R Core Team) durchgeführt (2021) mit DESeq2 v1.32.0, um paarweise Vergleiche zwischen Gruppen durchzuführen. Die Schrumpfungsschätzung des Log Fold Change wurde mit ashR (Stephens, 2017). Nur Gene mit einer Mindestabdeckung von 10 Reads in 6 oder mehr Proben aus jedem paarweisen Vergleich wurden als Kandidaten für eine differenzielle Expression betrachtet. Gene galten als differenziell exprimiert, wenn sie einen \log_2 (Fold Change) > 1 aufwiesen und unter einem FDR von 0,05 lagen. Gene mit einer Mindestabdeckung von 10 Reads in 6 oder mehr Proben aus jedem paarweisen Vergleich wurden in funktionelle Anreicherungsanalysen einbezogen und als „Genuniversum“ für überrepräsentationsbasierte Analysen betrachtet. Die funktionelle Anreicherungsanalyse wurde mit clusterProfiler v4.0.5 durchgeführt (Yu et al., 2012). Die Gen-Anreicherungsanalyse (GSEA) wurde mit dem Algorithmus fgsea v1.18.0 durchgeführt (Subramanian et al., 2005). Der P- Der Grenzwert lag durch Permutation bei 0,05 (unter Verwendung der Standardwerte in ClusterProfiler) für die nach \log_2 (Fachänderung) geordneten Gene.

Das GSEA-Punktdiagramm wurde mit Enrichplot v1.12.2 erstellt. Das Vulkandiagramm wurde mit einer modifizierten Version der Funktion EnhancedVolcano aus EnhancedVolcano v1.13.2 erstellt.

CUT&RUN-Probenvorbereitung

CUT&RUN wurde an 150 K Makrophagen pro Probe durchgeführt, wobei ein zuvor beschriebenes Protokoll (Skene und Henikoff, 2017). Kurz gesagt, die Zellen wurden zweimal mit Waschlösung (20 mM MHEPES, 150 mM NaCl, 0,5 mM Spermidin) gewaschen und 10 Minuten bei Raumtemperatur an aktivierte Concanavalin A-Kügelchen (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) gebunden.

Temperatur. Die Zellperlensuspension wurde dann in Antikörperpuffer (20 mM MHEPES, 150 mM NaCl, 0,5 mM Spermidin, 0,05 % Digitonin, 2 mM EDTA) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C mit einem H3K27ac-Antikörper (Active Motif, Carlsbad, CA, USA #39133) (Verdünnung 1:50) inkubiert. Die Zellperlensuspension wurde dann zweimal mit Digitonin-Puffer (20 mM MHEPES, 150 mM NaCl, 0,5 mM Spermidin, 0,05 % Digitonin) gewaschen und 10 Minuten lang mit 2,5 µl CUTANA pAG-MNase (EpiCypher, Durham, NC, USA) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Digitonin-Puffer wurde den Proben 1 µl 100 mM CaCl₂ zugesetzt und die Proben 2 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde STOP-Puffer (340 mM NaCl, 20 mM EDTA, 4 mM EGTA, 0,02 % Digitonin, 50 µg/ml RNase A, 50 µg/ml Glykogen, 50 µg gescherte genomische DNA von *Saccharomyces cerevisiae* als Spike-in-Kontrolle) wurde in jedes Röhrchen gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 500 U/min bei 37 °C inkubiert, und nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit gesammelt, die DNA wurde mit einem DNA Clean Concentrator Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) gereinigt und die DNA wurde in Elutionspuffer eluiert. Zur Bibliotheksvorbereitung verwendeten wir das TruSeq DNA Nano Kit und Protokoll von Illumina mit 15 PCR-Zyklen. Die Bibliotheken wurden validiert und quantifiziert (Agilent Tape Station 4200). Ein Pool aller Bibliotheken wurde mit dem KAPA Library Quantification Kit und dem Applied Biosystems 7900HT Sequence Detection System quantifiziert. Die Sequenzierung wurde mit NovaSeq-Sequenzern (Illumina) und einer PE100bp-Leselänge mit dem Ziel von 10 Mio. Reads/Probe durchgeführt.

CUT&RUN-Datenanalyse

Die gesamte Datenanalyse wurde mit dem europäischen Galaxy-Server durchgeführt (<https://usegalaxy.eu>). Rohe Fastq-Dateien wurden gemappt und behandelt, wie von Zheng et al. beschrieben (<https://www.protocols.io/view/cut-amp-tagdata-processing-and-analysis-tutorial-e6nvw93x7gmk/v1>). Paired-End-Reads wurden mit Bowtie2 (Version 2.4.5), Samtools (Version 1.17) und Bedtools (Version 2.31) unter Verwendung der folgenden Parameter ausgerichtet: -- End-to-End --sehr empfindlich --nicht gemischt --nicht diskordant --phred33 -I 10 -X 700 für die Kartierung von Inserts mit einer Länge von 10-700 bp (Langmead und Salzberg, 2012; Li et al., 2009; Quinlan und Hall, 2010). Wir verwendeten das humane GRCh38-Referenzgenom für die Alignmentierung und das Genom *sacCer3* von *S. cerevisiae* für die Spike-In-Kalibrierung nach Anpassung aller menschlichen Bibliotheken an die gleiche Lesetiefe. Für die Peak-Calling-Analyse wurde SEACR (Version 1.3) verwendet; die Fragmentzählungen wurden mithilfe der Spike-In-Lesezählung normalisiert (Meers et al., 2019). Daher wurde die Normalisierungsoption von SEACR auf „keine“ eingestellt; der verwendete numerische Schwellenwert betrug 0,01.

Genomweite Abdeckungsverhältnisse von H3K27ac von t1 bis t5 im Verhältnis zu t0 in Promotoren, Genkörpern und distalen Regionen
Wir haben die normalisierte genomweite Abdeckung für alle 41 H3K27ac-Bibliotheken mithilfe von coverageBED (Version 2.31.1) quantifiziert und die mittlere Abdeckung für jeden Zeitpunkt über die Bibliotheken hinweg berechnet. Promotoren wurden als Regionen definiert, die sich von -1 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts (TSS) bis 250 bp stromabwärts des TSS erstrecken. Genkörper wurden als 251 bp stromabwärts des TSS bis zum Transkriptionsendpunkt (TES) definiert. Distale Regionen wurden als Bereiche definiert, die mehr als 1 kb und bis zu 100 kb von Genen entfernt liegen (von TSS bis TES). H3K27ac-Peaks wurden für alle 41 Proben aufgerufen, verkettet, mit sortBED (Version 2.31.1) sortiert, mit mergeBED (Version 2.31.1) zusammengeführt und gefiltert, um Peaks mit kanonischen chromosomalen Annotationen (Grep-Muster: chr{([0-9XYxy])\b} beizubehalten. Um die genomweiten Verhältnisse der mittleren H3K27ac-Abdeckung zu den Zeitpunkten T1 bis T5 im Verhältnis zu T0 zu berechnen, haben wir das Verhältnis der Summe der mittleren Abdeckung zu jedem Zeitpunkt zu T0 für jeden H3K27ac-Peak berechnet (bedtools_unionbedgraph, Version 2.31.1;

tp_awk_tool, Version 9.3). Die resultierenden H3K27ac-Peaks und ihre zugehörigen Verhältnisse wurden mithilfe von closestBed (Version 2.31.1) weiter zu Promotoren, Genkörpern und distalen Regionen annotiert.

Unüberwachte Identifizierung von Genclustern mit ähnlichen H3K27ac-Veränderungen über verschiedene Zeitpunkte hinweg
Um konsistente Werte für jedes Gen zu erhalten, haben wir die H3K27ac-Abdeckungsverhältnisse über die mit jedem Genmerkmal (Promotor, Genkörper oder distale Region) verbundenen Peaks für jeden Zeitpunkt relativ zu t0 gemittelt. Um die Komplexität der Abdeckungsverhältnisse über die Zeitpunkte hinweg aufzulösen, verwendeten wir dynamisches hierarchisches Clustering, um Gencluster mit unterschiedlicher Dichte, Größe und Struktur zu identifizieren (dynamicTreeCut, Version 1.63-1). Cluster mit einem positiven durchschnittlichen Silhouettenwert (Cluster, Version 2.1.6; Code im Abschnitt „Datenverfügbarkeit“ verfügbar) wurden für die erneute Clusterung und visuelle Darstellung beibehalten (Abb. 4A) und nachgelagerte Analysen wie Genontologie (clusterProfiler, Version 4.12.6).

G-Quadruplex-DNA-Sequenzprofilierung in H3K27ac-Peaks, die mit zugänglichem Chromatin von Makrophagen überlappen

Wir betrachteten experimentell validierte menschliche G4-DNA-Sequenzen, die mit annotiertem, zugänglichem Chromatin in Makrophagen überlappen. Annotierte Positionen von zugänglichem Chromatin (aus DNase-seq- und ATAC-seq-Datensätzen) wurden mithilfe des Peak-Annotation-Browsers (Zou et al., 2022). Um die G4-DNA-Abdeckung in H3K27ac-Peaks zu profilieren, wurden G4-DNA-Sequenzannotationen in binäre Abdeckungsdateien (Bigwig-Format) konvertiert und mit DeepTools (plotProfile, Version 3.5.4; Code wird im Abschnitt Datenverfügbarkeit bereitgestellt) analysiert. Die G4-DNA-Abdeckung wurde in H3K27ac-Peaks profiliert, die mit Promotoren, Genkörpern und distalen Regionen annotiert waren, sowie in Promotoren von Immungenen aus Cluster 1, die mit immunbezogenen Begriffen assoziiert waren.

H3K27ac-Abdeckungsprofilierung in Promotoren von Immungenen
Wir erstellten zwei Sätze von H3K27ac-Peaks, die Promotoren von Genen überlappten, die (a) eine erhöhte Expression als Reaktion auf SP-Stimulation zeigten ($\log_2FC > 1$, $FDR < 0,05$) und (b) immunassoziierte Gene aus Cluster 1 waren, annotiert mit immunbezogenen GO-Begriffen wie „Immun“, „Entzündlich“, „Zytokin“, „Chemokin“, „Leukozyt“ und „Lymphozyt“. Weitere Details finden Sie im Code unter „Datenverfügbarkeit“. Abdeckungsprofile für diese Peaks wurden mit DeepTools (plotProfile, Version 3.5.4) erstellt.

Für die Genontologie, den Zirkusplot und die Kegg-Pathway-Anreicherung wurden ChiPeakAnno (Version 3.34) oder Metascape verwendet (Love et al., 2014; Zhou et al., 2019).

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad) durchgeführt. Statistische Parameter (n-Wert, statistische Berechnung usw.) sind ebenfalls in der Bildlegende aufgeführt. P-Werte kleiner oder gleich 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Statistische Tests wurden wie in den Bildlegenden angegeben verwendet. Boxplots zeigen den Median sowie das obere und untere Quartil. Ausreißer werden als einzelne Punkte (außerhalb des 10.–90. Perzentils) dargestellt. Streupunktdiagramme zeigen den Mittelwert. Die Datenpunkte repräsentieren biologische Replikate. Alle Experimente wurden mindestens in technischen Duplikaten durchgeführt. Die Proben der verschiedenen Gruppen wurden hinsichtlich Alter, Geschlecht und Impfstatus abgeglichen. Ansonsten wurden alle Proben zufällig ausgewählt, und alle anderen Informationen wurden verblindet. Die Stichprobengrößen wurden in Abhängigkeit von der erwarteten Varianz und den verfügbaren Proben gewählt.

Grafik

Grafiken wurden mit BioRender.com und Adobe Illustrator erstellt.

Datenverfügbarkeit

Die im Rahmen dieser Studie generierten Daten sind im Europäischen Genom-Phänomen-Archiv (EGA) unter der Zugangsnummer hinterlegt. EGAS50000000341, das vom EBI und der CRG veranstaltet wird (<https://ega-archive.org/studies/EGAS50000000341>). Der Computercode ist verfügbar unter https://github.com/HaenselHertschEpiLab/Epigenetic_memory_of_SARS-CoV-2_vaccination_in_macrophagen.

Die Quelldaten dieses Dokuments sind im folgenden Datenbankeintrag gesammelt: [biostudies:S-SCDT-10_1038-S44320-025-00093-6](https://biostudies.ncbi.nlm.nih.gov/studies/S-SCDT-10_1038-S44320-025-00093-6).

Erweiterte Ansichtsdaten, ergänzende Informationen und Anhänge zu diesem Dokument finden Sie unter <https://doi.org/10.1038/s44320-025-00093-6>.

Peer-Review-Informationen

Eine Peer-Review-Datei ist verfügbar unter <https://doi.org/10.1038/s44320-025-00093-6>

Verweise

- Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB et al (2021) Wirksamkeit und Sicherheit des mRNA-1273 SARS-CoV-2-Impfstoffs. *New Engl J Med* 384:403–416
- Biffi G, Tannahill D, McCafferty J, Balasubramanian S (2013) Quantitative Visualisierung von DNA-G-Quadruplex-Strukturen in menschlichen Zellen. *Nat Chem* 5:182–186
- Cheong JG, Ravishankar A, Sharma S, Parkhurst CN, Grassmann SA, Wingert CK, Laurent P, Ma S, Paddock L, Miranda IC et al (2023) Epigenetisches Gedächtnis einer Coronavirus-Infektion in angeborenen Immunzellen und ihren Vorläuferzellen. *Cell* 186:3882–3902.e3824
- Esain-Garcia I, Kirchner A, Melidis L, Tavares RCA, Dhir S, Simeone A, Yu Z, Madden SK, Hermann R, Tannahill D et al (2024) Die G-Quadruplex-DNA-Struktur ist ein positiver Regulator der MYC-Transkription. *Proc Natl Acad Sci USA* 121:e2320240121
- Esnault C, Magat T, Zine El Aabidine A, Garcia-Oliver E, Cucchiari A, Bouhouika S, Lleres D, Goerke L, Luo Y, Verga D et al (2023) G4access identifiziert G-Quadruplexe und ihre Assoziationen mit offenem Chromatin und Imprinting-Kontrollregionen. *Nat Genet* 55:1359–1369
- Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, Garcia MU, Di Tommaso P, Nahnsen S (2020) Das NF-Core-Framework für Community-kuratierte Bioinformatik-Pipelines. *Nat Biotechnol* 38:276–278
- Fitzgerald KA, Kagan JC (2020) Toll-like-Rezeptoren und die Kontrolle der Immunität. *Zelle* 180:1044–1066
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R (2007) Genspezifische Kontrolle von Entzündung durch TLR-induzierte Chromatinmodifikationen. *Nature* 447:972–978
- Fulco CP, Nasser J, Jones TR, Munson G, Bergman DT, Subramanian V, Grossman SR, Anyoha R, Doughty BR, Patwardhan TA et al (2019) Aktivitäts-durch-Kontakt-Modell der Enhancer-Promoter-Regulierung durch Tausende von CRISPR-Störungen. *Nat Genet* 51:1664–1669
- Guilbaud G, Murat P, Recolin B, Campbell BC, Maiter A, Sale JE, Balasubramanian S (2017) Lokale epigenetische Reprogrammierung durch G-Quadruplex-Liganden. *Nat Chem* 9:1110–1117

- Hansel-Hertsch R, Beraldi D, Lensing SV, Marsico G, Zyner K, Parry A, Di Antonio M, Pike J, Kimura H, Narita M et al (2016) G-Quadruplex-Strukturen markieren menschliches regulatorisches Chromatin. *Nat Genet* 48:1267-1272
- Hansel-Hertsch R, Simeone A, Shea A, Hui WWI, Zyner KG, Marsico G, Rueda OM, Bruna A, Martin A, Zhang X et al (2020) Landschaft der G-Quadruplex-DNA-Strukturregionen bei Brustkrebs. *Nat Genet* 52:878-883
- Hsieh CL, Goldsmith JA, Schaub JM, DiVenere AM, Kuo HC, Javanmardi K, Le KC, Wrapp D, Lee AG, Liu Y, Chou CW, Byrne PO, Hjorth CK, Johnson NV, Ludes-Meyers J, Nguyen AW, Park J, Wang N, Amengor D, Lavinder JJ, Ippolito GC, Maynard JA, Finkelstein IJ, McLellan JS (2020) Strukturbasiertes Design präfusionsstabilisierter SARS-CoV-2-Spikes. *Science*. 369:1501-1505
- Iwasaki A, Medzhitov R (2010) Regulierung der adaptiven Immunität durch die angeborene Immunsystem. *Science* 327:291-295
- Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, Khan N, Mendonca LE, Pacis A, Tzelepis F, Pernet E, Dumaine A, Grenier JC et al (2018) BCG trainiert hämatopoetische Stammzellen, um eine schützende angeborene Immunität gegen Tuberkulose zu erzeugen. *Cell* 172:176-190.e119
- Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Joosten LA, Ifrim DC, Saeed S, Jacobs C, van Loenhout J, de Jong D, Stunnenberg HG et al (2012) Bacille Calmette-Guerin induziert NOD2-abhängigen unspezifischen Schutz vor einer erneuten Infektion durch epigenetische Reprogrammierung von Monozyten. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:17537-17542 Langmead B, Salzberg SL (2012) Schnelle gapped-read-Ausrichtung mit Bowtie 2. *Nat Methoden* 9:357-359
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) Das Sequenz-Alignment/Map-Format und SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079 Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderierte Schätzung der Faltungsänderung und Dispersion für RNA-seq-Daten mit DESeq2. *Genome Biol* 15:550 Makowski MM, Grawe C, Foster BM, Nguyen NV, Bartke T, Vermeulen M (2018) Globale Profilierung der Protein-DNA- und Protein-Nukleosom-Bindungsaffinitäten mittels quantitativer Massenspektrometrie. *Nat Commun* 9:1653
- Man SM, Karki R, Kanneganti TD (2017) Molekulare Mechanismen und Funktionen von Pyroptose, entzündliche Caspasen und Inflammasomen bei Infektionskrankheiten. *Immunol Rev* 277:61-75
- Mantovani A, Netea MG (2020) Trainierte angeborene Immunität, Epigenetik und COVID-19. *New Engl J Med* 383:1078-1080
- Marsico G, Chambers VS, Sahakyan AB, McCauley P, Boutell JM, Antonio MD, Balasubramanian S (2019) Experimentelle Karten des gesamten Genoms von DNA-G-Quadruplexen in mehreren Arten. *Nucleic Acids Res* 47:3862-3874 Meers MP, Tenenbaum D, Henikoff S (2019) Peak-Calling durch spärliche Anreicherung Analyse für CUT&RUN Chromatin-Profilierung. *Epigenet Chromatin* 12:42
- Miglietta G, Russo M, Duardo RC, Capranico G (2021) G-Quadruplex-Binder als Zytostatische Modulatoren angeborener Immungene in Krebszellen. *Nucleic Acids Res* 49:6673-6686
- Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Chen LS, Grzybek M, Grinenko T, Eugster A, Troullinaki M, Palladini A, Kourtzelis I et al (2018) Die Modulation von Myelopoese-Vorläuferzellen ist ein integraler Bestandteil der trainierten Immunität. *Cell* 172:147-161.e112 Moorlag S, Taks E, Ten Doesschate T, van der Vaart TW, Janssen AB, Muller L, Ostermann P, Dijkstra H, Lemmers H, Simonetti E et al (2022) Wirksamkeit der BCG-Impfung gegen Infektionen der Atemwege bei älteren Erwachsenen während der Coronavirus-Pandemie 2019. *Clin Infect Dis* 75:e938-e946 Naranbhai V, Garcia-Beltran WF, Chang CC, Berrios Mairena C, Thierauf JC, Kirkpatrick G, Onozato ML, Cheng J, St Denis KJ, Lam EC et al (2022) Vergleichende Immunogenität und Wirksamkeit der COVID-19-Impfstoffe mRNA-1273, BNT162b2 und Ad26.COV2.S. *J Infect Dis* 225:1141-1150
- Netea MG, Dominguez-Andres J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, Joosten LAB, van der Meer JWM, Mhlanga MM, Mulder WJM et al (2020) Definition trainierter Immunität und ihre Rolle bei Gesundheit und Krankheit. *Nat Rev Immunol* 20:375-388
- Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ (2016) Trainierte Immunität: ein Programm des angeborenen Immungedächtnisses bei Gesundheit und Krankheit. *Science* 352:aaf1098
- Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, Perez JL, Perez Marc G, Moreira ED, Zerbini C et al (2020) Sicherheit und Wirksamkeit des BNT162b2 mRNA-Impfstoffs gegen Covid-19. *New Engl J Med* 383:2603-2615 Quinlan AR, Hall IM (2010) BEDTools: eine flexible Suite von Dienstprogrammen zum Vergleichen Genomische Merkmale. *Bioinformatik* 26:841-842
- Quintin J, Saeed S, Martens JHA, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ifrim DC, Logie C, Jacobs L, Jansen T, Kullberg BJ, Wijmenga C et al (2012) Eine Infektion mit *Candida albicans* bietet Schutz vor einer erneuten Infektion durch funktionelle Reprogrammierung von Monozyten. *Cell Host Microbe* 12:223-232
- R Core Team (2021) R: Eine Sprache und Umgebung für statistische Berechnungen. Version 4.1.1. R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich. <https://www.R-project.org/>
- Saeed S, Quintin J, Kerstens HH, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, Cheng SC, Ratter J, Berentsen K, van der Ent MA et al (2014) Epigenetische Programmierung der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung und trainierte angeborene Immunität. *Science* 345:1251086
- Sanchez-Ramon S, Conejero L, Netea MG, Sancho D, Palomares O, Subiza JL (2018) Auf trainierter Immunität basierende Impfstoffe: ein neues Paradigma für die Entwicklung breitbandiger antiinfektiöser Formulierungen. *Front Immunol* 9:2936
- Sherwood ER, Burelbach KR, McBride MA, Stothers CL, Owen AM, Hernandez A, Patil NK, Williams DL, Bohannon JK (2022) Angeborenes Immungedächtnis und die Wirtsreaktion auf eine Infektion. *J Immunol* 208:785-792
- Skene PJ, Henikoff S (2017) Eine effiziente zielgerichtete Nuklease-Strategie für hoch-Auflösungskartierung von DNA-Bindungsstellen. *eLife* 6:e21856
- Sonnenberg GF, Hepworth MR (2019) Funktionelle Interaktionen zwischen angeborenen Lymphoide Zellen und adaptive Immunität. *Nat Rev Immunol* 19:599-613 Spiegel J, Cuesta SM, Adhikari S, Hansel-Hertsch R, Tannahill D, Balasubramanian S (2021) G-Quadruplexe sind Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen im menschlichen Chromatin. *Genome Biol* 22:117
- Stephens M (2017) Falsche Entdeckungsraten: ein neuer Deal. *Biostatistik* 18:275-294
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES et al (2005) Gensatzanreicherungsanalyse: ein wissenschaftlicher Ansatz zur Interpretation genomweiter Expressionsprofile. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15545-15550
- Sun SJ, Aguirre-Gamboa R, de Bree LCJ, Sanz J, Dumaine A, van der Velden W, Joosten LAB, Khader S, Divangahi M, Netea MG et al (2024) Die BCG-Impfung verändert die epigenetische Landschaft von Vorläuferzellen im menschlichen Knochenmark und beeinflusst so die angeborene Immunantwort. *Immunity* 57:2095-2107.e2098 Swanson KV, Deng M, Ting JP (2019) Das NLRP3-Inflammasom: molekulare Aktivierung und Regulierung für Therapeutika. *Nat Rev Immunol* 19:477-489
- Tahtinen S, Tong AJ, Himmels P, Oh J, Paler-Martinez A, Kim L, Wichner S, Oei Y, McCarron MJ, Freund EC et al (2022) IL-1 und IL-1ra sind Schlüsselregulatoren der Entzündungsreaktion auf RNA-Impfstoffe. *Nat Immunol* 23:532-542
- Ten Doesschate T, van der Vaart TW, Debisarun PA, Taks E, Moorlag S, Paternotte N, Boersma WG, Kuiper VP, Roukens AHE, Rijnders BJA et al (2022) Bacillus Calmette-Guerin-Impfstoff zur Reduzierung der Abwesenheit von Gesundheitspersonal während der COVID-19-Pandemie, eine randomisierte kontrollierte Studie. *Clin Microbiol Infect* 28:1278-1285
- Theobald SJ, Simonis A, Georgomanolis T, Kreer C, Zehner M, Eisfeld HS, Albert MC, Chhen J, Motameny S, Erger F et al (2021) Die Neuprogrammierung langlebiger Makrophagen treibt die Spike-Protein-vermittelte Inflammasom-Aktivierung bei COVID-19 voran. *EMBO Mol Med* 13:e14150
- Theobald SJ, Simonis A, Mudler JM, Gobel U, Acton R, Kohlhas V, Albert MC, Hellmann AM, Malin JJ, Winter S et al (2022) Milz-Tyrosinkinase vermittelt angeborene und adaptive Immunitätsinteraktion bei der SARS-CoV-2-mRNA-Impfung. *EMBO Mol Med* 14:e15888

- Upton CM, van Wijk RC, Mockeliunas L, Simonsson USH, McHarry K, van den Hoogen G, Muller C, von Delft A, van der Westhuizen HM, van Crevel R et al (2022) Sicherheit und Wirksamkeit der BCG-Wiederholungsimpfung im Zusammenhang mit der COVID-19-Morbidität bei Beschäftigten im Gesundheitswesen: eine doppelblinde, randomisierte, kontrollierte Phase-3-Studie. *EClinicalMedicine* 48:101414
- Van Den Eeckhout B, Tavernier J, Gerlo S (2020) Interleukin-1 als angeborener Mediator der T-Zell-Immunität. *Front Immunol* 11:621931
- Verbeke R, Hogan MJ, Lore K, Pardi N (2022) Angeborene Immunmechanismen von mRNA-Impfstoffe. *Immunity* 55:1993–2005
- Wang Z, Zang C, Rosenfeld JA, Schones DE, Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Peng W, Zhang MQ et al (2008) Kombinatorische Muster von Histonacetylierungen und -methylierungen im menschlichen Genom. *Nat Genet* 40:897–903 Whitelaw DM (1966) Die intravaskuläre Lebensdauer von Monozyten. *Blood* 28:455–464 Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS (2020) Kryo-EM-Struktur des 2019-nCoV-Spikes in der Präfusionskonformation. *Science*. 367:1260–1263
- Yamaguchi Y, Kato Y, Edahiro R, Sondergaard JN, Murakami T, Amiya S, Nameki S, Yoshimine Y, Morita T, Takeshima Y et al (2022) Konsekutive BNT162b2-mRNA-Impfung induziert kurzfristiges epigenetisches Gedächtnis in angeborenen Immunzellen. *JCI Insight* 7:e163347
- Yang ZR, Jiang YW, Li FX, Liu D, Lin TF, Zhao ZY, Wei C, Jin QY, Li XM, Jia YX et al (2023) Wirksamkeit von SARS-CoV-2-Impfstoffen und die Dosis-Wirkungs-Beziehung mit drei wichtigen Antikörpern: eine systematische Überprüfung und Metaanalyse randomisierter kontrollierter Studien. *Lancet Microbe* 4:e236–e246 Yu G, Wang LG, Han Y, He QY (2012) clusterProfiler: ein R-Paket für Vergleich biologischer Themen zwischen Genclustern. *OMICS* 16:284–287 Zaret KS, Carroll JS (2011) Pioneer-Transkriptionsfaktoren: Feststellung der Kompetenz für die Genexpression. *Genes Dev* 25:2227–2241
- Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK (2019) Metascape bietet eine biologienorientierte Ressource für die Analyse von Datensätzen auf Systemebene. *Nat Commun* 10:1523
- Zou Z, Ohta T, Miura F, Oki S (2022) ChIP-Atlas 2021 Update: ein Data-Mining Suite zur Erforschung epigenomischer Landschaften durch vollständige Integration von ChIP-seq-, ATAC-seq- und Bisulfiteq-seq-Daten. *Nucleic Acids Res* 50:W175–W182

Danksagung

AS wird gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (01KI2108) (Nachwuchsgruppen Infektionskrankheiten), ein Stipendium des Cologne Clinician Scientist Program (CCSP), gefördert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) (FI 773/15-1), und das Career Advancement Groups Program des Zentrums für Molekulare Medizin Köln, Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Köln, Universität zu Köln. JR wird gefördert durch die DFG (SFB1403), das Deutsche Zentrum für Infektionsforschung (DZIF; TTU-TB-Zuschüsse 02.913 und 02.814), BMBF (IdEpiCo), das Horizon 2020-Programm der Europäischen Union (ERA4TB) und COVIM, Teil des „Netzwerks Universitätsmedizin (NUM)“, gefördert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) („NUM 2.0“-Zuschussnummer: 01KX2121). ST und JR werden durch ein Forschungsstipendium des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (CMCC – B10) und ST durch ein Stipendium der Imhoff-Stiftung und Cologne Fortune unterstützt. Die Arbeit im PT-Labor wird von der Max-Planck-Gesellschaft und Mitteln der deutschen Exzellenzstrategie (CECAD; EXC 2030-390661388) gefördert. RH-H erhält Fördermittel durch das Zentrum für Molekulare Medizin Köln, den DFG CRC1399 (INST 216/1057-2), die Fritz Thyssen Stiftung (10.22.1.010MN), CANTAR, das durch das Programm „Netzwerke 2021“, eine Initiative des Ministeriums für Kultur und Wissenschaft des Landes Nordrhein-Westfalen, gefördert wird, die DFG HA 8562/4-1 und DFG RU5504 (HA 8562/5-1) sowie den DFG CRC1678 (INST 216/1317-1). Die Autoren danken Dr. Tony Müller (www.tru-id.de) für das kritische Lesen und die Vorbereitung des Manuskripts.

Autorenbeiträge

Alexander Simonis:Konzeptualisierung; Datenkuratierung; Formale Analyse; Überwachung; Mittelbeschaffung; Validierung; Untersuchung; Visualisierung; Methodik; Schreiben – Originalentwurf; Projektverwaltung.Sebastian J Theobald: Konzeptualisierung; Datenkuratierung; formale Analyse; Überwachung; Validierung; Untersuchung; Visualisierung; Methodik; Schreiben – Originalentwurf; Projektverwaltung.Anna Eva Koch:Formale Analyse; Untersuchung; Visualisierung; Methodik.Ram Mummadavarapu:Datenkuratierung; formale Analyse; Validierung; Untersuchung; Methodik; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Julie M Mudler:Formale Analyse; Untersuchung; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung. Andromachi Pouikli: Untersuchung; Methodik; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Ulrike Göbel:Ressourcen; Datenkuratierung; Software; Formale Analyse; Validierung; Untersuchung; Visualisierung; Methodik; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Richard Acton:Software; Formale Analyse; Validierung; Untersuchung; Visualisierung; Methodik; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Sandra Winter:Untersuchung.Alexandra Albus:Formale Analyse; Untersuchung; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Dmitriy Holzmann:Untersuchung. Marie-Christine Albert:Untersuchung.Michael Hallek:Ressourcen; Schreiben – Überprüfen und Bearbeiten.Henning Walczak:Ressourcen; Schreiben – Überprüfen und Bearbeiten.Thomas Ulas: Ressourcen; Datenkuratierung; Software.Manuel Koch:Untersuchung; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung.Peter Tessarz:Konzeptualisierung; Ressourcen; Datenkuratierung; Formale Analyse; Überwachung; Mittelbeschaffung; Validierung; Untersuchung; Methodik; Schreiben – Originalentwurf; Projektverwaltung.Robert Hänsel-Hertsch: Konzeptualisierung; Ressourcen; Software; Formale Analyse; Überwachung; Mittelbeschaffung; Validierung; Untersuchung; Visualisierung; Methodik; Schreiben – Originalentwurf; Projektverwaltung.Jan Rybniker: Konzeptualisierung; Ressourcen; Überwachung; Mittelbeschaffung; Validierung; Methodik; Schreiben – Originalentwurf; Projektverwaltung.

Die den Abbildungen in diesem Dokument zugrunde liegenden Quelldaten können einer individuellen Urheberschaft zugeordnet sein. Soweit verfügbar, ist die Urheberschaft der Abbildungen/ Quelldaten im folgenden Datenbankeintrag aufgeführt:[biostudies:S-SCDT-10_1038-S44320-025-00093-6](https://www.ebi.ac.uk/biostudies/studies/S-SCDT-10_1038-S44320-025-00093-6).

Finanzierung

Open Access-Finanzierung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

Offenlegung und Erklärung zu Interessenkonflikten

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte bestehen.

Offener ZugangDieser Artikel unterliegt der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz. Diese erlaubt dessen Nutzung, Weitergabe, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz angeben und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstigen Drittmaterialien unterliegen der Creative Commons Lizenz des Artikels, sofern im Quellenvermerk nichts anderes angegeben ist. Sofern das Material nicht unter die Creative Commons Lizenz des Artikels fällt und Ihre beabsichtigte Nutzung nicht durch gesetzliche Bestimmungen erlaubt ist oder über die erlaubte Nutzung hinausgeht, müssen Sie die Genehmigung des Rechteinhabers einholen. Diese Lizenz finden Sie unter<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>Verzichtserklärung zur Creative Commons Public Domain-Widmung<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>gilt für die mit diesem Artikel verknüpften Daten, sofern im Quellennachweis nichts anderes angegeben ist, nicht jedoch für die grafischen oder kreativen Elemente von Abbildungen, Diagrammen oder Bildern. Dieser Verzicht beseitigt rechtliche Hürden für die Wiederverwendung und Auswertung von Forschungsdaten. Gemäß gängiger wissenschaftlicher Praxis wird empfohlen, soweit technisch möglich, entsprechende Zitate und Quellenangaben anzugeben.

© Der/Die Autor(en) 2025

Erweiterte Ansichtsfiguren

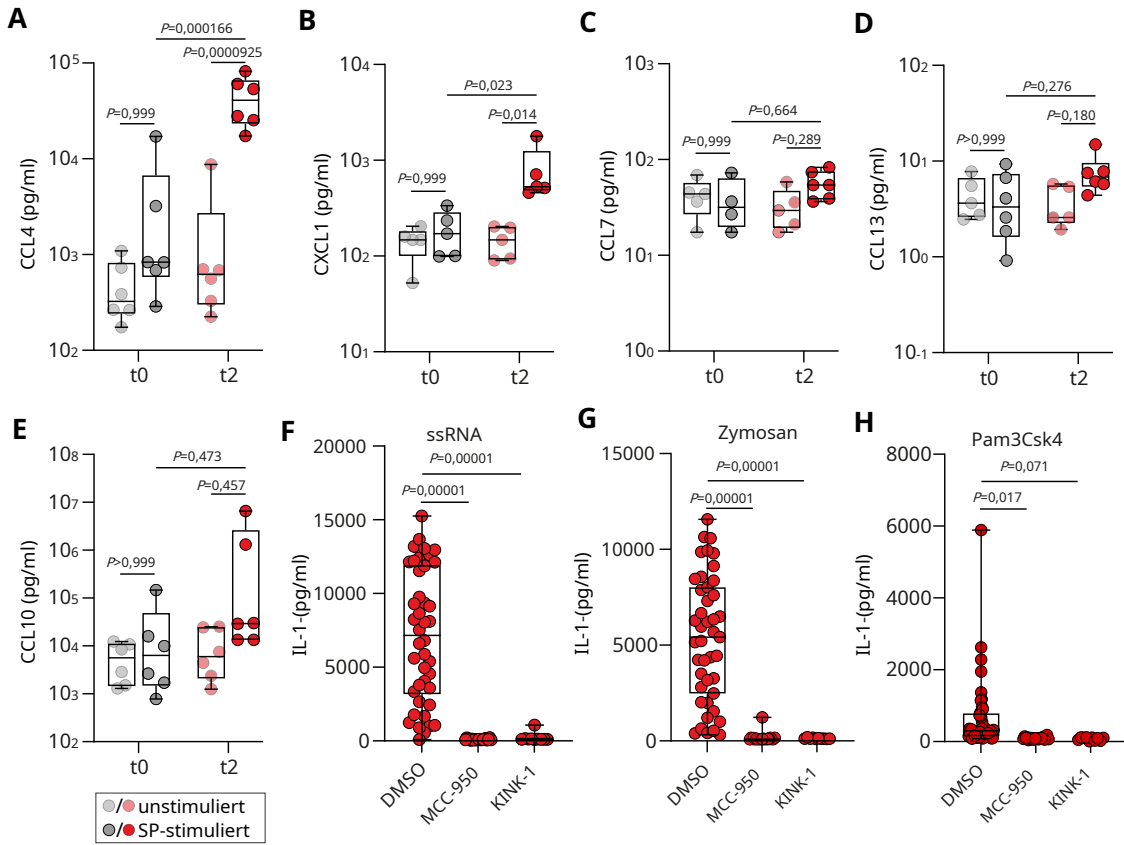
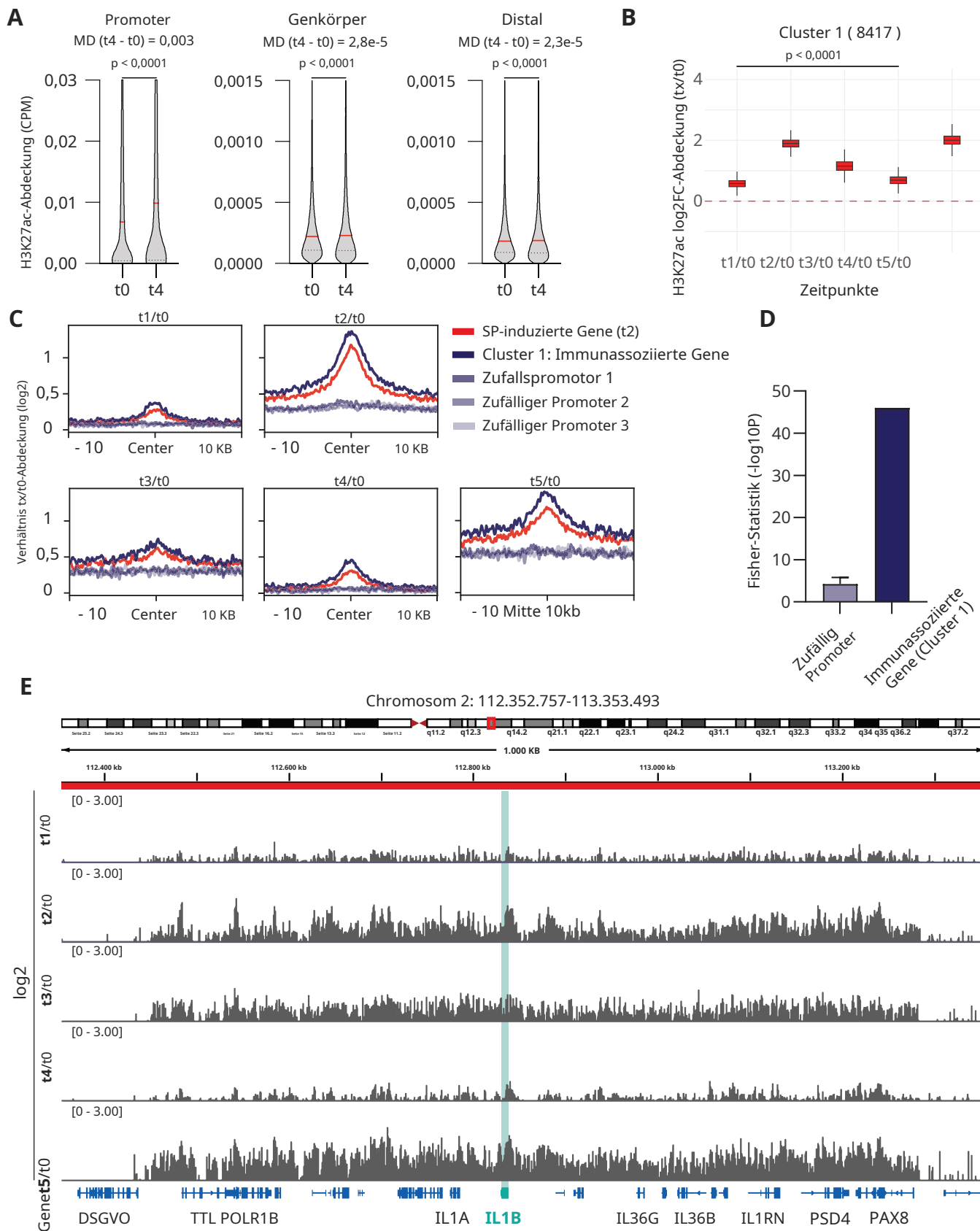


Abbildung EV1. Inflammasom-abhängige Sekretion von IL-1 β in Makrophagen nach Impfung.

(A) Monozyten wurden durch CD14+-Selektion aus Blutproben von ungeimpften (t0) isoliert (n =6) (grau) und geimpfte Personen (t2) (n =6) (rot) wurden ausgesät und 5 Tage lang in Gegenwart von M-CSF inkubiert. Differenzierte Makrophagen wurden mit SP stimuliert (t0: dunkelgraue Punkte; t2: dunkelrote Punkte) oder unstimuliert gelassen (t0: hellgraue Punkte; t2: hellrote Punkte). Die Konzentrationen von CCL4, CXCL1 (B), CCL7 (C), CXCL13 (D) und CXCL10 (E), wurden mittels Multiplexanalysen ermittelt. Für die statistische Analyse wurde eine zweifaktorielle ANOVA mit Sidak-Multiple-Vergleichsanalyse verwendet. Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte.

(F) Aus Monozyten stammende Makrophagen von Spendern vor (t0) und 2 Wochen nach der zweiten Impfung (t2) wurden wie in (A) beschrieben erzeugt. Differenzierte Makrophagen wurden mit ssRNA, Zymosan (G) oder Pam3Csk4 (H) für 4 h in Gegenwart von MCC950 (10 μ M) (n =20), KINK-1 (5 μ M) (n =10) oder unbehandelt. Die IL-1 β -Sekretion wurde mittels ELISA quantifiziert. Zur statistischen Analyse wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Dunnetts multiplem Vergleichstest verwendet, bei dem MCC950/KINK-1 behandelte Zellen mit unbehandelten Zellen verglichen wurden. Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren den technischen Mittelwert eines unabhängigen Experiments. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

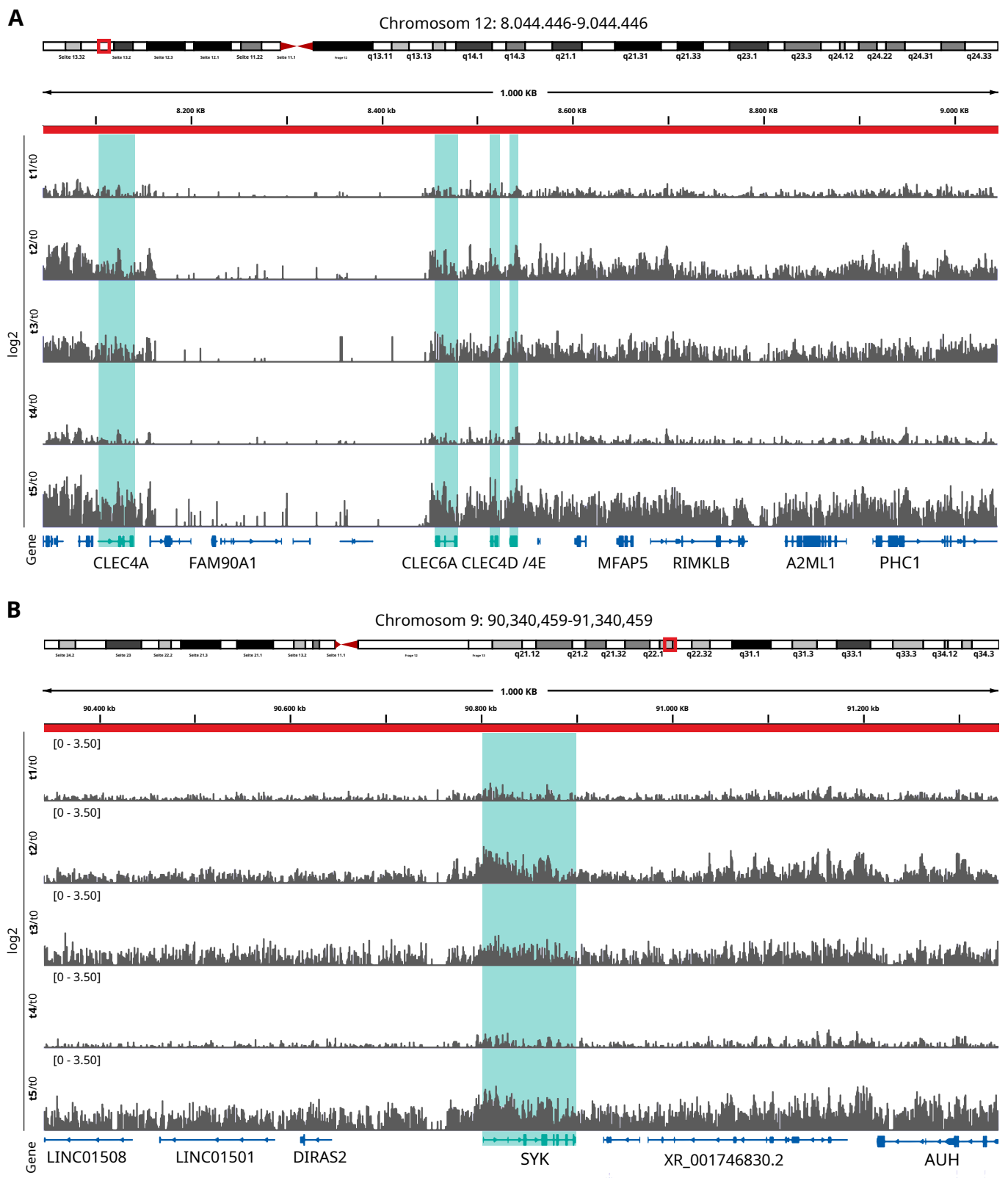


Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:d6e3:220e:8372.



Abbildung EV2. H3K27ac-Abdeckung über verschiedene Genregionen und Cluster.

(A) Verteilung der normalisierten (Zählungen pro Million) H3K27ac-Abdeckung in den Peaks von Promotoren (1 kb stromaufwärts bis 250 bp stromabwärts der Transkriptionsstartstellen [TSS]) (links), Genkörpern (251 bp stromabwärts von TSS bis zu Transkriptionseinstellen [TES]) (Mitte) und distalen Regionen (1 kb bis 100 kb entfernt von TSS und TES) (rechts). Alle Verteilungsvergleiche unterscheiden sich signifikant ($P < 0,0001$). Die Werte wurden mithilfe eines Wilcoxon-Tests berechnet. P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen. Der Medianunterschied (MD) zwischen t_4 und t_0 ist für alle drei Genomregionen angegeben. (B) H3K27ac-Abdeckung dargestellt als Veränderung (\log_2) über die Zeitpunkte (t_1 - t_5) im Verhältnis zu t_0 für alle Gene, die Teil von Cluster 1 sind. (C) Veränderung der H3K27ac-Abdeckung in tx im Vergleich zu t_0 in H3K27ac-Peaks, die mit ausgewählten Genpromotoren aus SP-stimulierten Genen überlappen ($n = 576$), Cluster 1 immunassoziierte Gene ($n = 333$), Zufallspromotor 1 ($n = 333$), Zufallspromotor 2 ($n = 333$), Zufallspromotor 3 ($n = 333$). (D) Fisher-Statistik ($-\log_{10}P$) der H3K27ac-Peaks im SP-induzierten Genpromotor, die sich mit H3K27ac-Peaks im Cluster-1-Immungenpromotor oder H3K27ac-Peaks im Zufallspromotor überschneiden. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichung der Fisher-Statistik von den drei zufällig verteilten H3K27ac-Peaks in allen annotierten Promotoren an. (E) Genom-Browser-Ansicht von 1000 kb des Chromosoms 2, Anzeige des Verhältnisses (\log_2) von tx zur mittleren H3K27ac-Abdeckung t_0 über die Zeitpunkte hinweg.



Heruntergeladen von <https://www.embopress.org> am 1. April 2025 von IP 2003:c8:1f41:7300:c8ee:d6e3:20e:8372.

Abbildung EV3. H3K27ac-Abdeckung zu verschiedenen Impzeitpunkten.

(A) Genom-Browser-Ansicht von 1000 kb des Chromosoms 12 und 9 (B), Anzeige des Verhältnisses (\log_2) von tx zur durchschnittlichen H3K27ac-Abdeckung von t0 über die Zeitpunkte hinweg.

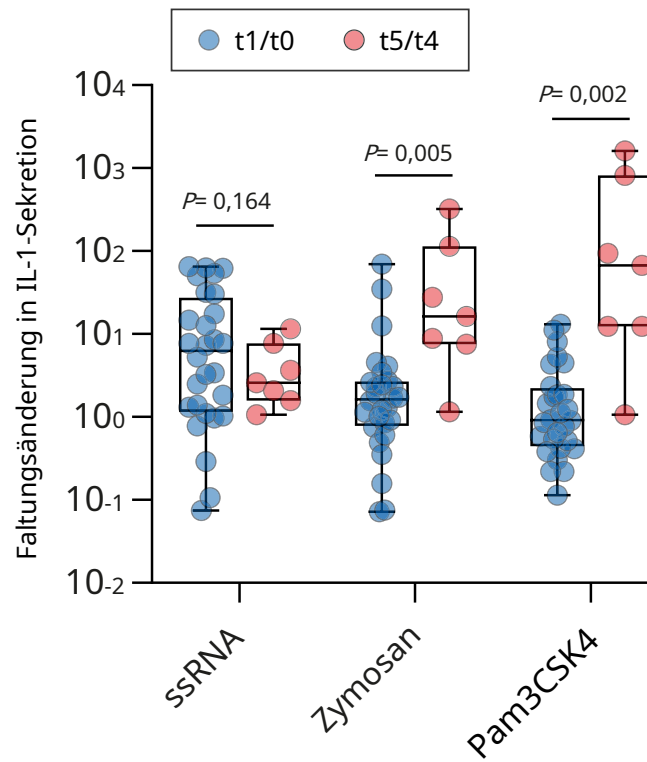


Abbildung EV4. Zytokinfreisetzung vor und nach der dritten Auffrischungsdosis Impfung.

Fold Veränderung der L-1 β -Freisetzung nach Stimulation mit ssRNA, Zymosan oder Pam3CSK4 zwischen t1/t0 (n =28) (blau) und t5/t4 (n =7) (rot). Für die statistische Analyse wurde ein mehrfaches ungepaartesTEs wurde ein Test verwendet. Boxplots zeigen den Median, das obere und untere Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte. Die dargestellten Datenpunkte repräsentieren den technischen Mittelwert eines unabhängigen Experiments.