



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος πολυμορφισμών των γονιδίων *RIG-I* (rs10813831) και *CD40* (rs1883832) στις αντισωματικές απαντήσεις μετά από εμβολιασμό έναντι του ιού SARS-CoV-2

Μπακαρός Θ. Ευάγγελος

Φαρμακοποιός

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας & Κλινικής Μικροβιολογίας
- Γιαννακούλας Νικόλαος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας – Αιματολογίας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Μοριακή Ανοσολογία-Ανοσογενετική

Λάρισα, Οκτώβριος 2021



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

**The role of *RIG-I* (rs10813831) and *CD40* (rs1883832)
gene polymorphisms in the antibody responses
to SARS-CoV-2 vaccination**

Bakaros T. Evangelos

Pharmacist

Examination Committee

- Speletas Matthaïos, Professor of Medical Immunology, Supervisor
- Petinaki Efthimia, Professor of Medical Biopathology & Clinical Microbiology
- Giannakoulas Nikolaos, Associate Professor of Hematology – Pathology

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Molecular Immunology-Immunogenetics

Larissa, October 2021

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	7
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	10
1. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19: ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ, ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	11
1.1. Οι κορωνοϊοί ως παθογόνα	11
1.2. Η εξάπλωση του ιού SARS-CoV-2 και η εξέλιξη της νόσου COVID-19 σε πανδημία ..	12
1.3. Δομή των σωματιδίων του ιού SARS-CoV-2 και οργάνωση του γονιδιώματός του	13
1.4. Ο κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2	15
1.5. Συμπτώματα και κλινικές εκδηλώσεις της νόσου COVID-19	17
2. ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-CoV-2 ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΥΤΑ	18
2.1. Η ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών εμβολίων	18
2.2. Συστήματα ανάπτυξης εμβολίων έναντι του ιού SARS-CoV-2	19
2.3. Μηχανισμός δράσης των εμβολίων mRNA έναντι του ιού SARS-CoV-2	20
2.4. Επίδραση γενετικών παραγόντων στις ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται από εμβολιασμό	22
2.5. Ο ρόλος του υποδοχέα RIG-I στην ανοσιακή απάντηση και ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) του αντίστοιχου γονιδίου	25
2.6. Ο ρόλος του μορίου CD40 στην ανοσιακή απάντηση και ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του αντίστοιχου γονιδίου	26
3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	28
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
4.1. Πληθυσμός μελέτης	29
4.2. Συλλογή δειγμάτων	30
4.3. Υλικά και αντιδραστήρια	30
4.3.1. Διαλύτες/Αραιωτικά μέσα	30
4.3.2. Αντιδραστήρια ενίσχυσης και ηλεκτροφόρησης DNA	30
4.3.3. Ένζυμα περιορισμού	31
4.3.4. Εμπορικά διαθέσιμα σετ αντιδραστηρίων (kits)	31
4.4. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα	31
4.5. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου RIG-I	32

4.6. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου CD40	35
4.7. Προσδιορισμός IgG αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2	38
4.8. Προσδιορισμός IgA αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2	38
4.9. Στατιστική επεξεργασία των πειραμάτων αποτελεσμάτων	39
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	40
5.1. Επίδραση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου RIG-I στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις μετά τον εμβολιασμό	40
5.2. Επίδραση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου CD40 στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις μετά τον εμβολιασμό	44
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	51

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Σπελέτα Ματθαίο, Καθηγητή Ιατρικής Ανοσολογίας του τμήματος Ιατρικής Π.Θ., τόσο για την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας όσο και για το γεγονός ότι μου εμπιστεύτηκε ένα τόσο επίκαιρο και ενδιαφέρον ερευνητικό αντικείμενο. Μου έκανε ιδιαίτερη εντύπωση η ενεργή συμμετοχή που μου εξασφάλισε στην επιλογή του θέματος και η ευνοϊκή στάση του απέναντι σε νέες ιδέες και προτάσεις. Η στήριξη του επιβλέποντα Καθηγητή μου καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν απεριόριστη και η καθοδήγησή του συνέβαλε αποφασιστικά στη βελτιστοποίηση των εφαρμοζόμενων πρακτικών και στην επίλυση προβλημάτων που τυχόν προέκυπταν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Για τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση και την αξιολόγηση αυτής της εργασίας θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την κ. Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας & Κλινικής Μικροβιολογίας του τμήματος Ιατρικής Π.Θ. και τον κ. Γιαννακούλα Νικόλαο, Επίκουρο Καθηγητή Παθολογίας – Αιματολογίας του τμήματος Ιατρικής Π.Θ.

Ένα μεγάλο «ευχαριστώ» θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα, κ. Βουλγαρίδη Ιωάννα, Ιατρό – Βιοπαθολόγο, για τη στήριξη που μου προσέφερε σε προσωπικό και εργαστηριακό επίπεδο, καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της στη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω τις κ. Ραφτοπούλου Σοφία και Τσιντή Γερασιμίνα, υποψήφιες διδάκτορες, καθώς και την κ. Φουσίκα Αθανασία, για τη συμβολή τους σε θέματα τεχνογνωσίας από τις πρώτες κιόλας μέρες της μεταπτυχιακής μου εκπαίδευσης. Ευχαριστώ, επίσης, θερμά και όλους τους υπόλοιπους συνεργάτες του Εργαστηρίου Ανοσολογίας – Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Π.Θ., προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές, για την εποικοδομητική συνεργασία που αναπτύξαμε και τις γνώσεις που μοιραστήκαμε όλο αυτό το διάστημα.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στο προσωπικό του εργαστηρίου Ανοσολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας, ιδιαίτερα στις Ιατρούς – Βιοπαθολόγους, κ. Σάρρου Στυλιανή και κ. Θεοδορίδου Αικατερίνη, για τη βοήθειά τους στην καταγραφή και τον χειρισμό των δειγμάτων και στις μετρήσεις των αντισωμάτων, αντίστοιχα. Η προθυμία τους να συνδράμουν στην εκπόνηση αυτής της εργασίας και να μοιραστούν την εργαστηριακή εμπειρία τους είναι αξιοσημείωτη. Στην ολοκλήρωση της παρούσας διπλωματικής εργασίας συνέβαλε καθοριστικά και η συνεργασία που αναπτύξαμε με το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής Π.Θ., με διευθυντή τον Καθηγητή κ. Χρήστο Χατζηχριστοδούλου, τον οποίο και τους συνεργάτες του ευχαριστώ εξίσου.

Τέλος, δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, αλλά και τους αγαπημένους μου φίλους, για την αμέριστη συμπαράστασή τους σε αυτό το στάδιο των σπουδών μου.

Μπακαρός Θ. Ευάγγελος

Φαρμακοποιός

Λάρισα, Οκτώβριος 2021

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ACE2	<u>A</u> ngiotensin- <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme 2
ARDS	<u>A</u> cute <u>R</u> espiratory <u>D</u> istress <u>S</u> yndrome
BCR	<u>B</u> <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor
CARD	<u>C</u> aspase <u>A</u> ctivation and <u>R</u> ecruitment <u>D</u> omain
CD40	<u>C</u> luster of <u>d</u> ifferentiation 40
CD40L	CD40 <u>L</u> igand
CMIA	<u>C</u> hemiluminescent <u>M</u> icroparticle <u>I</u> mmuno <u>a</u> ssay
COVID-19	<u>C</u> oronav <u>i</u> rus <u>D</u> isease 201 <u>9</u>
CoV	<u>C</u> oronav <u>i</u> rus
CSR	<u>C</u> lass- <u>s</u> witch <u>R</u> ecombination
CTD	<u>C</u> arboxy- <u>t</u> erminal <u>D</u> omain
CTL	<u>C</u> ytotoxic <u>L</u> ymphocyte
DC	<u>D</u> endritic <u>C</u> ell
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay
ER	<u>E</u> ndoplasmic <u>R</u> eticulum
ERGIC	<u>E</u> R- <u>G</u> olgi intermediate <u>c</u> ompartment
EUA	<u>E</u> mergency <u>U</u> se <u>A</u> uthorization
FP	<u>F</u> usion <u>P</u> eptide
GC	<u>G</u> erminal <u>C</u> enter
HCoV	<u>H</u> uman <u>C</u> oronav <u>i</u> rus
HLA	<u>H</u> uman <u>L</u> eukocyte <u>A</u> ntigen
HPV	<u>H</u> uman <u>P</u> apilloma <u>V</u> irus
HR	<u>H</u> eptad <u>R</u> epeat
ICTV	<u>I</u> nternational <u>C</u> ommittee on <u>T</u> axonomy of <u>V</u> iruses
LNP	<u>L</u> ipid <u>n</u> anoparticle
MAVS	<u>M</u> itochondrial <u>A</u> ntiviral- <u>s</u> ignaling protein
MERS-CoV	<u>M</u> iddle <u>E</u> ast <u>R</u> espiratory <u>S</u> yndrome <u>C</u> oronav <u>i</u> rus
MHC	<u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex
MMR	<u>M</u> easles, <u>M</u> umps and <u>R</u> ubella
mRNA	<u>m</u> essenger RNA

Nsp	<u>N</u> on- <u>s</u> tructural <u>p</u> rotein
ORF	<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PHEIC	<u>P</u> ublic <u>H</u> ealth <u>E</u> mergency of <u>I</u> nternational <u>C</u> oncern
PRR	<u>P</u> attern <u>R</u> ecognition <u>R</u> eceptor
PvDBP	<i>Plasmodium vivax</i> <u>D</u> uffy <u>B</u> inding <u>P</u> rotein
RBD	<u>R</u> eceptor- <u>b</u> inding <u>d</u> omain
RdRp	<u>R</u> NA- <u>d</u> eependent <u>R</u> NA polymerase
RFLP	<u>R</u> estriction <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
RIG-I	<u>R</u> etinoic acid- <u>i</u> nducible <u>g</u> ene <u>I</u>
RTC	<u>R</u> eplicase- <u>t</u> ranscriptase <u>c</u> omplex
S (protein)	<u>S</u> pike protein
SARS-CoV-1/2	<u>S</u> evere <u>A</u> cute <u>R</u> espiratory <u>S</u> yndrome <u>C</u> oronavirus 1/2
SHM	<u>S</u> omatic <u>H</u> yper <u>m</u> utation
SNP	<u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism
ssRNA	single- <u>s</u> tranded, <u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid
TMPRSS2	Transmembrane Serine Protease 2
TNFRSF5	<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor <u>S</u> uperfamily member 5
URTIs	<u>U</u> pper <u>R</u> espiratory <u>T</u> ract <u>I</u> nfections
UTR	<u>U</u> ntranslated <u>R</u> egion
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πανδημία COVID-19, που προκλήθηκε από τον ιό SARS-CoV-2, έχει αφαιρέσει μέχρι σήμερα εκατομμύρια ανθρώπινες ζωές και εξακολουθεί να αποτελεί μια παγκόσμια απειλή για τη δημόσια υγεία, την οικονομία και την κοινωνία. Ο μαζικός εμβολιασμός αποτελεί την πιο υποσχόμενη λύση για τη διαχείριση της πανδημίας COVID-19, δεδομένου ότι, πέρα από την ατομική προστασία που παρέχει, έχει επίσης την ικανότητα να επάγει ανοσία στο σύνολο του πληθυσμού. Οι ανοσιακές απαντήσεις έναντι των εμβολίων διαφέρουν σημαντικά από άτομο σε άτομο. Ένας από τους σπουδαιότερους παράγοντες που ευθύνονται για την ετερογένεια των ανοσιακών απαντήσεων που επάγονται από εμβολιασμό είναι το γενετικό υπόβαθρο των εμβολιαζόμενων ατόμων. Προηγούμενες μελέτες έχουν επισημάνει ότι πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση είναι δυνατό να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα του εμβολιασμού. Οι πολυμορφισμοί rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* και rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40*, έχουν συσχετιστεί με μεταβολές στα επίπεδα των παραγόμενων IgG αντισωμάτων, μετά από εμβολιασμό ή λοίμωξη, αντίστοιχα. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διερευνήθηκε η επίδραση των δύο προηγούμενων γενετικών πολυμορφισμών στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά από ενεργητική ανοσοποίηση έναντι του ιού SARS-CoV-2, με εμβόλιο mRNA. Στη μελέτη συμμετείχαν 340 άτομα, σε καθένα από τα οποία χορηγήθηκαν δύο δόσεις του εμβολίου BNT162b2 (Pfizer/BioNTech). Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών που προαναφέρθηκαν στο γονιδίωμα των εμβολιασμένων ατόμων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR-RFLP. Τα επίπεδα των IgG και IgA αντισωμάτων στον ορό προσδιορίστηκαν με ανοσολογικές μεθόδους (CMIA και ELISA, αντίστοιχα), σε χρονικά διαστήματα 21, 42 και 96 ημερών από τη χορήγηση της πρώτης δόσης του εμβολίου. Σύμφωνα με τα πειραματικά μας ευρήματα, άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T του γονιδίου *CD40* [rs1883832 (c.-1C>T)] παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερο τίτλο IgA αντισωμάτων στον ορό, τόσο στις 42 όσο και στις 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό. Αντίθετα, η παρουσία του παραπάνω πολυμορφισμού δεν επηρέασε τα επίπεδα των IgG αντισωμάτων. Τέλος, ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* δε φάνηκε να έχει σημαντική επίδραση ούτε στις IgG ούτε στις IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά τον εμβολιασμό. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* θα μπορούσε να αποτελέσει έναν χρήσιμο γενετικό δείκτη για την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού έναντι του ιού SARS-CoV-2, με σκεύασμα mRNA (BNT162b2).

ABSTRACT

COVID-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has resulted in significant loss of life and continues to pose a global threat to public health, the economy and society. Massive vaccination represents one of the most promising strategies to control COVID-19 pandemic, as it has the ability not only to provide individual protection but also to induce herd immunity. Vaccine-induced immune responses are significantly different among individuals. One of the major factors contributing to the heterogeneity of the immune responses to vaccination is the genetic background of the vaccinated individuals. Previous studies have demonstrated that polymorphisms in immune-response genes can influence vaccination efficacy. Polymorphisms in the *RIG-I* (rs10813831, c.19C>T) and *CD40* genes (rs1883832, c.-1C>T) have been associated with IgG antibody level variations after vaccination or infection, respectively. In the present study, we evaluated the effect of the genetic polymorphisms rs10813831 and rs1883832 on the IgG and IgA antibody responses to mRNA vaccination against SARS-CoV-2. Two doses of the BNT162b2 (Pfizer/BioNTech) mRNA vaccine were administered to every one of the 340 individuals that participated in our study. The presence of the genetic polymorphisms mentioned above within the genome of the vaccinated individuals was detected by RCR-RFLP analysis. Serum IgG and IgA antibody levels were assessed on the 21st, 42nd and 90th day after administration of the first dose of the vaccine using immunological methods (CMIA and ELISA, respectively). Based on our research findings, carriers of the T allele of the *CD40* gene (rs1883832, c.-1C>T) exhibit significantly lower levels of IgA antibodies on the 42nd as well as on the 90th day after the first vaccination. On the other hand, this polymorphism did not affect the IgG antibody levels. Last but not least, the polymorphism of the *RIG-I* gene (rs10813831, c.19C>T) seemed not to influence both the IgG and the IgA antibody responses. Our results point out that the *CD40* gene polymorphism (rs1883832, c.-1C>T) may be considered as a useful genetic marker to predict mRNA (BNT162b2) vaccination efficacy against SARS-CoV-2.

1. ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ COVID-19: ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΑΙΤΙΟ, ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

1.1. Οι κορωνοϊοί ως παθογόνα

Οι κορωνοϊοί (CoVs, Coronaviruses) συγκροτούν μια υποοικογένεια ιών (*Coronavirinae* subfamily) εντός της οικογένειας *Coronaviridae*, που αποτελεί την πολυπληθέστερη οικογένεια ιών της τάξης *Nidovirales*. Φυλογενετικά, τα μέλη της υποοικογένειας *Coronavirinae* ταξινομούνται περαιτέρω σε τέσσερα γένη, τα *Alphacoronavirus* (α) και *Betacoronavirus* (β), που προσβάλλουν αποκλειστικά τα θηλαστικά, και τα *Gammacoronavirus* (γ) και *Deltacoronavirus* (δ), που απαντώνται κυρίως στα πτηνά (1).

Οι πρώτοι κορωνοϊοί που ήταν ικανοί να προκαλούν ασθένεια στον άνθρωπο (HCoV, Human Coronaviruses) περιγράφηκαν στα μέσα της δεκαετίας του 1960. Οι ιοί αυτοί [HCoV-B229E (α-CoV) και HCoV-OC43 (β-CoV)], μαζί με τους HCoV-NL63 (α-CoV) και HCoV-HKU1 (β-CoV), που ανακαλύφθηκαν αργότερα, αποτελούν τους πιο διαδεδομένους στον ανθρώπινο πληθυσμό εποχικούς κορωνοϊούς και σχετίζονται συνήθως με ήπιες λοιμώξεις των ανώτερων αναπνευστικών οδών (URTIs, Upper Respiratory Tract Infections) σε ανοσοεπαρκή άτομα. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι τέσσερις παραπάνω κορωνοϊοί ευθύνονται περίπου για το ένα τρίτο των περιπτώσεων κοινού κρυολογήματος στον άνθρωπο (2,3).

Οι κορωνοϊοί αντιμετωπίζονταν ως χαμηλής παθογονικότητας αναπνευστικοί ιοί, μέχρι τα τέλη του 2002. Με την εμφάνιση του ιού SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus, πλέον γνωστός ως SARS-CoV-1) και την επακόλουθη εξάπλωσή του σε 32 χώρες (κατά τα έτη 2002-2003), η ανθρωπότητα συνειδητοποίησε για πρώτη φορά ότι αναδυόμενοι ιοί της οικογένειας *Coronaviridae* είναι δυνατό να οδηγήσουν σε επιδημικές εξάρσεις και να προκαλέσουν στον άνθρωπο σοβαρές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, που μπορούν να αποβούν θανατηφόρες. Δέκα χρόνια αργότερα, ο κορωνοϊός MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) αποτέλεσε το αίτιο μιας δεύτερης επιδημίας, που εκδηλώθηκε αρχικά στις χώρες της Μέσης Ανατολής και έπειτα στη Νότια Κορέα. Κι ενώ η ανθρωπότητα εξακολουθούσε να απειλείται από τον ιό MERS-CoV, ένας νέος κορωνοϊός (πλέον γνωστός ως SARS-CoV-2) πυροδότησε, στα τέλη του 2019, μια τρίτη επιδημική έξαρση, η οποία σύντομα έλαβε διαστάσεις πανδημίας. Έτσι, μέσα σε δύο μόνο δεκαετίες, εμφανίστηκαν τρεις νέοι κορωνοϊοί (β-CoVs), που, σε αντίθεση με τους HCoV-B229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 και HCoV-HKU1, χαρακτηρίζονται από υψηλή παθογονικότητα. Το γεγονός αυτό προκάλεσε παγκόσμια ανησυχία και ανέδειξε τελικά τους κορωνοϊούς σε ένα από τα πιο απειλητικά για τη δημόσια υγεία παθογόνα (4–6).

1.2. Η εξάπλωση του ιού SARS-CoV-2 και η εξέλιξη της νόσου COVID-19 σε πανδημία

Τον Δεκέμβριο του 2019, ένας αριθμός περιστατικών πνευμονίας αγνώστου αιτιολογίας καταγράφηκε σε διάφορες υγειονομικές δομές στην πόλη Wuhan (πρωτεύουσα της επαρχίας Hubei) της Κίνας. Το κοινό επιδημιολογικό χαρακτηριστικό μεταξύ των περισσότερων από τους πρώτους 27 ασθενείς που νοσηλεύτηκαν ήταν η προηγούμενη έκθεσή τους σε μια αγορά θαλασσινών (Huanan Seafood Wholesale Market) στο κέντρο της Wuhan, στην οποία πωλούνταν επίσης πουλερικά και άγρια ζώα. Την τελευταία ημέρα του έτους (31 Δεκεμβρίου 2019), οι υγειονομικές αρχές της Wuhan ενημέρωσαν τόσο το κοινό όσο και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, World Health Organization) για μια έξαρση πνευμονίας, της οποίας το παθογόνο αίτιο ταυτοποιήθηκε μερικές μέρες αργότερα (7 Ιανουαρίου 2020). Κινέζοι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι υπεύθυνος για την αναδυόμενη αυτή ασθένεια ήταν ένας νέος κορωνοϊός, τον οποίο ο Π.Ο.Υ. ονόμασε προσωρινά «2019-nCoV».

Στην αρχή, θεωρήθηκε ότι ο ιός πέρασε στον άνθρωπο, μέσω ενός ή περισσότερων γεγονότων άμεσης επαφής του τελευταίου με ενδιάμεσα ζώα-ξενιστές στην προαναφερθείσα αγορά της Wuhan ή μέσω της κατανάλωσης άγριων ζώων. Ωστόσο, νεότερες μελέτες υποστήριζαν ότι η εν λόγω αγορά είναι πιθανό να μην αποτέλεσε τη μοναδική πηγή εισόδου του ιού στον άνθρωπο, αφού για ορισμένα από τα αρχικά περιστατικά που καταγράφηκαν δεν υπήρχε επιδημιολογική σύνδεση με αυτή. Το δεδομένο αυτό, σε συνδυασμό με μια σειρά φαινομένων διασποράς του ιού εντός οικογενειών, καθώς και η καταγραφή επιβεβαιωμένων περιστατικών λοίμωξης σε εργαζόμενους στο χώρο της υγείας, επιβεβαίωσαν την ικανότητα του νέου αυτού ιού να μεταδίδεται από άνθρωπο σε άνθρωπο.

Οι μετακινήσεις μεταξύ πόλεων στα πλαίσια εορτασμού του Σεληνιακού Νέου Έτους συνέβαλαν, σε μεγάλο βαθμό, στη διάδοση του ιού και στις υπόλοιπες 33 επαρχίες της Κίνας, μέσα σε έναν μόλις μήνα. Ο διαρκώς αυξανόμενος αριθμός των νέων περιστατικών λοίμωξης από τον ιό οδήγησε τις Κινεζικές Αρχές στην άμεση λήψη αυστηρών μέτρων, με στόχο την προάσπιση της δημόσιας υγείας. Έτσι, οι μετακινήσεις απαγορεύτηκαν, όλες οι υπαίθριες δραστηριότητες και συναθροίσεις περιορίστηκαν, ενώ οι δημόσιες υπηρεσίες παρέμειναν κλειστές. Στις 30 Ιανουαρίου 2020, ο Π.Ο.Υ. χαρακτήρισε την έξαρση του νέου κορωνοϊού ως μια κατάσταση έκτακτης ανάγκης για τη δημόσια υγεία (PHEIC, Public Health Emergency of International Concern). Λίγες μέρες μετά (11 Φεβρουαρίου 2020), η Διεθνής Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses) μετονόμασε τον έως τότε γνωστό ως «2019-nCoV» ιό σε «SARS-CoV-2», ενώ ο Π.Ο.Υ. εισήγαγε τον όρο COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), για να περιγράψει τη νόσο που σχετίζεται με λοίμωξη από τον ιό SARS-CoV-2.

Λόγω των περιοριστικών μέτρων που ελήφθησαν, ο αριθμός των νέων περιστατικών COVID-19 που καταγράφονταν καθημερινά στην Κίνα άρχισε σταθερά να ελαττώνεται. Ωστόσο, από τα τέλη Φεβρουαρίου 2020, η επέκταση της νόσου COVID-19 στον υπόλοιπο κόσμο επιταχύνθηκε. Οι διεθνείς μετακινήσεις, σε συνδυασμό με την υψηλή μεταδοτικότητα του ιού SARS-CoV-2, συνέβαλαν στην ραγδαία εξάπλωση του τελευταίου σε όλο τον κόσμο. Μετά την είσοδό του στην Ταϊλάνδη, ο ιός διαδόθηκε ταχύτατα σε περισσότερες από 200 χώρες και περιοχές από όλες τις ηπείρους, με αποτέλεσμα στις 11 Μαρτίου 2020, ο Π.Ο.Υ. να ανακηρύξει επίσημα την παγκόσμια πλέον έξαρση της νόσου COVID-19 σε πανδημία (7–9). Σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα του Π.Ο.Υ., μέχρι σήμερα (8 Οκτωβρίου 2021, 6:49 μ.μ., Θερινή Ώρα Κεντρικής Ευρώπης), ο ιός SARS-CoV-2 ευθύνεται για 236.559.025 επιβεβαιωμένα περιστατικά COVID-19 σε όλο τον κόσμο και έχει στερήσει 4.831.486 ανθρώπινες ζωές, απειλώντας πολλές ακόμα.

1.3. Δομή των σωματιδίων του ιού SARS-CoV-2 και οργάνωση του γονιδιώματός του

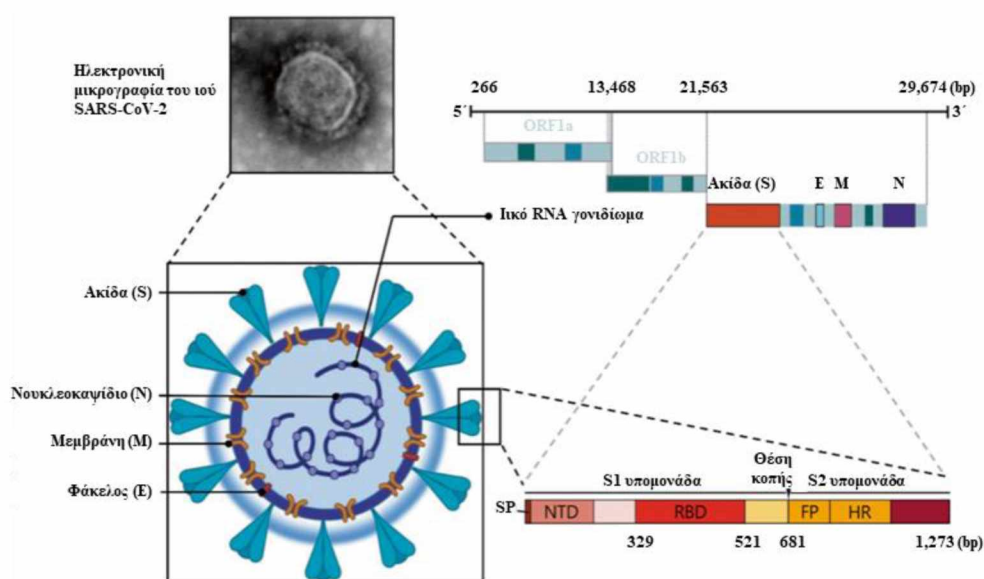
Ο ιός SARS-CoV-2 κατατάσσεται, από φυλογενετική άποψη, στους β-κορωνοϊούς και ειδικότερα στο υπογένος *Sarbecovirus* (betacoronavirus lineage B). Το γενετικό του υλικό είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA, positive-sense, single-stranded, ribonucleic acid), μεγέθους 29.800 – 29.900 βάσεων (10). Το RNA του ιού περιβάλλεται από ένα ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο, που με τη σειρά του περικλείεται μέσα σε έναν λιπιδικό φάκελο (7).

Τα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2 είναι κατά κανόνα σφαιρικά, με διάμετρο 60-140 nm, και φέρουν χαρακτηριστικές ακίδες (spikes), μήκους 9-12 nm, οι οποίες προεκβάλλουν από την επιφάνειά τους. Κάτω από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, οι πρωτεϊνικές αυτές ακίδες προσδίδουν στα σωματίδια του ιού τη μορφή κορώνας. Αυτό αποτελεί και το ιδιαίτερο μορφολογικό χαρακτηριστικό στο οποίο ο ιός οφείλει το όνομά του (7,10).

Τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες απαρτίζουν τα σωματίδια του ιού SARS-CoV-2: η πρωτεΐνη-ακίδα (S, Sp*ike*), η πρωτεΐνη του φακέλου (E, Envelope), η πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (N, Nucleocapsid) και η μεμβρανική πρωτεΐνη (M, Membrane). Η πρωτεΐνη S είναι μια ομοτριμερής γλυκοπρωτεΐνη, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην προσκόλληση όσο και στην επακόλουθη είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Κάθε μονομερές της πρωτεΐνης S αποτελείται από δύο διακριτές υπομονάδες (S1 και S2), με ξεχωριστές λειτουργίες. Η υπομονάδα S1, που βρίσκεται εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ισοσωματίου, εμπεριέχει την περιοχή δέσμευσης στον υποδοχέα (RBD, receptor-binding domain), μέσω της οποίας ο ιός συνδέεται ειδικά με τον υποδοχέα-στόχο του. Με τον τρόπο αυτό, η λειτουργική επικράτεια S1 καθορίζει τον τροπισμό και την παθογονικότητα του ιού

SARS-CoV-2. Το διαμεμβρανικό τμήμα S2 της πρωτεΐνης S περιλαμβάνει περιοχές επαναλαμβανόμενων επταπεπτιδίων (HR regions, Heptad Repeat regions) και το πεπτίδιο σύντηξης (FP, Fusion Peptide), που μαζί διεκπεραιώνουν τη σύντηξη του ιικού περιβλήματος με τη μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή. Η πρωτεΐνη M αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι του ιικού περιβλήματος (φακέλου). Η πρωτεΐνη N δεσμεύεται στο γονιδιωματικό RNA του ιού και συμβάλλει στο σχηματισμό του νουκλεοκαπιδίου, ενώ κατά τη συγκρότηση των ισωματίων αλληλεπιδρά επίσης με την πρωτεΐνη M. Τέλος, η πρωτεΐνη E, που αποτελεί τη λιγότερο κατανοητή πρωτεΐνη του ιού (ως προς το μηχανισμό δράσης και τη δομή της), φαίνεται να σχετίζεται με τη συγκρότηση και την απελευθέρωση των ισωματίων, καθώς και με την παθογονικότητα του ιού SARS-CoV-2 (2,11).

Το γονιδίωμα του ιού SARS-CoV-2 οργανώνεται κατά τρόπο παρόμοιο με αυτά των ιών SARS-CoV-1 και MERS-CoV, με τα οποία εμφανίζει αντίστοιχα 79% και 50% ομολογία ως προς την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων του (8). Στο γονιδιωματικό RNA του ιού SARS-CoV-2 εντοπίζονται τουλάχιστον 10 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs, Open Reading Frames). Τα ORF1a και ORF1b καταλαμβάνουν περίπου τα 2/3 του ιικού γονιδιώματος (περίπου 20.000 βάσεις) και κωδικοποιούν μια σειρά από μη δομικές πρωτεΐνες του ιού (nsps, non-structural proteins), οι οποίες προκύπτουν με πρωτεολυτική πέψη πολυπρωτεϊνικών μορίων. Το υπόλοιπο 1/3 του ιικού γονιδιώματος περιλαμβάνει τα ORFs που κωδικοποιούν τις τέσσερις κύριες δομικές πρωτεΐνες του ιού (S, N, M και E) αλλά και ORFs που παρεμβάλλονται ανάμεσα στα προηγούμενα και κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες διευκολύνουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (accessory proteins) (2,12).



Εικόνα 1. Δομή του ιού SARS-CoV-2 και της πρωτεΐνης-ακίδας (S). Ανατύπωση, με τροποποιήσεις, από: Li, Dan-Dan and Li, Qi-Han. “SARS-CoV-2: vaccines in the pandemic era”. Military Medical Research vol. 8,1 1. 6 Jan. 2021

1.4. Ο κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2

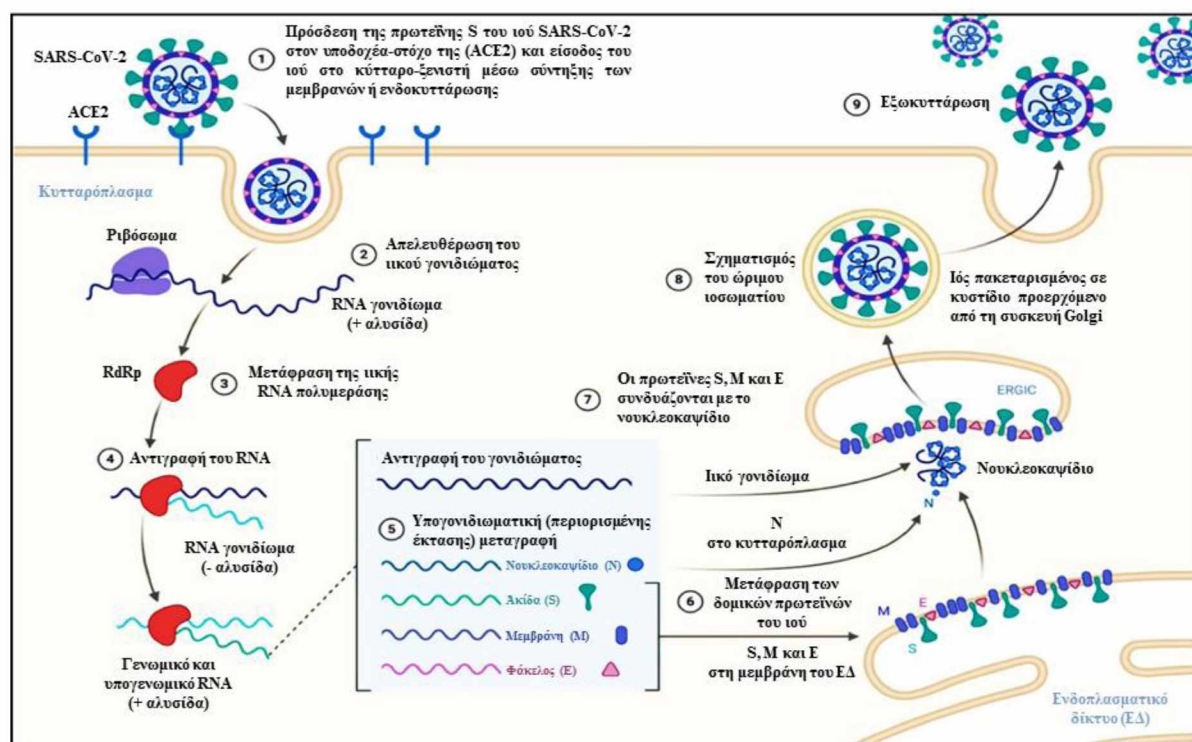
Ο ιός SARS-CoV-2 εισβάλλει στον ανθρώπινο οργανισμό κυρίως μέσω της αναπνευστικής οδού. Σταγονίδια της αναπνοής και σωματίδια αερολυμάτων που παράγονται από μολυσμένα άτομα, κατά το βήχα ή το φτέρνισμα, εισέρχονται αρχικά, διαμέσου της εισπνοής, στους βλεννογόνους των ανώτερων αεροφόρων οδών και στη στοματική κοιλότητα, όπου παραμένουν για ορισμένο χρονικό διάστημα. Από εκεί, τα μολυσματικά αυτά σωματίδια μπορούν στη συνέχεια να μεταναστεύσουν στους πνεύμονες, προκαλώντας σοβαρή λοίμωξη (13,14).

Στο αρχικό στάδιο της λοίμωξης, ο ιός προσκολλάται στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή, μέσω της επικράτειας RBD της S γλυκοπρωτεΐνης του. Η επικράτεια RBD αναγνωρίζει και συνδέεται ειδικά με το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης 2 (ACE2, Angiotensin-converting enzyme 2) του ανθρώπου, το οποίο χρησιμοποιείται από τον ιό ως κύριος υποδοχέας εισόδου (12). Η δέσμευση του ιού στον υποδοχέα του (ACE2) αποτελεί το πρώτο βήμα για την είσοδό του στα κύτταρα του ξενιστή, ωστόσο δεν επαρκεί ώστε ο ιός να αποκτήσει πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα. Για να συμβεί αυτό, θα πρέπει η ιική πρωτεΐνη S να ενεργοποιηθεί από διάφορες πρωτεάσες του ξενιστή. Η πρωτεολυτική ενεργοποίηση της πρωτεΐνης S διεκπεραιώνεται συνήθως από τη διαμεμβρανική πρωτεάση της σερίνης 2 (TMPRSS2, Transmembrane Serine Protease 2), την καθεψίνη L (ενδοσωμική πρωτεάση) και τη φουρίνη (furin) και αποτελεί μια διαδικασία θεμελιώδους σημασίας για το στάδιο της σύντηξης (15). Η πρωτεόλυση λαμβάνει χώρα σε δύο θέσεις: στη θέση S1/S2, ώστε οι υπομονάδες S1 και S2 να διαχωριστούν και στη θέση S2', ώστε να αποκαλυφθεί το πεπτίδιο σύντηξης (16). Ακολούθως, το πεπτίδιο σύντηξης εντίθεται στη μεμβράνη του κυττάρου του ξενιστή και υφίσταται μια αλλαγή στη διαμόρφωσή του, η οποία επιτρέπει την ανάμιξη της κυτταρικής μεμβράνης με τη μεμβράνη του ιικού περιβλήματος. Τελικό αποτέλεσμα των παραπάνω διεργασιών είναι η σύντηξη των δύο μεμβρανών και η απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα (17).

Το επόμενο βήμα για τον πολλαπλασιασμό του ιού SARS-CoV-2 είναι η μετάφραση του ιικού RNA από τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή. Η δυνατότητα άμεσης μετάφρασης του ιικού γονιδιώματος παρέχεται λόγω του γεγονότος ότι αυτό φέρει τα κατάλληλα δομικά χαρακτηριστικά, μια καλύπτρα στο 5' άκρο του και μια πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο του, που του επιτρέπουν να λειτουργεί ως μόριο αγγελιαφόρου RNA (mRNA, messenger RNA). Τα ORF1a και ORF1b κωδικοποιούν δύο αλληλεπικαλυπτόμενες πολυπρωτεΐνες, τις pp1a και pp1b, που στη συνέχεια κόβονται από ικές πρωτεάσες, κωδικοποιούμενες από το ORF1a. Από την πρωτεολυτική διάσπαση των παραπάνω πολυπρωτεϊνών προκύπτουν 16 μη δομικές

πρωτεΐνες, οι οποίες συγκροτούν το σύμπλοκο αντιγραφής-μεταγραφής (RTC, replicase-transcriptase complex) του ιικού RNA. Οι βιοχημικές διεργασίες σύνθεσης RNA πραγματοποιούνται μέσω ενδιάμεσων αλυσίδων RNA αρνητικής πολικότητας (-RNA, negative-sense RNA) και οδηγούν στην παραγωγή τόσο γενωμικών (genomic) όσο και υπογενωμικών (subgenomic) μορίων RNA, τα οποία σχηματίζονται με τη δράση της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase). Τα μόρια υπογενωμικού RNA λειτουργούν ως μόρια mRNA για τις δομικές πρωτεΐνες S, N, M και E, καθώς και για διάφορες πρωτεΐνες που υποβοηθούν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή (17,18).

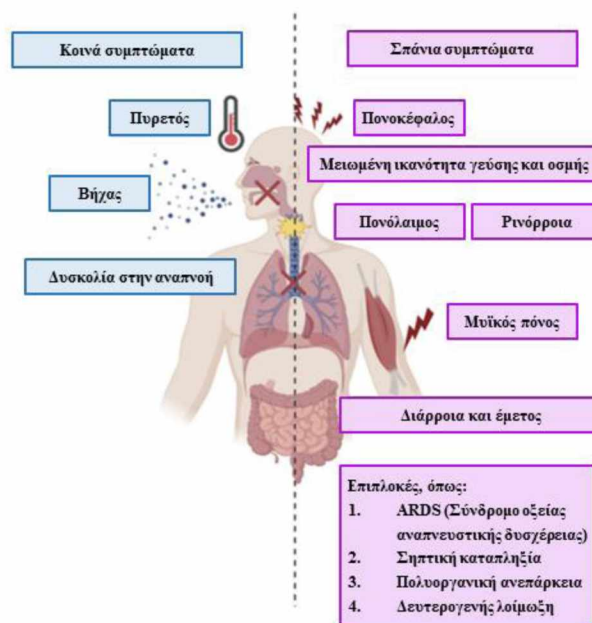
Μετά την αντιγραφή και την περιορισμένης έκτασης (υπογενωμική) μεταγραφή του ιικού RNA, οι δομικές πρωτεΐνες S, M και E μεταφράζονται και εισέρχονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ER, Endoplasmic Reticulum). Παράλληλα, στο κυτταρόπλασμα το ιικό γονιδίωμα αλληλεπιδρά με πρωτεΐνες N και πακετάρεται σε νουκλεοκαψίδια. Τα ιικά νουκλεοκαψίδια συνδυάζονται στη συνέχεια με τις δομικές πρωτεΐνες S, M και E, που είναι αγκυροβολημένες στις μεμβράνες του ενδιάμεσου διαμερίσματος ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), με αποτέλεσμα το σχηματισμό ώριμων ισοσωματίων. Τα νέα σωματίδια του ιού μεταφέρονται τελικά με κυστίδια στην επιφάνεια του μολυσμένου κυττάρου και απελευθερώνονται με εξοκυττάρωση, έχοντας πλέον την ικανότητα να μολύνουν νέα κύτταρα (16,18).



Εικόνα 2. Ο κύκλος ζωής του ιού SARS-CoV-2. Ανατύπωση, με τροποποιήσεις, από: Alturki, Sana O. et al. “The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development.” *Frontiers in immunology*, vol. 11, 1880. 19 Aug. 2020

1.5. Συμπτώματα και κλινικές εκδηλώσεις της νόσου COVID-19

Τα άτομα που μολύνονται από τον ιό SARS-CoV-2 παρουσιάζουν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων, που διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Οι κλινικές εκδηλώσεις κυμαίνονται από ήπιες έως σοβαρές, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις η νόσος μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο. Τα συμπτώματα εκδηλώνονται συνήθως από όλα τα συστήματα του οργανισμού, εντός δύο ημερών έως δύο εβδομάδων μετά την έκθεση στον ιό. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι ο πυρετός, ο βήχας, η δύσπνοια και η κόπωση. Άλλα συμπτώματα περιλαμβάνουν ρινόρροια, παραγωγή πτυέλων, πονοκέφαλο και πονόλαιμο. Ορισμένα άτομα είναι πιθανό να εμφανίσουν επιπρόσθετα συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα, όπως διάρροια και έμετο. Ακόμα, είναι δυνατό να μειωθούν οι ικανότητες γεύσης και οσμής. Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις, τα άτομα είναι δυνατό να χρειαστούν νοσηλεία ή και εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας. Σε αυτά τα άτομα η νόσος μπορεί γρήγορα να εξελιχθεί και να προκαλέσει επιπλοκές, όπως σύνδρομο οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας (ARDS, Acute Respiratory Distress Sndrome), σηπτική καταπληξία, πολυοργανική ανεπάρκεια και δευτερογενείς λοιμώξεις, που μπορούν μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα να καταλήξουν σε θάνατο. Παράγοντες κινδύνου που συνεισφέρουν στην εκδήλωση βαρύτερης νόσου και σε κρίσιμες καταστάσεις είναι η ηλικία (άνω των 65 ετών) και η κατάσταση υγείας του ατόμου (παρουσία υποκείμενων νοσημάτων). Στις ομάδες υψηλού κινδύνου συγκαταλέγονται άτομα με υπέρταση, καρδιαγγειακή νόσο ή διαβήτη, καθώς και άτομα των οποίων το ανοσιακό σύστημα είναι εξασθενημένο (18). Τα κύρια συμπτώματα της νόσου COVID-19 συνοψίζονται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Συμπτώματα της νόσου COVID-19. Ανατύπωση, με τροποποιήσεις, από: Alturki, Sana O. et al. “The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development.” *Frontiers in immunology* vol. 11, 1880. 19 Aug. 2020

2. ΕΜΒΟΛΙΑ ΕΝΑΝΤΙ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-CoV-2 ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΕ ΑΥΤΑ

2.1. Η ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών εμβολίων

Μέσα σε 16 μήνες από την εμφάνισή του, τον Δεκέμβριο του 2019, ο ιός SARS-CoV-2 προκάλεσε περισσότερους από 3 εκατομμύρια θανάτους σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, πέρα από τις σημαντικές απώλειες ανθρώπινων ζώων, η πανδημία COVID-19 επέφερε μια γενικότερη διαταραχή σε όλες τις πτυχές του ανθρώπινου βίου. Η υψηλή μεταδοτικότητα του ιού SARS-CoV-2, ακόμα και από ασυμπτωματικούς φορείς, η έλλειψη εξειδικευμένων θεραπευτικών μέσων για την αντιμετώπιση της νόσου COVID-19 και το γεγονός ότι, τουλάχιστον στην αρχή της πανδημίας, τα μοναδικά μέτρα προστασίας από τον ιό ήταν η λήψη μέτρων προσωπικής υγιεινής, η χρήση масκών και η ιχνηλάτηση επαφών οδήγησαν την πολιτεία στην εφαρμογή αυστηρών υγειονομικών πρωτοκόλλων, που επηρέασαν σημαντικά την οικονομία, την κοινωνία και την ψυχολογία των ανθρώπων. Από τις αρχές Μαρτίου του 2020, η ανθρωπότητα βρέθηκε αντιμέτωπη με μια σειρά από πρωτόγνωρες καταστάσεις, όπως η απαγόρευση των μετακινήσεων και ο περιορισμός διαφόρων δραστηριοτήτων που είναι συνυφασμένες με τον βιοπορισμό αλλά την κοινωνική φύση του ανθρώπου. Οι σοβαρές επιπτώσεις της πανδημίας, τόσο στη δημόσια υγεία όσο και στην παγκόσμια οικονομική και κοινωνική δραστηριότητα, υπογράμμισαν από πολύ νωρίς την ανάγκη ανάπτυξης αποτελεσματικών εμβολίων, αναδεικνύοντας τα τελευταία ως την πιο υποσχόμενη λύση για τον περιορισμό της εξάπλωσης της νόσου COVID-19 και την επιστροφή στην κανονικότητα (8,11,19,20).

Τα εμβόλια αποτελούν αναμφίβολα ένα από τα σπουδαιότερα επιτεύγματα του ανθρώπου στις Επιστήμες Υγείας. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα παγκόσμια προγράμματα εμβολιασμού σώζουν ετησίως έως και 2-3 εκατομμύρια ζωές, παρέχοντας προστασία από διάφορα παθογόνα, που υπό διαφορετικές συνθήκες θα έθεται τον πλανήτη σε μια παγκόσμια υγειονομική και οικονομική κρίση. Πέρα όμως από την ατομική προστασία που παρέχουν, τα προγράμματα εμβολιασμού επιδιώκουν ταυτόχρονα και τη λεγόμενη ανοσία του πληθυσμού ή της αγέλης (population or herd immunity). Στοχεύουν, δηλαδή, στην ανοσοποίηση μιας σημαντικής μερίδας του πληθυσμού, ώστε το ποσοστό των ευπαθών ομάδων του να μειωθεί σε ένα επίπεδο που δε θα επιτρέπει τη μετάδοση του εκάστοτε παθογόνου. Στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού περιλαμβάνονται άτομα που δεν έχουν εμβολιαστεί, ασθενείς που πάσχουν από ανοσοανεπάρκειες ή βρίσκονται υπό θεραπεία με ανοσοκατασταλτικούς παράγοντες και γενικά άτομα με εξασθενημένο ανοσιακό σύστημα, τα οποία δεν έχουν την ικανότητα να αναπτύξουν ανοσία. Η επαγωγή ανοσίας στον πληθυσμό μέσω μαζικού εμβολιασμού αποτέλεσε μια αποτελεσματική στρατηγική για τον περιορισμό

της εξάπλωσης διαφόρων λοιμωδών νοσημάτων κατά το παρελθόν και, ως εκ τούτου, αναμένεται να αποτελέσει ένα εξίσου «ισχυρό όπλο» για τη διαχείριση της τρέχουσας πανδημίας COVID-19 (17).

2.2. Συστήματα ανάπτυξης εμβολίων έναντι του ιού SARS-CoV-2

Η ανάπτυξη εμβολίων έναντι του ιού SARS-CoV-2 στηρίχθηκε στη χρήση μιας ευρείας ποικιλίας τεχνολογιών, τόσο παλαιότερων όσο και νεότερων. Οι παραδοσιακές στρατηγικές ανάπτυξης εμβολίων (αδρανοποίηση ή στοχευμένη εξασθένηση μικροοργανισμών, χορήγηση συνθετικών ή ανασυνδυασμένων πεπτιδικών αντιγόνων), έχουν ήδη αποδείξει την αποτελεσματικότητά τους έναντι ορισμένων παθογόνων. Ωστόσο, η σημαντική πρόοδος που σημειώθηκε τις τελευταίες δεκαετίες στη Μοριακή Βιολογία και την Εμβολιολογία εξασφάλισε την πρόσβαση σε μια σειρά καινοτόμων τεχνολογιών αιχμής, αυξάνοντας έτσι τις επιλογές ως προς τα διαθέσιμα συστήματα σχεδιασμού και χορήγησης εμβολίων (21,22). Όταν, στις 11 Ιανουαρίου του 2020, επιστήμονες από το Πανεπιστήμιο Fudan της Κίνας και συνεργάτες τους ανάρτησαν στο διαδίκτυο την αλληλουχία του γονιδιώματος του ιού SARS-CoV-2, η διεθνής επιστημονική κοινότητα βρέθηκε μπροστά σε μια πρόκληση, αφού διέθετε πλέον σύγχρονα εργαλεία και μεθόδους για την ταχεία ανάπτυξη υποψήφιων εμβολίων (23). Η αξιοποίηση αυτών των καινοτόμων τεχνολογιών οδήγησε τελικά στην ανάπτυξη μιας νέας γενιάς εμβολίων, των εμβολίων νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) (14). Στην περίπτωση μιας πανδημίας, όπως της COVID-19, τα εμβόλια DNA και mRNA αντιπροσωπεύουν τα πιο γρήγορα προσβάσιμα υποψήφια εμβόλια, λόγω του σύντομου χρόνου παραγωγή τους και των χαμηλού επιπέδου απαιτήσεών τους σε θέματα βιοασφάλειας (10).

Είναι χαρακτηριστικό ότι η ανάπτυξη εμβολίων έναντι του ιού SARS-CoV-2 ξεκίνησε και συνεχίζεται με ασυνήθιστα γρήγορους ρυθμούς. Τα περισσότερα υποψήφια εμβόλια (ανεξάρτητα από το αν περιέχουν πρωτεϊνικά αντιγόνα ή νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που τα κωδικοποιούν) στοχεύουν στην παραγωγή εξουδετερωτικών αντισωμάτων έναντι της ιικής πρωτεΐνης S, ώστε να εμποδίσουν την αλληλεπίδραση του ιού SARS-CoV-2 με τον υποδοχέα-στόχο του (ACE2) και κατ' επέκταση την είσοδό του στα κύτταρα του ξενιστή και την εγκατάσταση της λοίμωξης. Επιπλέον, σε αντίθεση με τα κοινά εμβόλια, τα εμβόλια που στοχεύουν στην πρόληψη της νόσου COVID-19 εγκρίνονται σε όλο τον κόσμο με άδεια χρήσης έκτακτης ανάγκης (EUA, Emergency Use Authorization) (21,24). Δύο από τα εμβόλια που έχουν ήδη εγκριθεί, τα BNT162b2 και mRNA-1273 (προϊόντα των εταιριών Pfizer/BioNTech και Moderna, αντίστοιχα) βασίζονται στην τεχνολογία mRNA και στη χρήση λιπιδικών νανοσωματιδίων για τη χορήγησή τους, ενώ τα υπόλοιπα [ChAdOx1 nCoV-19, University of Oxford/AstraZeneca, Gam-COVID-Vac (Sputnik V), Gamaleya Research

Institute και Ad26.COV2.S, Janssen] είναι εμβόλια DNA, όπου το χρησιμοποιούμενο σύστημα χορήγησης είναι ένας μη πολλαπλασιαζόμενος ανασυνδυασμένος αδενοϊικός φορέας (non-replicating recombinant adenovirus vector system) (19,20).

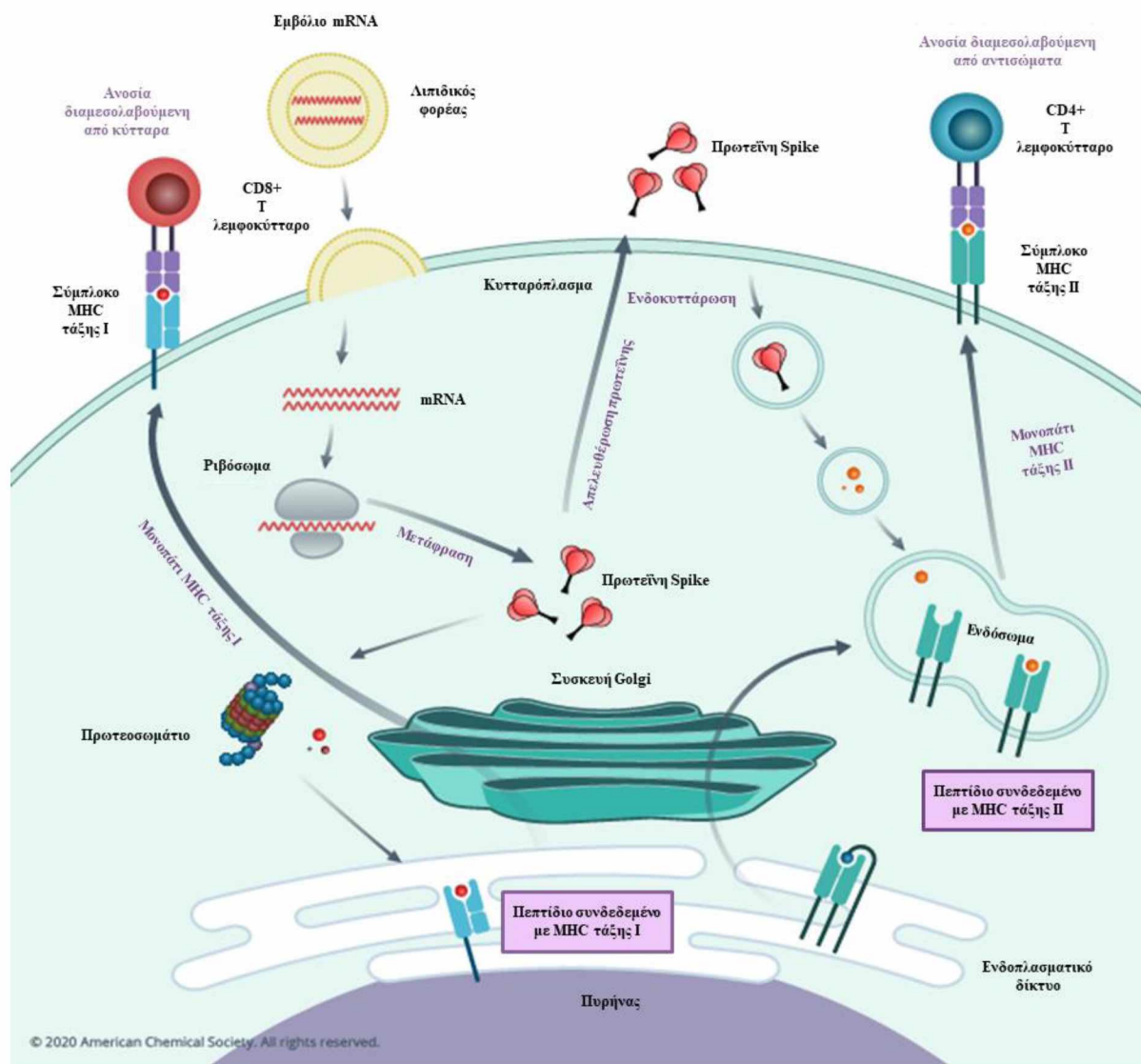
2.3. Μηχανισμός δράσης των εμβολίων mRNA έναντι του ιού SARS-CoV-2

Τα δύο εμβόλια mRNA που εγκρίθηκαν πρόσφατα (BNT162b2 και mRNA-1273) περιέχουν ως ενεργό συστατικό ένα μονόκλωνο μόριο mRNA, το οποίο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη S πλήρους μήκους του ιού SARS-CoV-2. Το mRNA αυτό προκύπτει με *in vitro* μεταγραφή ενός μορίου DNA, το οποίο περιέχει τη γενετική πληροφορία για τη σύνθεση της πρωτεΐνης S του ιού SARS-CoV-2. Μάλιστα, η κωδικοποιούμενη πρωτεΐνη φέρει σκόπιμα δύο μεταλλάξεις (K986P και V987P), ώστε να εξασφαλίζεται η παραμονή της σε μια ευνοϊκή για την αντιγονικότητά της διαμόρφωση (prefusion conformation). Η αντιγονική πρωτεΐνη S αναγνωρίζεται από κύτταρα του ανοσιακού συστήματος και διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων και κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, που παρέχουν προστασία έναντι της φυσικής μόλυνσης και της σοβαρής νόσησης από τον ιό SARS-CoV-2 (25).

Μετά τη χορήγησή του, ο λιπιδικός νανοσωματιδιακός φορέας (LNP, Lipid nanoparticle) που εμπεριέχει το mRNA εισέρχεται στα μυϊκά κύτταρα, μέσω ενδοκυττάρωσης. Ακολούθως, ο φορέας αποικοδομείται και το mRNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα, όπου μεταφράζεται στην αντιγονική πρωτεΐνη S, χρησιμοποιώντας τη μεταφραστική μηχανή (ριβοσώματα) του κυττάρου. Η αντιγονική πρωτεΐνη S μπορεί στη συνέχεια να αποικοδομηθεί από το πρωτεάσωμα σε αντιγονικά πεπτίδια, που με τη σειρά τους θα παρουσιαστούν σε CD8+ κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα (CTLs, Cytotoxic Lymphocytes), μέσω του Μείζονος Συστήματος Ιστοσυμβατότητας τάξης I (MHC, Major Histocompatibility Complex class I). Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη S μπορεί να απελευθερωθεί στον εξωκυττάριο χώρο και κατόπιν να προσληφθεί από δένδριτικά κύτταρα (DCs, Dendritic Cells). Εκεί θα αποικοδομηθεί και έπειτα θα παρουσιαστεί σε CD4+ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, καθώς και σε B λεμφοκύτταρα, μέσω του MHC τάξης II (26).

Τα B λεμφοκύτταρα διεκπεραιώνουν τις χυμικές ανοσιακές απαντήσεις και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούνται από κυκλοφορούντα αντιγόνα, τα οποία δεσμεύονται στον υποδοχέα τους (BCR, B cell receptor). Όμως, προκειμένου να ενεργοποιηθούν, τα παρθένα B λεμφοκύτταρα θα πρέπει επίσης να αλληλεπιδράσουν με βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, μέσω του μορίου CD40 που εκφράζουν στην επιφάνειά τους. Κατόπιν, τα ενεργοποιημένα πια B λεμφοκύτταρα θα πολλαπλασιαστούν και θα διαφοροποιηθούν σε B λεμφοκύτταρα μνήμης ή σε πλασματοκύτταρα, τα οποία εκκρίνουν αντισώματα. Οι παραπάνω διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στα βλαστικά κέντρα των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Μετά από μια δεύτερη

(φυσική) έκθεση στο αντιγόνο (πρωτεΐνη S), τα αντισώματα που θα έχουν παραχθεί από τα πλασματοκύτταρα θα δεσμεύσουν και θα εξουδετερώσουν τον ιό SARS-CoV-2, εμποδίζοντας την είσοδό του στα κύτταρα του ξενιστή. Σε περίπτωση που η ποσότητα των αντισωμάτων αποδειχθεί ανεπαρκής, τα Β λεμφοκύτταρα μνήμης θα ενεργοποιηθούν, πυροδοτώντας μια δευτερογενή ανοσολογική απόκριση (27,28).



Εικόνα 4. Li, Y. (2020, December 4). *Meet the mRNA vaccine rookies aiming to take down COVID-19.* Ανακτήθηκε από: <https://www.cas.org>, με τροποποιήσεις

Αξίζει να αναφερθεί ότι τα εμβόλια mRNA δε διαθέτουν μόνο ανοσογόνες, αλλά και ανοσοενισχυτικές ιδιότητες, λόγω των ενδογενών ανοσοδιεγερτικών ιδιοτήτων τους. Το ίδιο το mRNA που περιέχεται ως συστατικό των εμβολίων, καθώς και διάφορα παραπροϊόντα που προκύπτουν κατά τη διαδικασία της in vitro μεταγραφής, έχουν, ως μόρια RNA, την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με μια ευρεία ποικιλία ενδοσωμικών και κυτταροπλασματικών υποδοχέων (TLR3, TLR7, TLR9, RIG-I, MDA5, NOD2), οι οποίοι αποτελούν αναπόσπαστο

κομμάτι του συστήματος της φυσικής ανοσίας. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι η παραγωγή ιντερφερονών τύπου I και διαφόρων μεσολαβητών της φλεγμονής, που συμβάλλουν στην περαιτέρω ρύθμιση των επίκτητων ανοσοαποκρίσεων. Ωστόσο, επειδή η παραπάνω αλληλεπίδραση είναι δυνατό να οδηγήσει σε αναστολή της μετάφρασης ή στην αποικοδόμηση του mRNA, τα εγκεκριμένα εμβόλια mRNA περιέχουν τροποποιημένα νουκλεοτίδια, ώστε να περιορίζεται η αλληλεπίδρασή τους με υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και να εξασφαλίζεται έτσι η παραγωγή της πρωτεΐνης S σε υψηλά επίπεδα (20,26).

2.4. Επίδραση γενετικών παραγόντων στις ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται από εμβολιασμό

Μεταξύ των ατόμων ενός εμβολιαζόμενου πληθυσμού καταγράφονται ποικίλες ανοσολογικές αποκρίσεις. Ενώ ορισμένα άτομα αναπτύσσουν ικανοποιητικές απαντήσεις, μερικά άλλα αποκρίνονται ανεπαρκώς ή καθόλου στον εμβολιασμό. Οι παρατηρούμενες διαφορές στις ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται από εμβολιασμό οφείλονται σε μια πληθώρα παραγόντων. Μερικοί από τους παράγοντες αυτούς σχετίζονται με το άτομο που εμβολιάζεται και άλλοι με το ίδιο το εμβόλιο. Μια πιο αναλυτική περιγραφή των διαφόρων παραγόντων που επηρεάζουν τον τρόπο με τον οποίο ένα άτομο αποκρίνεται στον εμβολιασμό παρέχεται στην Εικόνα 5. Η συνεκτίμηση όλων αυτών των παραγόντων θα συμβάλει στην εξαγωγή μιας πιο αντιπροσωπευτικής εικόνας της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού και του βαθμού προστασίας που αυτός παρέχει σε κάθε περίπτωση (29).



Εικόνα 5. Παράγοντες που επηρεάζουν την ανοσιακή απάντηση μετά από εμβολιασμό. Ανατύπωση, με τροποποιήσεις, από: Zimmermann, Petra and Curtis, Nigel. “Factors That Influence the Immune Response to Vaccination.” *Clinical microbiology reviews* vol. 32,2 e00084-18. 13 Mar. 2019

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τις κυτταρικές και αντισωματικές απαντήσεις, μετά από εμβολιασμό, είναι το γενετικό υπόβαθρο του εμβολιαζόμενου ατόμου. Το γεγονός αυτό μπορεί να γίνει εύκολα κατανοητό αν αναλογιστεί κανείς την πολυμορφική φύση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή απάντηση. Το ισχυρά πολυμορφικό σύστημα των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA, Human Leukocyte Antigen system), που εμπλέκεται στην αντιγονοπαρουσίαση, είναι ίσως αυτό που έχει μελετηθεί εκτενέστερα. Ωστόσο, και άλλα, λιγότερο πολυμορφικά γονίδια, που κωδικοποιούν κυτταροκίνες, υποδοχείς της φυσικής ανοσίας και κυτταροκινών, ανοσορυθμιστικά μόρια και μεταγραφικούς παράγοντες, επίσης επηρεάζουν την απόκριση του οργανισμού στον εμβολιασμό (30). Η γενετική βάση της ετερογενούς ανοσολογικής απόκρισης έναντι των εμβολίων έχει καταδειχθεί από πλήθος μελετών για τα εμβόλια έναντι του ιού της ηπατίτιδας Β, του ιού της γρίπης, των ιών της ιλαράς, παρωτίτιδας και ερυθράς και του ιού των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV, Human Papilloma Virus) (31,32).

Η μελέτη της γενετικά καθοριζόμενης ετερογένειας των ανοσιακών απαντήσεων απέναντι στα εμβόλια δε θα επιτρέψει μόνο την καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού δράσης τους, αλλά θα έχει σημαντικό αντίκτυπο και στη δημόσια υγεία. Είναι προφανές ότι μια ανεπαρκής ή αποτυχή ανοσοποίηση δεν απειλεί μόνο το άτομο που εμβολιάστηκε, αλλά και τα εφαρμοζόμενα προγράμματα εμβολιασμού, που έχουν ως στόχο να περιορίσουν ή να αποτρέψουν τη μετάδοση ενός παθογόνου στον γενικό πληθυσμό. Τέτοιου είδους εκστρατείες εμβολιασμού πρέπει συχνά να επιτύχουν ένα επίπεδο ανοσίας στον πληθυσμό της τάξης του 85-95%, πάνω από το οποίο το παθογόνο είναι πρακτικά αδύνατο να μεταδοθεί. Όταν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ γενετικών δεικτών και της μη απόκρισης στον εμβολιασμό είναι γνωστές, η συχνότητα εμφάνισης αυτών των γενετικών δεικτών στον πληθυσμό μπορεί να προβλέψει τον αριθμό των ατόμων που δε θα ανοσοποιηθούν επιτυχώς και επομένως το επίπεδο ανοσίας της αγέλης. Η βαθύτερη κατανόηση των γενετικών παραγόντων που καθορίζουν μια αποτελεσματική ανοσιακή απάντηση, μετά από εμβολιασμό, μπορεί να οδηγήσει στην ταυτοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και μονοπατιών, που θα αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη νέων, καθολικά ανοσογόνων εμβολίων, δηλαδή εμβολίων τα οποία θα καλύπτουν όλα τα άτομα ενός ετερογενούς, από γενετική άποψη, πληθυσμού (30).

Ένα επιτυχημένο παράδειγμα αξιοποίησης της γενετικής πληροφορίας στην κλινική πράξη και ειδικότερα στη χρήση των φαρμάκων δόθηκε από τους Κλινικούς Φαρμακολόγους, με την ανάπτυξη των κλάδων της Φαρμακογενετικής και Φαρμακογονιδιοματικής. Είναι πλέον αποδεκτό ότι γενετικοί πολυμορφισμοί συγκεκριμένων ενζύμων, όπως αυτών του κυτοχρώματος P450, επηρεάζουν το μεταβολισμό των φαρμάκων και κατά συνέπεια οδηγούν σε κλινικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στο θεραπευτικό αποτέλεσμα (φαινότυπο). Η

εφαρμογή των παραπάνω ιδεών της εξατομικευμένης ιατρικής στο χώρο της εμβολιολογίας οδήγησε πρόσφατα στην ανάπτυξη ενός νέου επιστημονικού κλάδου, τον οποίο ο Gregory A. Poland και οι συνεργάτες του ονόμασαν “Vaccinomics”. Πρόκειται για ένα διαρκώς αναπτυσσόμενο επιστημονικό πεδίο, το οποίο διερευνά (τόσο σε επίπεδο ατόμου όσο και σε επίπεδο πληθυσμού) την επίδραση πολυμορφισμών γονιδίων που σχετίζονται με την ανοσιακή απάντηση στην ετερογένεια των αντισωματικών, κυτταρικών και έμφυτων ανοσοαποκρίσεων έναντι των εμβολίων. Όμως, πέραν του ότι παρέχει ένα θεωρητικό πλαίσιο για την κατανόηση και πρόβλεψη των ανοσιακών απαντήσεων απέναντι εμβόλια, το νέο αυτό επιστημονικό πεδίο θέτει παράλληλα και τις βάσεις για τον ορθολογικό σχεδιασμό νέων υπογλήφιων εμβολίων. Η ανάδυση αυτού του καινούριου ερευνητικού κλάδου υποβοηθήθηκε σημαντικά από το πρόγραμμα χαρτογράφησης του ανθρώπινου γονιδιώματος και διευκολύνθηκε περαιτέρω από τις εξελίξεις που σημειώθηκαν σε μια σειρά επιστημών, όπως η ανοσολογία, η γενετική, η μοριακή βιολογία και η βιοπληροφορική. Όπως είναι γνωστό, τα τελευταία χρόνια αναπτύχθηκε πληθώρα νέων τεχνολογιών υψηλής απόδοσης και ανάλυσης (high throughput “omics” technologies), που επιτρέπουν την ανίχνευση γενετικών διαφοροποιήσεων, ιδίως μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms), με ακρίβεια και ευαισθησία (33,34).

Οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, είναι γενετικές αλλαγές ενός νουκλεοτιδίου στην αλληλουχία του DNA, που απαντώνται συχνά σε έναν πληθυσμό (εξ ορισμού με συχνότητα τουλάχιστον 1%). Γενικά, SNPs μπορούν να εντοπιστούν τόσο σε κωδικές όσο και σε μη κωδικές αλληλουχίες του ανθρώπινου γονιδιώματος. Ένας SNP που βρίσκεται εντός της κωδικής περιοχής ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή της αλληλουχίας των αμινοξέων της αντίστοιχης πρωτεΐνης [παρανοηματικός (missense) SNP], σε πρόωρο τερματισμό της μετάφρασης [ανερμηνεύσιμος (nonsense) SNP] ή να μην έχει καμία επίδραση στην αλληλουχία της παραγόμενης πρωτεΐνης [συνώνυμος (synonymous) SNP]. SNPs που εντοπίζονται σε μη κωδικές περιοχές του ανθρώπινου γονιδιώματος μπορούν να επηρεάσουν ποσοτικά την παραγωγή διαφόρων πρωτεϊνών, ασκώντας την επίδρασή τους είτε σε επίπεδο DNA είτε σε επίπεδο RNA. Σε επίπεδο DNA, SNPs που απαντώνται σε 5' αμετάφραστες περιοχές (UTRs, Untranslated Regions) είναι δυνατό να επηρεάσουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα την αύξηση ή τη μείωση της γονιδιακής έκφρασης. Από την άλλη, SNPs που εντοπίζονται σε 3'-UTRs είναι πιθανό να επηρεάσουν την πρόσδεση μικρών ρυθμιστικών μορίων RNA (microRNAs) και κατ' επέκταση την αποσιώπηση γονιδίων. Σε επίπεδο RNA, SNPs ενδέχεται να έχουν αντίκτυπο στην αποικοδόμηση του mRNA, στη συρραφή του RNA ή στην αλληλουχία μη κωδικών (non-coding) μορίων RNA (32). Στα πλαίσια της παρούσας

διπλωματικής εργασίας θα μελετηθούν δύο SNPs, εκ των οποίων ο ένας εντοπίζεται στην κωδική περιοχή του γονιδίου *RIG-I* και ο άλλος στην 5'-UTR του γονιδίου *CD40*.

2.5. Ο ρόλος του υποδοχέα RIG-I στην ανοσιακή απάντηση και ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) του αντίστοιχου γονιδίου

Ο υποδοχέας RIG-I (Retinoic acid-inducible gene I) ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των υποδοχέων αναγνώρισης μοριακών προτύπων (PRRs, Pattern Recognition Receptors) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις έμφυτες ανοσοαποκρίσεις έναντι των ιών. Εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και αναγνωρίζει μόρια RNA (σχετικά μικρού μήκους δίκλιωνα RNA, 5'-τριφωσφορικά ή 5'-διφωσφορικά RNA), που είναι κοινά στους ιούς, ενώ συνήθως απουσιάζουν από τα κύτταρα των θηλαστικών (35). Ο υποδοχέας RIG-I διαθέτει μια καρβοξυτελική περιοχή (CTD, Carboxy-terminal Domain), μια κεντρική επικράτεια ελικάσης και δύο επικράτειες CARD (Caspase Activation and Recruitment Domains), οι οποίες εντοπίζονται στο αμινοτελικό άκρο του. Η καρβοξυτελική περιοχή και η επικράτεια ελικάσης συνεργάζονται, ώστε να ανιχνεύσουν τα ανοσοδιεγερτικά μόρια RNA, ενώ οι επικράτειες CARD εμπλέκονται στη σηματοδότηση. Μετά τη δέσμευση του RNA και τον ολιγομερισμό του, ο υποδοχέας RIG-I αλληλεπιδρά, μέσω των CARD επικρατειών του, με την επικράτεια CARD (ομοτυπική CARD-CARD αλληλεπίδραση) της πρωτεΐνης MAVS (Mitochondrial Antiviral-signaling protein), η οποία λειτουργεί ως πρωτεΐνη-προσαρμογέας για την καθοδική μεταγωγή του σήματος. Το τελικό αποτέλεσμα της ενεργοποίησης του υποδοχέα RIG-I είναι η διέγερση της μεταγραφής γονιδίων που κωδικοποιούν ιντερφερόνες τύπου I, καθώς και άλλα μόρια, τα οποία συμμετέχουν στην άμυνα του οργανισμού έναντι των ιών (36).

Ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) είναι ένας μη συνώνυμος SNP, που εντοπίζεται στο εξόνιο 1 του γονιδίου *RIG-I* (*DDX58*), μέσα στην περιοχή του DNA η οποία κωδικοποιεί την επικράτεια CARD του υποδοχέα. Η αντικατάσταση μιας κυτοσίνης από μια θυμίνη στη συγκεκριμένη πολυμορφική θέση του γονιδίου *RIG-I* οδηγεί στην παραγωγή μιας πρωτεΐνης, που περιέχει ως έβδομο αμινοξύ μια κυστεΐνη (Cys) αντί μιας αργινίνης (Arg). Ο παραπάνω πολυμορφισμός φαίνεται να έχει λειτουργική σημασία, καθώς βρέθηκε να επηρεάζει την έμφυτη ανοσοαπόκριση ανθρώπινων δενδριτικών κυττάρων έναντι του ιού που προκαλεί τη νόσο Newcastle (ND, Newcastle Disease). Επιπλέον, άτομα που φέρουν τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό παρουσιάζουν μειωμένα επίπεδα IgG αντισωμάτων, μετά από ενεργητική ανοσοποίηση με το εμβόλιο MMR-II (Measles, Mumps and Rubella Virus Live Vaccine). Επομένως, σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει ότι ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου RIG-I επηρεάζει την απόκριση του συστήματος της φυσικής ανοσίας τόσο απέναντι σε ιικές λοιμώξεις όσο και απέναντι στον εμβολιασμό (με σκεύασμα ζώντων

μικροοργανισμών) (37,38). Όπως ήδη αναφέρθηκε, σκευάσματα mRNA εμβολίων ενδέχεται να περιέχουν παραπροϊόντα δίκλωνου RNA, τα οποία αναγνωρίζονται από τον υποδοχέα RIG-I (25). Με βάση το δεδομένο αυτό, ο εν λόγω υποδοχέας είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και στις ανοσιακές απαντήσεις που επάγονται μετά από εμβολιασμό με σκευάσματα mRNA.

2.6. Ο ρόλος του μορίου CD40 στην ανοσιακή απάντηση και ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του αντίστοιχου γονιδίου

Τα B λεμφοκύτταρα απαιτούν δύο τύπους σημάτων, προκειμένου να ενεργοποιηθούν και να παράξουν αντισώματα. Το πρώτο σήμα παρέχεται από τη δέσμευση του αντιγόνου στον υποδοχέα των B λεμφοκυττάρων (BCR). Όσον αφορά το δεύτερο σήμα, αυτό συνήθως προέρχεται από ενεργοποιημένα T λεμφοκύτταρα, τα οποία συμβάλλουν στην ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων, μέσω μιας ποικιλίας πρωτεϊνών. Μια από αυτές τις πρωτεΐνες είναι και η πρωτεΐνη CD40 (γνωστή και ως TNFRSF5, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 5), που αποτελεί μέλος της οικογένειας των υποδοχέων νέκρωσης όγκων και εκφράζεται στην επιφάνεια διαφόρων τύπων κυττάρων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται και τα B λεμφοκύτταρα. Η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης CD40 με τον προσδέτη της, CD40L (CD40 Ligand ή CD154), ο οποίος εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων T λεμφοκυττάρων, αποτελεί το κύριο συνδιεγερτικό σήμα για την ενεργοποίηση των B λεμφοκυττάρων και την έναρξη της χυμικής ανοσοαπόκρισης. Η παραπάνω αλληλεπίδραση (CD40-CD40L) είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των B λεμφοκυττάρων, το σχηματισμό βλαστικών κέντρων (GCs, Germinal Centers), τη μεταστροφή της τάξης των ανοσοσφαιρινών και την έκκριση αντισωμάτων (39–41). Η πρωτεΐνη CD40 διαδραματίζει επίσης ρόλο-κλειδί στην αμφίδρομη επικοινωνία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τα T λεμφοκύτταρα (42).

Ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) είναι ένας λειτουργικός SNP, που εντοπίζεται στην 5'-UTR του γονιδίου *CD40* και, ειδικότερα, στην περιοχή του DNA η οποία μεταγράφεται στην αλληλουχία Kozak του αντίστοιχου μορίου mRNA. Η αλληλουχία αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για την αποτελεσματική έναρξη της μετάφρασης. Η νουκλεοτιδική αλλαγή από θυμίνη σε κυτοσίνη λαμβάνει χώρα ακριβώς μια θέση πριν από το κωδικόνιο έναρξης ATG (θέση -1). Η παρουσία μιας θυμίνης, αντί μιας κυτοσίνης, στη συγκεκριμένη πολυμορφική θέση οδηγεί στην παραγωγή ενός μορίου mRNA, το οποίο μεταφράζεται με μικρότερη αποτελεσματικότητα, με συνέπεια τη μείωση της παραγωγής της αντίστοιχης πρωτεΐνης. Πιστεύεται ότι η παρουσία του αλληλομόρφου T ελαττώνει την έκφραση της πρωτεΐνης CD40 κατά 15-30%. Ο παραπάνω πολυμορφισμός του γονιδίου *CD40* φαίνεται να αποτελεί

καθοριστικό παράγοντα για την εκδήλωση διαφόρων ανοσοσχετιζόμενων νοσημάτων. Πιο συγκεκριμένα, ο εν λόγω πολυμορφισμός βρέθηκε να μειώνει τον κίνδυνο εμφάνισης νόσου του Graves (ιδίως στον ασιατικό πληθυσμό) και, αντίθετα, να αυξάνει τον κίνδυνο πολλαπλής σκλήρυνσης. Επιπλέον, ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου CD40 έχει συσχετιστεί αρνητικά με την παραγωγή IgG αντισωμάτων έναντι της πρωτεΐνης PnDBP (*Plasmodium vivax* Duffy Binding Protein) (43,44).

3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Όπως ήδη αναφέρθηκε, οι πολυμορφισμοί rs10813831 (c.19C>T) και rs1883832 (c.-1C>T) των γονιδίων *RIG-I* και *CD40*, αντίστοιχα, έχουν συσχετιστεί με μεταβολές στα επίπεδα των παραγόμενων αντισωμάτων έναντι συγκεκριμένων παθογόνων, μετά από εμβολιασμό ή λοίμωξη. Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι να διερευνηθεί η επίδραση των δύο προηγούμενων γενετικών πολυμορφισμών στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά από ενεργητική ανοσοποίηση έναντι του ιού SARS-CoV-2, με εμβόλιο mRNA (BNT162b2, Pfizer/BioNTech).

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Πληθυσμός μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν 340 άτομα, 135 άνδρες και 205 γυναίκες, τα οποία κατανέμονται, σχεδόν ισάριθμα, σε τρεις επιμέρους ηλικιακές ομάδες (20-50 ετών, 51-70 ετών, >70 ετών). Η διάμεση ηλικία των συμμετεχόντων ήταν τα 56 έτη, ενώ το ηλικιακό εύρος κυμαίνονταν από τα 26 έως τα 105 έτη. Στα άτομα που μελετήθηκαν περιλαμβάνονταν τόσο εργαζόμενοι στον υγειονομικό χώρο (ιατρικό, νοσηλευτικό και λοιπό προσωπικό του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας και του Κουτλιμπάνειου και Τριανταφύλλειου Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας) όσο και άλλοι πολίτες που μετέβησαν για εμβολιασμό στα αντίστοιχα κέντρα του νομού Λάρισας. Τα δημογραφικά στοιχεία των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη συλλέχθηκαν μέσω της συμπλήρωσης ερωτηματολογίου και παρουσιάζονται αναλυτικότερα στον Πίνακα 1. Σημειώνεται ότι όλα τα παραπάνω άτομα έδωσαν ενυπόγραφη συναίνεση συμμετοχής στη μελέτη, αφού πρώτα ενημερώθηκαν σχετικά με αυτή. Κατά την αποθήκευση και χορήγηση του εμβολίου ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του κατασκευαστή. Σε καθέναν από τους συμμετέχοντες χορηγήθηκαν ενδομυϊκά (στον δελτοειδή μυ) δύο δόσεις των 30 μικρογραμμάτων (0,3 μικρολίτρων) του mRNA εμβολίου BNT162b2 (εμπορικό σκεύασμα Comirnaty®, Pfizer/BioNTech). Για όλα τα άτομα που έλαβαν μέρος στη μελέτη, το μεσοδιάστημα χορήγησης μεταξύ των δύο δόσεων του εμβολίου ήταν 21 μέρες.

Πίνακας 1. Δημογραφικά χαρακτηριστικά του υπό μελέτη πληθυσμού

Χαρακτηριστικό		Αριθμός εμβολιασμένων ατόμων	Ποσοστό εμβολιασμένων ατόμων
Φύλο	Άνδρες	135	39,7%
	Γυναίκες	205	60,3%
Ηλικία	20-50 ετών	120	35,3%
	51-70 ετών	117	34,4%
	>70 ετών	103	30,3%
Σύνολο		340	100%

4.2. Συλλογή δειγμάτων

Σε χρονικά διαστήματα 21, 42 και 90 ημερών από τη χορήγηση της πρώτης δόσης του εμβολίου BNT162b2 (Comirnaty[®], Pfizer/BioNTech), από κάθε εμβολιασμένο συλλέχθηκε ολικό περιφερικό αίμα (4-6 mL), το οποίο κατόπιν φυγοκεντρήθηκε για την απομόνωση ορού (φυγοκέντρωση με ταχύτητα 3000 rpm για 10 λεπτά). Η συλλογή και των τριών παραπάνω δειγμάτων αίματος πραγματοποιήθηκε σε φιαλίδια βιοχημικού προσδιορισμού, με επιταχυντή πήξεως και αδρανές gel διαχωρισμού σε μορφή όνουχα. Η φυγοκέντρωση έλαβε χώρα σε θερμοκρασία δωματίου εντός 1-2 ωρών από τη δειγματοληψία. Το υπερκείμενο (ορός) αποθηκεύτηκε στους -20°C, μέχρι τη χρήση του. Την ημέρα χορήγησης της δεύτερης δόσης του εμβολίου (21 ημέρες μετά τη χορήγηση της πρώτης δόσης), από κάθε εμβολιασμένο ελήφθη και μια επιπρόσθετη ποσότητα ολικού περιφερικού αίματος (2-4 mL), η οποία μεταφέρθηκε σε σωληνάριο επικαλυμμένο εσωτερικά με ξηρό αντιπηκτικό παράγοντα K₂EDTA. Το αίμα αυτό αποθηκεύτηκε αρχικά στους 4°C και κατόπιν χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA.

4.3. Υλικά και αντιδραστήρια

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά και αντιδραστήρια:

4.3.1. Διαλύτες/Αραιωτικά μέσα

- ❖ Απόλυτη αιθανόλη (Ethanol absolute for molecular biology, AppliChem GmbH, Germany)
- ❖ Διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethyl sulfoxide for molecular biology, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- ❖ Ενέσιμο ύδωρ (WATER FOR INJECTION 1000 mL, ΒΙΟΣΕΡ Α.Ε. και DEMO SOLV.INJ. BTX50AMPX10ML, DEMO A.B.E.E.)

4.3.2. Αντιδραστήρια ενίσχυσης και ηλεκτροφόρησης DNA

- ❖ Ένζυμα πολυμερισμού DNA (DFS-Taq DNA polymerase, DFS HotTaq DNA Polymerase, BIORON GmbH, Römerberg, Germany)
- ❖ Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTP Set 100 mM, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ❖ Συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές (Biologio B.V., Nijmegen, The Netherlands)
- ❖ Αγαρόζη (UltraPure[™] Agarose, Invitrogen, Carlsbad, USA)
- ❖ Πυκνό ρυθμιστικό διάλυμα TBE 10X (Tris-Borate-EDTA, 10X concentrated buffer for electrophoresis, GRiSP, Lda., Porto, Portugal)

- ❖ Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου 10 mg/mL (Ethidium Bromide Solution, 10 mg/mL, Bio-Rad Laboratories, Inc.)
- ❖ Μάρτυρας μεγέθους DNA (DNA Marker 100 bp PLUS, GENEON GmbH, Germany)
- ❖ Διάλυμα φόρτωσης (Formaldehyde Load Dye, Ambion, UK)

4.3.3. Ένζυμα περιορισμού

- ❖ Ενδονουκλεάση περιορισμού NcoI (New England Biolabs Ltd., UK)
- ❖ Ενδονουκλεάση περιορισμού HgaI (New England Biolabs Ltd., UK)

4.3.4. Εμπορικά διαθέσιμα σετ αντιδραστηρίων (kits)

- ❖ Kit απομόνωσης γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα (EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT, Blirt, Gdańsk, Poland)
- ❖ Kit προσδιορισμού IgG αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινο ορό (SARS-CoV-2 IgG assay, Abbott Laboratories Inc., Illinois, USA)
- ❖ Kit προσδιορισμού IgA αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 σε ανθρώπινο ορό (Serion ELISA agile IgA, Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Germany)

4.4. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ολικό περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα δείγματα ολικού περιφερικού αίματος τα οποία συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκε το EXTRACTME GENOMIC DNA EM13 KIT, που διατίθεται στο εμπόριο από την εταιρία Blirt. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για κάθε δείγμα περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω. Σε σωλήνα μικροφυγοκέντρου Eppendorf® 1,5 mL μεταφέρθηκαν 200 µL ολικού περιφερικού αίματος και κατόπιν προστέθηκε σε αυτά 1 mL διαλύματος λύσης ερυθροκυττάρων (RBC Lysis Buffer, BioLegend, Inc., San Diego, CA). Το μίγμα αναδεύτηκε και κατόπιν αφέθηκε σε ηρεμία, μέχρι να λυθούν τα ερυθροκύτταρα (δηλαδή μέχρι διαυγάσεως). Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $8.600 \times g$, για 4 min. Το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε, ενώ το ίζημα επαναιωρήθηκε σε 375 µL διαλύματος GL (GL Buffer, Blirt). Ακολούθως, στο εναίωρημα που προέκυψε προστέθηκαν αρχικά 4 µL RNAάσης A και ακολούθησε επώαση σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 10 min. Μετά την παρέλευση αυτού του χρόνου, στο μίγμα προστέθηκαν επιπλέον 10 µL πρωτεΐνάσης K και κατόπιν αυτό μεταφέρθηκε σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C, όπου παρέμεινε για 30 min. Έπειτα, το μίγμα αποσύρθηκε από το υδατόλουτρο και αναμίχθηκε, μέχρι ομογενοποίησης, με 400 µL διαλύματος GB (GB Buffer, Blirt). Στη συνέχεια, φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $13.000 \times g$ για 2 min και το υπερκείμενο υγρό που συλλέχθηκε μεταφέρθηκε σε στήλη, η οποία εμπεριέχονταν σε σωλήνα συλλογής υγρού (collection tube).

Το περιεχόμενο της στήλης φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $13.000 \times g$ για 1 min και ακολούθως ο σωλήνας συλλογής υγρού απορρίφθηκε. Στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας, η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής υγρού και πραγματοποιήθηκε πλύση με 600 μL διαλύματος GW1 (GW1 Buffer, Bliirt). Ύστερα από φυγοκέντρηση με ταχύτητα $13.000 \times g$ για 30 sec, το περιεχόμενο του σωλήνα συλλογής υγρού απορρίφθηκε, ενώ στη στήλη προστέθηκαν 500 μL διαλύματος GW2 (GW2 Buffer, Bliirt). Ακολούθησε μια δεύτερη φυγοκέντρηση με ταχύτητα $13.000 \times g$ για 30 sec, μετά την οποία το συλλεχθέν υγρό και πάλι απορρίφθηκε. Η στήλη (μαζί με τον υποδοχέα συλλογής υγρού) φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $16.000 \times g$ για 2 min (προς απομάκρυνση υγρού που είχε τυχόν παραμείνει), ο υποδοχέας συλλογής υγρού απορρίφθηκε μαζί με το περιεχόμενό του και η στήλη μεταφέρθηκε στον τελικό περιέκτη, όπου πραγματοποιήθηκε η έκλυση του DNA. Μετά την προσθήκη 100 μL διαλύματος έκλυσης (Elution Buffer, Bliirt), η στήλη (εντός του τελικού περιέκτη) αφήθηκε σε ηρεμία για 5 min και τελικά φυγοκεντρήθηκε με ταχύτητα $13.000 \times g$ για 1 min. Το γονιδιωματικό DNA που απομονώθηκε (3-10 μg) αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

4.5. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I*

Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) ενισχύθηκε ένα τμήμα DNA του γονιδίου *RIG-I*, μεγέθους 447 bp. Η ενίσχυση του παραπάνω τμήματος DNA πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction), χρησιμοποιώντας τους εκκινητές του Πίνακα 2. Η ανθρώπινη αλληλουχία του γονιδίου *RIG-I* έγινε διαθέσιμη μέσω της ιστοσελίδας <http://www.ensembl.org>, ενώ οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του βιοπληροφορικού εργαλείου BLAST και του λογισμικού Oligo V.6.

Πίνακας 2. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου *RIG-I*

Εκκινητής	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μήκος (nt)
Πρόσθιος (Forward)	5' ACTAGCCCGAGGCAAAACAG 3'	20
Ανάστροφος (Reverse)	5' CACAAACCTGGGGAGTCTGG 3'	20

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 30 μL , εκ των οποίων 2 μL αντιστοιχούσαν στο προς ενίσχυση γονιδιωματικό DNA (περίπου 100-200 ng). Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 3,1 μL ρυθμιστικού διαλύματος 10X (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 2,4 μL ισομοριακού μίγματος των δεοξυριβονουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dCTP, και dGTP, 0,5 μL διαλύματος χλωριούχου μαγνησίου (MgCl_2 100mM), 0,6 μL διαλύματος κάθε εκκινητή (50pmol/ μL) και

0,25 μ L DFS-Taq DNA πολυμεράσης (BIORON GmbH, Römerberg, Germany). Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιήθηκε σε θερμοκυκλοποιητή Veriti[®] Thermal Cycler, Applied Biosystems, κάτω από τις συνθήκες που αναφέρονται στον Πίνακα 3. Η αλληλουχία του προϊόντος της PCR και οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών παρουσιάζονται στην εικόνα 6.

Πίνακας 3. Στάδια και συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου *RIG-I*

Στάδιο	Συνθήκες (θερμοκρασία και χρονική διάρκεια)	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C για 2 min	-
Αποδιάταξη	94°C για 30 sec	32
Υβριδισμός εκκινητών	58°C για 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 1 min	-

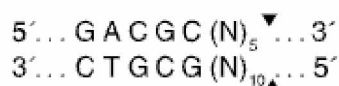


Εικόνα 6. Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I*, στο οποίο επισημαίνονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, οι αλληλουχίες αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού HgaI (σε κόκκινο πλαίσιο) και η πολυμορφική θέση rs10813831 (με αστερίσκο). Κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού SnapGene Viewer.

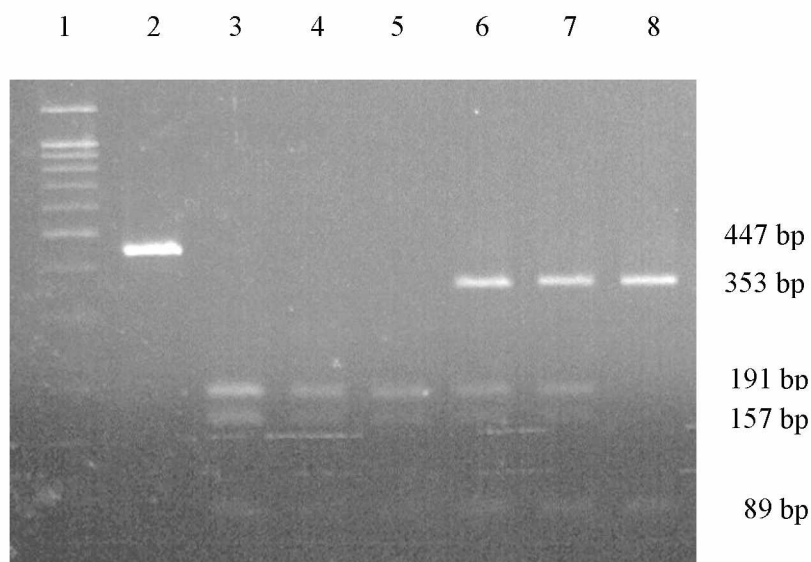
Η επιτυχία της παραπάνω αντίδρασης διαπιστώθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v (120 V, 400 mA, 40 min). Για την παρασκευή της πηκτής, 2,0 g αγαρόζης διαλύθηκαν (με θέρμανση) στον απαιτούμενο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1X και, μετά από ψύξη, προστέθηκαν στο μίγμα 5 μ L διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου, συγκέντρωσης 10 mg/mL. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης και την έκθεση της πηκτής σε υπεριώδες φως (MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel), το προϊόν της PCR παρείχε μια ζώνη DNA, μεγέθους 447 bp. Για τον έλεγχο της παρουσίας

επιμολύνσεων στο μίγμα της αντίδρασης, σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκε ένα τυφλό δείγμα, το οποίο περιείχε 2 μL αποστειρωμένου νερού αντί ίσης ποσότητας γονιδιωματικού DNA. Το τυφλό δείγμα δεν έδωσε καμία ζώνη, μετά την ηλεκτροφόρηση και την έκθεση της πηκτής αγαρόζης σε υπεριώδες φως.

Κατόπιν, τα προϊόντα της PCR επωάστηκαν με το ένζυμο περιορισμού HgaI σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 4 ώρες. Για την πέψη 5 μL κάθε προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I* χρησιμοποιήθηκαν 0,5 μL του ενζύμου περιορισμού HgaI και 1,3 μL ρυθμιστικού διαλύματος 1X NEBuffer™ r1.1 (παρέχεται από τον κατασκευαστή μαζί με το ένζυμο περιορισμού). Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 12,5 μL . Σε κάθε αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκε θετικό (ετερόζυγο) δείγμα αναφοράς, στο οποίο η παρουσία του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) είχε προηγουμένως επιβεβαιωθεί με αλληλούχηση. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν, στη συνέχεια, για 1 ώρα (120 V, 400 mA) σε πηκτική αγαρόζης 2,5% w/v, η οποία παρασκευάστηκε με τρόπο ανάλογο με αυτόν που περιγράφηκε νωρίτερα για την πηκτική 2% w/v.



Εικόνα 7. Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού HgaI. Ανατύπωση από: <https://international.neb.com>



Εικόνα 8. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* με PCR-RFLP. Μάρτυρας μεγέθους DNA (διαδρομή 1), προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I* (διαδρομή 2) και θραύσματα DNA που λαμβάνονται μετά από πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I* για άτομα αγρίου τύπου (διαδρομές 3-5), ετερόζυγα (διαδρομές 6-7) και ομόζυγα (διαδρομή 8) για τον εν λόγω πολυμορφισμό.

Δεδομένου ότι η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού HgaI [GACGC(5/10)[^], Εικόνα 7] απαντάται δύο φορές στο προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I*, μετά την πέψη των προϊόντων της PCR για τα άτομα αγρίου τύπου (wild-type, γονότυπος CC) λαμβάνονται τρία θραύσματα DNA, μεγέθους 89, 157 και 191 bp. Η παρουσία του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) καταργεί τη μια από τις δύο θέσεις αναγνώρισης του ενζύμου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτουν για τα ομόζυγα για τον πολυμορφισμό άτομα (γονότυπος TT) δύο θραύσματα DNA, μεγέθους 89 και 353 bp (μετά την πέψη των προϊόντων της PCR). Για τα ετερόζυγα άτομα, που φέρουν ένα αλληλόμορφο C και ένα αλληλόμορφο T (γονότυπος CT), λαμβάνονται, όπως είναι αναμενόμενο, τέσσερα θραύσματα DNA, μετά την πέψη των προϊόντων της PCR, τα οποία αντιστοιχούν στα μεγέθη 89, 157, 191 και 353 bp. Μια αντιπροσωπευτική φωτογραφία των προϊόντων που προκύπτουν από την πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *RIG-I* σε καθεμιά από τις τρεις παραπάνω περιπτώσεις παρέχεται στην Εικόνα 8.

4.6. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40*

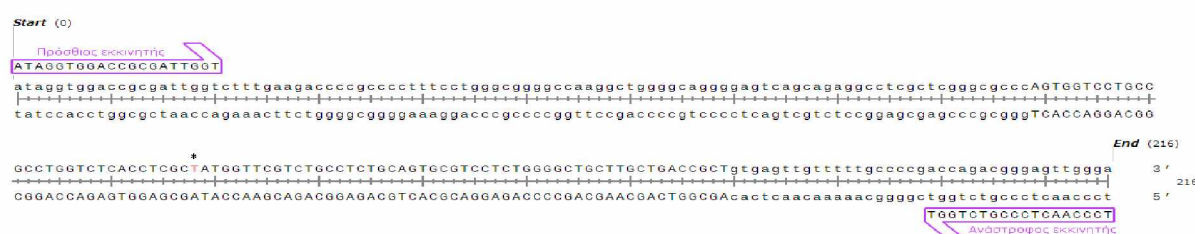
Ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* ανιχνεύτηκε επίσης με τη μέθοδο PCR-RFLP. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ανάλογη με αυτή που εφαρμόστηκε και για τον εντοπισμό του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I*. Το επιθυμητό τμήμα DNA του γονιδίου *CD40*, μεγέθους 216 bp, ενισχύθηκε με τη χρήση των εκκινητών του Πίνακα 4 (Εικόνα 9). Οι συνθήκες καθενός από τα επιμέρους στάδια της αντίδρασης πολυμερισμού καταγράφονται στον Πίνακα 5. Το μίγμα της αντίδρασης (τελικού όγκου 30 μ L) είχε την ίδια σύσταση με αυτή που περιγράφηκε νωρίτερα για το γονίδιο *RIG-I*, με τη διαφορά ότι εδώ χρησιμοποιήθηκε διαφορετική DNA πολυμεράση (DFS HotTaq DNA Polymerase, BIORON GmbH, Römerberg, Germany). Μια ακόμα διαφορά είναι ότι, σε αυτή την περίπτωση, το μίγμα της αντίδρασης πολυμερισμού περιείχε επιπλέον 3,1 μ L διαλύματος διμεθυλοσουλφοξειδίου (DMSO, Dimethyl Sulfoxide) 12% w/v, ώστε να διευκολυνθεί η αποδιάταξη των δύο αλυσίδων του DNA. Η χρήση του DMSO δικαιολογείται από την υψηλή περιεκτικότητα του προς ενίσχυση τμήματος DNA σε GC.

Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου *CD40*

Εκκινητής	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων	Μήκος (nt)
Πρόσθιος (Forward)	5' ATAGGTGGACCGCGATTGGT3'	20
Ανάστροφος (Reverse)	5' TCCCAACTCCCGTCTGGT3'	18

Πίνακας 5. Στάδια και συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης για την ενίσχυση του επιθυμητού τμήματος DNA του γονιδίου *CD40*

Στάδιο	Συνθήκες (θερμοκρασία και χρονική διάρκεια)	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 10 min	-
Αποδιάταξη	94°C για 30 sec	32
Υβριδισμός εκκινητών	58°C για 30 sec	
Επιμήκυνση	72°C για 30 sec	
Τελική επιμήκυνση	72°C για 10 min	-



Εικόνα 9. Αλληλουχία νουκλεοτιδίων του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *CD40*, στο οποίο επισημαίνονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και η πολυμορφική θέση rs1883832 (με αστερίσκο). Κατασκευάστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού SnapGene Viewer.

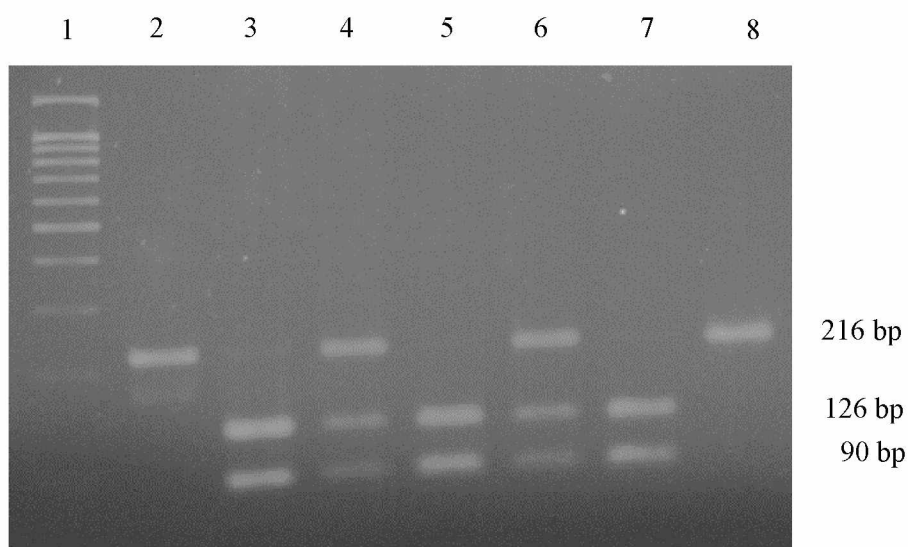
Τα προϊόντα της PCR επώαστηκαν με το ένζυμο περιορισμού NcoI σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 8-10 ώρες. Για την πέψη 5 μ L κάθε προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *CD40* χρησιμοποιήθηκαν 0,4 μ L του ενζύμου περιορισμού NcoI και 1,3 μ L ρυθμιστικού διαλύματος 1X rCutSmart™ Buffer (παρέχεται από τον κατασκευαστή μαζί με το ένζυμο περιορισμού). Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 12,5 μ L (όπως και κατά τη μελέτη του πολυμορφισμού rs10813831 του γονιδίου *RIG-I*). Σε κάθε αντίδραση πέψης χρησιμοποιήθηκε θετικό (ομόζυγο) δείγμα αναφοράς, στο οποίο η παρουσία του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) είχε επιβεβαιωθεί νωρίτερα με αλληλούχηση. Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν, στη συνέχεια, για 50 λεπτά (120 V, 400 mA) σε πηκτή αγαρόζης 2,5% w/v.

Όπως διαπιστώνεται από την Εικόνα 9, όταν στην πολυμορφική θέση rs1883832 του γονιδίου *CD40* υπάρχει θυμίνη (αντί κυτοσίνης), το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CD40* δεν εμπεριέχει καμία θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού NcoI (C^CATGG, Εικόνα 10) και, κατά συνέπεια, δεν κόβεται. Αντιθέτως, όταν στην παραπάνω πολυμορφική θέση υπάρχει κυτοσίνη, το ένζυμο περιορισμού κόβει το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CD40* σε μία θέση

και λαμβάνονται δύο θραύσματα DNA, μεγέθους 126 και 90 bp. Επομένως, μετά την πέψη των προϊόντων της PCR, προκύπτουν δύο θραύσματα DNA (μεγέθους 126 και 90 bp) για τα άτομα αγρίου τύπου (γονότυπος CC) και τρία θραύσματα (μεγέθους 216, 126 και 90 bp) για τα ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό άτομα (γονότυπος CT). Στην περίπτωση ατόμων που είναι ομόζυγα για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό, δηλαδή φέρουν δύο αντίγραφα του αλληλομόρφου T (γονότυπος TT), λαμβάνεται μια ζώνη DNA (μεγέθους 216 bp) κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης, η οποία αντιστοιχεί στο άκοπο προϊόν της PCR. Μια χαρακτηριστική εικόνα των προϊόντων που προκύπτουν, μετά την πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *CD40*, σε καθεμιά από τις τρεις προηγούμενες περιπτώσεις δίνεται παρακάτω (Εικόνα 11).



Εικόνα 10. Αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού NcoI. Ανατύπωση από: <https://international.neb.com>



Εικόνα 11. Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* με PCR-RFLP. Μάρτυρας μεγέθους DNA (διαδρομή 1), προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου *CD40* (διαδρομή 2) και θραύσματα DNA που λαμβάνονται μετά από πέψη του προϊόντος ενίσχυσης του γονιδίου *CD40* για άτομα αγρίου τύπου (διαδρομές 3, 5 και 7), ετερόζυγα (διαδρομές 4 και 6) και ομόζυγα (διαδρομή 8) για τον εν λόγω πολυμορφισμό.

4.7. Προσδιορισμός IgG αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2

Τα επίπεδα των IgG αντισωμάτων στον ορό των ατόμων που έλαβαν μέρος στη μελέτη προσδιορίστηκαν με τη χρήση του εμπορικά διαθέσιμου kit SARS-CoV-2 IgG assay, Abbott Laboratories Inc. (Illinois, USA). Το συγκεκριμένο kit είναι σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο ώστε να ανιχνεύει IgG αντισώματα έναντι της επικράτειας RBD της υπομονάδας S1 της πρωτεΐνης-ακίδας (S) του ιού SARS-CoV-2. Πρόκειται για μια αυτοματοποιημένη ανοσολογική δοκιμασία δύο σταδίων, που βασίζεται στην τεχνολογία της μικροσωματιδιακής ανοσοεξέτασης χημειοφωταύγειας (CMIA, Chemiluminescent Microparticle Immunoassay). Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στον αναλυτή Architect i2000SR (Abbott). Συνοπτικά, το δείγμα αναμίχθηκε με παραμαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με το αντιγόνο του ιού SARS-CoV-2, καθώς και με αραιωτικό μέσο, και κατόπιν επώαστηκε, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Κατά το στάδιο αυτό, τα IgG αντισώματα που υπήρχαν στο δείγμα δεσμεύτηκαν στα μικροσωματίδια τα οποία ήταν επικαλυμμένα με το αντιγόνο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε πλύση του μίγματος και ακολούθησε επώαση αυτού παρουσία αντι-ανθρώπινης IgG ανοσοσφαιρίνης, επισημασμένης με ακριδίνη. Μετά από έναν κύκλο πλύσης, προστέθηκαν στο μίγμα το διάλυμα αρχικής φωτοενεργοποίησης (Pre-Trigger Solution) και το διάλυμα φωτοενεργοποίησης (Trigger Solution). Το σήμα της αντίδρασης χημειοφωταύγειας μετράται σε σχετικές μονάδες φωτεινότητας (RLU, Relative Light Unit), οι οποίες βρίσκονται σε άμεση συσχέτιση με την ποσότητα των IgG αντισωμάτων που υπάρχουν στο δείγμα. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράστηκαν σε αυθαίρετες μονάδες ανά μικρόλιτρο (AU/mL). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, το κατώτατο θετικό όριο για τη συγκεκριμένη δοκιμασία είναι τα 50 AU/mL.

4.8. Προσδιορισμός IgA αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των IgA αντισωμάτων στον ορό των ατόμων που εμβολιάστηκαν έναντι του ιού SARS-CoV-2 εφαρμόστηκε η ανοσοενζυμική μέθοδος ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Η δοκιμασία πραγματοποιήθηκε στον αυτόματο αναλυτή DSX[®], Dynex Technologies, Inc., χρησιμοποιώντας το εμπορικά διαθέσιμο kit Serion ELISA agile IgA, Institut Virion\Serion GmbH (Würzburg, Germany). Τα πηγαδάκια των πλακών μικροτιτλοποίησης ήταν επικαλυμμένα με ειδικά αντιγόνα του ιού SARS-CoV-2 [υψηλής καθαρότητας ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες του νουκλεοκαψιδίου και ολόκληρες πρωτεΐνες S (S1/S2)]. Τα προς ανάλυση δείγματα, αφού πρώτα αραιώθηκαν (αραιώση 1:101), μεταφέρθηκαν στα επικαλυμμένα πηγαδάκια και επώαστηκαν σε θάλαμο υγρασίας, θερμοκρασίας 37°C, για 60 min. Κατά τη διαδικασία αυτή, τα ειδικά IgA αντισώματα των θετικών δειγμάτων δεσμεύτηκαν στα αντιγόνα του ιού, τα οποία ήταν καθηλωμένα στην

επιφάνεια των υποδοχέων της πλάκας μικροτιτλοποίησης. Μετά από πλύση ($4 \times 300 \mu\text{L}$), τα δεσμευμένα IgA αντισώματα επώστηκαν για 30 min σε θάλαμο υγρασίας 37°C , παρουσία $100 \mu\text{L}$ αντι-ανθρώπινης IgA ανοσοσφαιρίνης (δευτερογενές αντίσωμα), συζευγμένης με αλκαλική φωσφατάση. Ακολούθησε πλύση ($4 \times 300 \mu\text{L}$), προσθήκη $100 \mu\text{L}$ χρωμογόνου υποστρώματος (φωσφορικού άλατος της παρα-νιτροφαινόλης) σε κάθε πηγαδάκι και επώση για 30 min σε θάλαμο υγρασίας 37°C , υπό συνθήκες σκότους. Στο τελικό στάδιο της διαδικασίας, σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν $100 \mu\text{L}$ διαλύματος τερματισμού (stop solution). Η αλκαλική φωσφατάση καταλύει τη μετατροπή του άχρωμου υποστρώματος pNPP (p-Nitrophenyl Phosphate) στο έγχρωμο προϊόν π-νιτροφαινόλη. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των αντισωμάτων στο δείγμα. Στη συγκεκριμένη δοκιμασία, η οπτική πυκνότητα (OD) των υπό εξέταση δειγμάτων προσδιορίστηκε φωτομετρικά με μέτρηση της απορρόφησης στα 405 nm . Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν θετικά και αρνητικά δείγματα αναφοράς, που παρέχονται από τον κατασκευαστή. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράστηκαν σε U/mL. Θετικά θεωρήθηκαν τα δείγματα στα οποία η συγκέντρωση των IgA αντισωμάτων ήταν μεγαλύτερη από 14 U/mL .

4.9. Στατιστική επεξεργασία των πειραμάτων αποτελεσμάτων

Για την αξιολόγηση των διαφορών που παρατηρούνται ανάμεσα στα άτομα με διαφορετικό γονότυπο ως προς τα επίπεδα των παραγόμενων IgG και IgA αντισωμάτων, μετά τον εμβολιασμό, εφαρμόστηκε η μη παραμετρική δοκιμασία Kruskal-Wallis. Στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι διαφορές που αντιστοιχούσαν σε τιμές $p < 0,05$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)

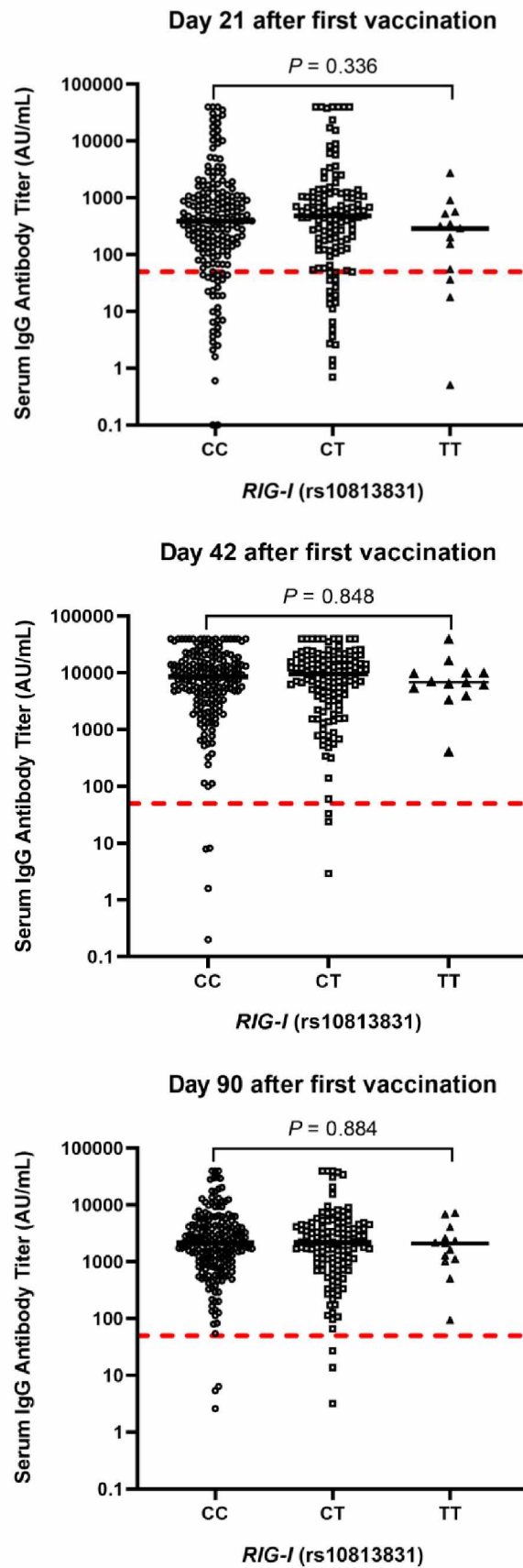
5. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. Επίδραση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις μετά τον εμβολιασμό

Μεταξύ των 340 ατόμων που μελετήθηκαν για τον πολυμορφισμό rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* περιλαμβάνονταν 198 άτομα αγρίου-τύπου (γονότυπος CC), 129 ετερόζυγα (γονότυπος CT) και 13 ομόζυγα (γονότυπος TT). Οι παρατηρούμενες γονοτυπικές συχνότητες στον υπό μελέτη πληθυσμό ικανοποιούν τις προϋποθέσεις της ισορροπίας Hardy-Weinberg ($p=0,151$). Η συχνότητα του T αλληλομόρφου βρέθηκε ίση με 22,79%. Όπως προκύπτει από τα επόμενα διαγράμματα (Εικόνα 12), ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός του γονιδίου *RIG-I* δε φαίνεται να ασκεί σημαντική επίδραση στην παραγωγή των IgG αντισωμάτων μετά τον εμβολιασμό ($p>0,05$). Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση των IgA αντισωμάτων (Εικόνα 13), όπου και πάλι δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό γονότυπο ($p>0,05$).

Πίνακας 6. Μέσος τίτλος IgG αντισωμάτων στον ορό για άτομα με διαφορετικό γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό

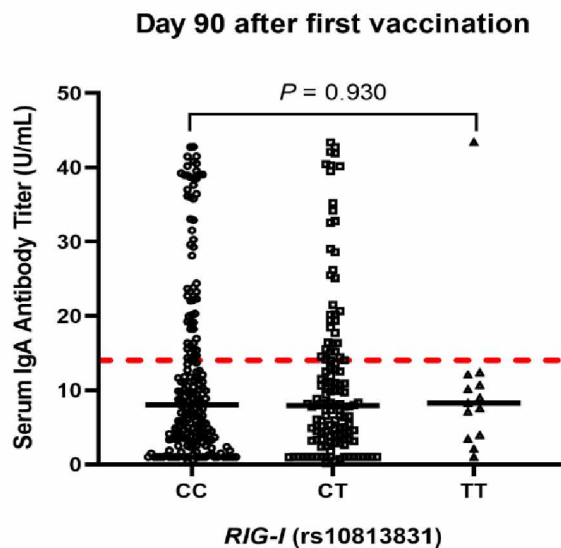
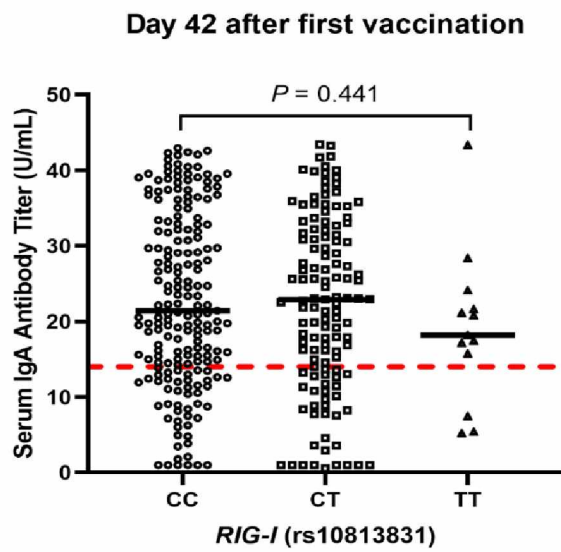
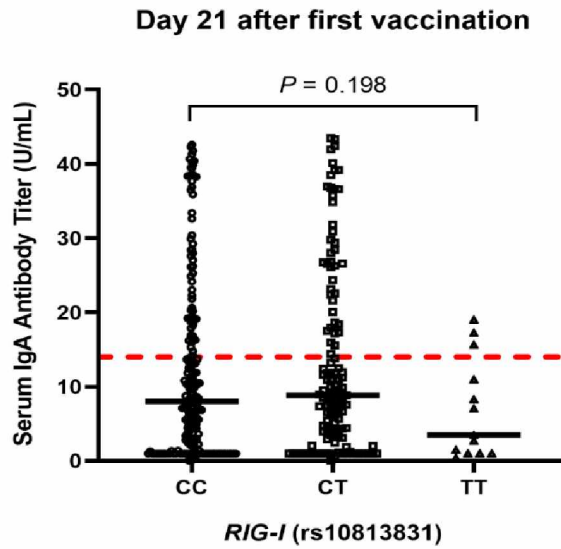
Γονότυπος	Αριθμός ατόμων, ποσοστό	21η ημέρα		42η ημέρα		90η ημέρα	
		Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p
CC	198 (58,3%)	2512,1 (0,0-40000)	0,336	12257,1 (0,2-40000)	0,848	4308,4 (0,0-40000)	0,884
CT	129 (37,9%)	3384,1 (0,0-40000)		11964,8 (2,9-40000)		4396,8 (3,2-40000)	
TT	13 (3,8%)	467,2 (0,5-27020)		9764,9 (415-40000)		2510,0 (93,3-7139,1)	



Εικόνα 12. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* με τα επίπεδα των IgG αντισωμάτων στον ορό στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό.

Πίνακας 7. Μέσος τίτλος IgA αντισωμάτων στον ορό για άτομα με διαφορετικό γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό

Γονότυπος	Αριθμός ατόμων, ποσοστό	21η ημέρα		42η ημέρα		90η ημέρα	
		Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p
CC	198 (58,3%)	12,3 (0,0-62,8)	0,198	23,6 (1,0-62,7)	0,441	13,0 (0,3-42,8)	0,930
CT	129 (37,9%)	13,4 (0,0-64,9)		22,6 (0,6-64,6)		11,2 (0,2-43,4)	
TT	13 (3,8%)	6,9 (0,0-19,0)		18,9 (5,2-43,3)		10,1 (1,0-43,4)	



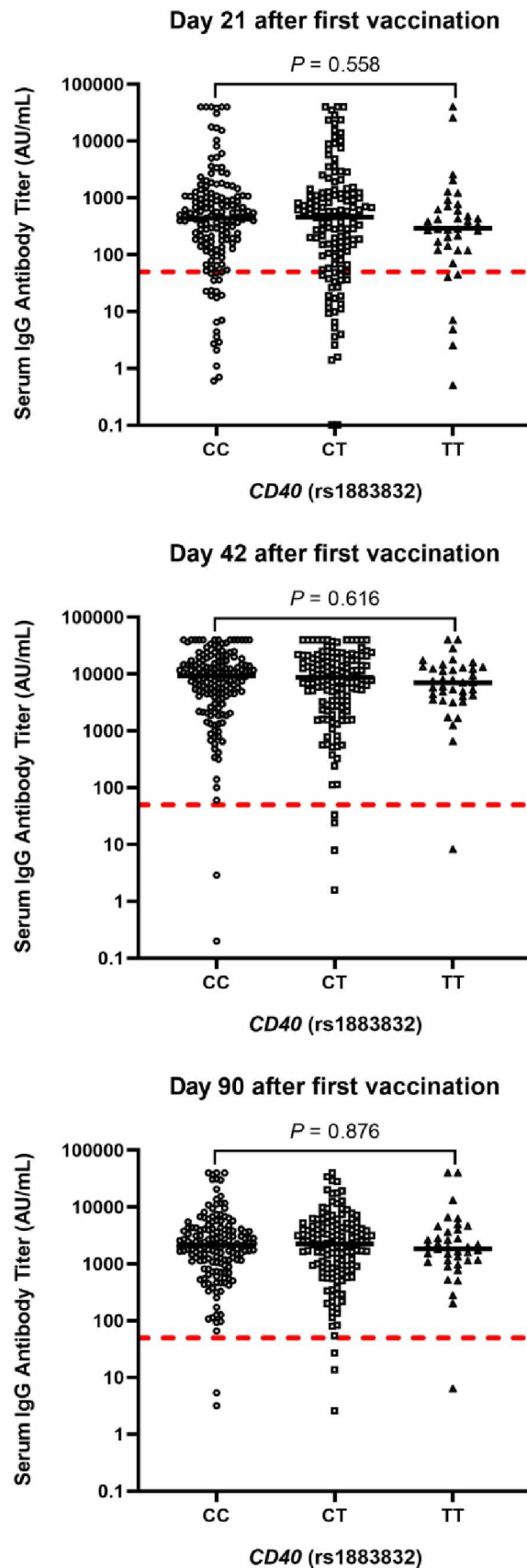
Εικόνα 13. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* με τα επίπεδα των IgA αντισωμάτων στον ορό στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό.

5.2. Επίδραση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* στις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις μετά τον εμβολιασμό

Από τη γενετική ανάλυση των 340 ατόμων που μελετήθηκαν ως στις τον πολυμορφισμό rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* προέκυψαν 160 άτομα αγρίου-τύπου (γονότυπος CC), 142 ετερόζυγα (γονότυπος CT) και 38 ομόζυγα (γονότυπος TT). Οι γονοτυπικές συχνότητες που καταγράφηκαν στον υπό μελέτη πληθυσμό δεν παρουσιάζουν σημαντικές αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg ($p=0,446$). Σύμφωνα με τα παρακάτω διαγράμματα (Εικόνα 14), η παρουσία του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* δε φαίνεται να έχει σημαντικό αντίκτυπο στις IgG αντισωματικές απαντήσεις μετά τον εμβολιασμό ($p>0,05$). Ωστόσο, φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή των IgA αντισωμάτων. Παρατηρούμε (Εικόνα 15) ότι άτομα που φέρουν το αλληλόμορφο T (γονότυπος CT ή TT) του γονιδίου *CD40* (rs1883832, c.-1C>T) παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις στον τίτλο των IgA αντισωμάτων στις, συγκριτικά με τα άτομα αγρίου-τύπου. Οι παραπάνω στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις εμφανίζονται αρχικά στις 42 ημέρες ($p=0,010$) μετά τον πρώτο εμβολιασμό, ενώ διατηρούνται και στις 90 ημέρες ($p=0,026$). Η επίδραση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού φαίνεται να είναι μεγαλύτερη στα ομόζυγα για το T αλληλόμορφο άτομα και στις 42 ημέρες μετά τη χορήγηση στις πρώτης δόσης του εμβολίου.

Πίνακας 8. Μέσος τίτλος IgG αντισωμάτων στον ορό για άτομα με διαφορετικό γονότυπο ως στις τον πολυμορφισμό rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό

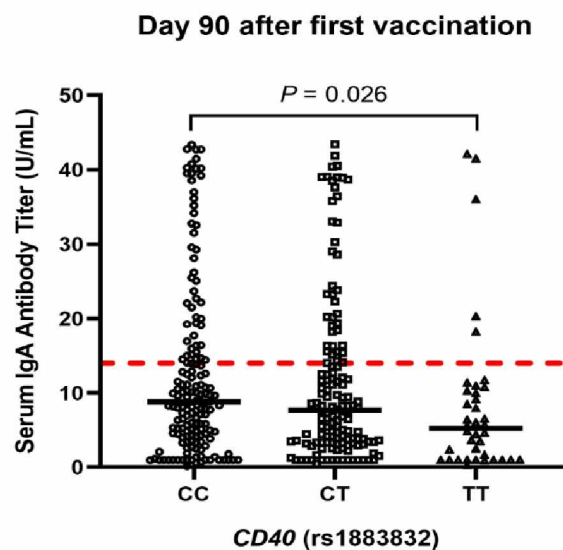
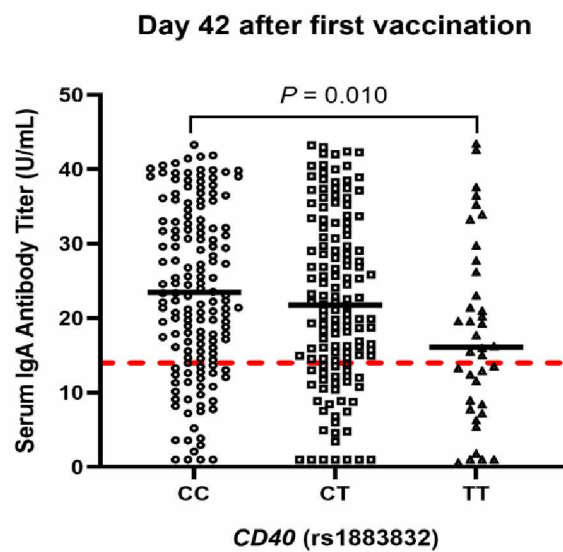
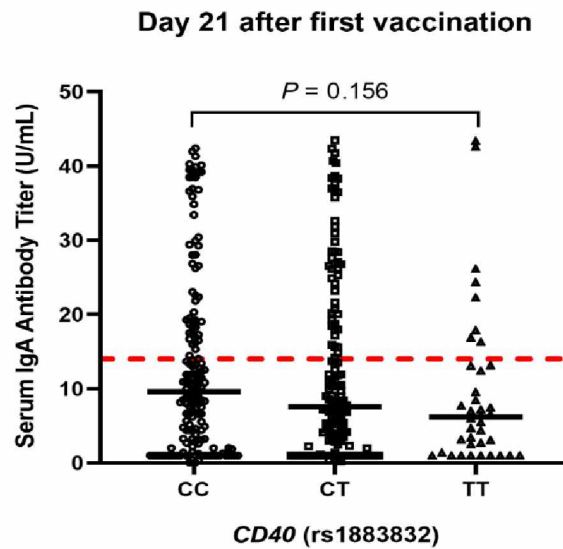
Γονότυπος	Αριθμός ατόμων, ποσοστό	21 ^η ημέρα		42 ^η ημέρα		90 ^η ημέρα	
		Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p
CC	160 (47,0%)	2755,9 (0,0-40000)	0,558	12321,4 (0,2-40000)	0,616	4349,9 (3,2-40000)	0,876
CT	142 (41,8%)	2937,5 (0,0-40000)		12368,5 (1,6-40000)		4146,5 (0,0-40000)	
TT	38 (11,2%)	2156,3 (0,5-40000)		9725,0 (8,2-40000)		4423,8 (6,4-40000)	



Εικόνα 14. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* με τα επίπεδα των IgG αντισωμάτων στον ορό στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό.

Πίνακας 9. Μέσος τίτλος IgA αντισωμάτων στον ορό για άτομα με διαφορετικό γονότυπο ως προς τον πολυμορφισμό rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* στις 21, 42 και 90 μέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό

Γονότυπος	Αριθμός ατόμων, ποσοστό	21η ημέρα		42η ημέρα		90η ημέρα	
		Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p	Μέσος τίτλος αντισωμάτων, U/mL (εύρος)	p
CC	160 (47,0%)	13,5 (0,0-64,9)	0,156	24,8 (1,0-64,6)	0,010	12,6 (0,2-43,4)	0,026
CT	142 (41,8%)	12,2 (0,2-43,5)		22,4 (1,0-43,3)		11,5 (0,5-43,4)	
TT	38 (11,2%)	9,3 (1,0-43,4)		18,0 (0,6-43,4)		8,33 (0,3-42,1)	



Εικόνα 15. Συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* με τα επίπεδα των IgA αντισωμάτων στον ορό στις 21, 42 και 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε και στο εισαγωγικό μέρος της εργασίας, ο εμβολιασμός δεν επάγει ίδιας έντασης ανοσολογικές αποκρίσεις σε όλα τα άτομα. Αντιθέτως, οι ανοσολογικές αποκρίσεις που διεγείρονται μετά από εμβολιασμό παρουσιάζουν σημαντικές διαφοροποιήσεις από άτομο σε άτομο και μπορεί να παρέχουν επαρκή, ανεπαρκή ή ακόμα και μηδενική προστασία έναντι του εκάστοτε παθογόνου. Η παρατηρούμενη ετερογένεια στις επαγόμενες από εμβολιασμό κυτταρικές και αντισωματικές απαντήσεις είναι ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο, που οφείλεται σε έναν συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Αρκετοί παράγοντες, όπως το φύλο, η ηλικία, ο δείκτης μάζας σώματος, το γενετικό υπόβαθρο, οι συνήθειες και η κατάσταση της υγείας του ατόμου, είναι δυνατό να επηρεάσουν την ανοσολογική του απόκριση απέναντι στον εμβολιασμό, που αποτελεί ένα από τα ερεθίσματα τα οποία πυροδοτούν την ανοσιακή του απάντηση (31). Ωστόσο, η παρούσα μελέτη περιορίστηκε σε έναν μόνο από τους προηγούμενους παράγοντες. Συγκεκριμένα, επικεντρώθηκε στη συσχέτιση δύο πολυμορφισμών των γονιδίων *RIG-I* και *CD40* με τις IgG και IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά από εμβολιασμό έναντι του ιού SARS-CoV-2. Η μελέτη μας επιβεβαίωσε τα παραπάνω, δείχνοντας ότι, πράγματι, πολυμορφισμοί γονιδίων που εμπλέκονται στην ανοσολογική απόκριση μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στις επαγόμενες από εμβολιασμό αντισωματικές απαντήσεις.

Σύμφωνα με τα πειραματικά μας ευρήματα, ο πολυμορφισμός rs10813831 (c.19C>T) του γονιδίου *RIG-I* δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά ούτε τις IgG ούτε τις IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά από εμβολιασμό έναντι του ιού SARS-CoV-2, με σκεύασμα mRNA. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό το φαινόμενο είναι ότι τέτοιου είδους σκευάσματα περιέχουν ως δραστικά συστατικά μόρια mRNA, τα οποία φέρουν τροποποιημένα, μη φυσικά νουκλεοτίδια (N1-Μεθυλο-ψευδοουριδίνη, m1Ψ), γεγονός που περιορίζει την αλληλεπίδρασή τους με υποδοχείς της φυσικής ανοσίας (PRRs). Κατά συνέπεια, οι παραπάνω νουκλεοτιδικές τροποποιήσεις εμποδίζουν την υπερπαραγωγή ιντερφερονών τύπου I και άλλων διαμεσολαβητών της φλεγμονής, που θα προκαλούσαν μια υπέρμετρη ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος και θα μπορούσαν να αναστείλουν την κυτταρική διαδικασία μετάφρασης του χορηγούμενου mRNA. Άλλωστε μια υπερβολική φλεγμονώδης αντίδραση θα ήταν ανεπιθύμητη, καθώς θα μπορούσε να οδηγήσει σε σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες μετά τον εμβολιασμό, όπως αλλεργικές αντιδράσεις και αναφυλαξία. Επιπλέον, πριν την τελική μορφοποίησή τους, τα σκευάσματα των mRNA εμβολίων καθαρίζονται με χρωματογραφικές μεθόδους, ώστε να απαλλαγούν από ανοσοδιεγερτικά παραπροϊόντα που μπορεί να περιέχουν. Τα παραπροϊόντα αυτά σχηματίζονται κατά τη διαδικασία παραγωγής

των mRNA εμβολίων με *in vitro* μεταγραφή και περιλαμβάνουν μόρια δίκλωνου RNA και 5'-τριφωσφορικά RNA, τα οποία θα μπορούσαν να αναγνωριστούν, μεταξύ άλλων, από τον κυτταροπλασματικό υποδοχέα RIG-I. Οι διαδικασίες καθαρισμού των mRNA εμβολίων συντελούν στην περαιτέρω ενίσχυση της διαφυγής τους από το σύστημα της φυσικής ανοσίας και στην αύξηση της παραγωγής της αντιγονικής πρωτεΐνης S (20,25,27,45).

Είναι γνωστό ότι ώριμα B λεμφοκύτταρα (IgM⁺IgD⁺), αφού αναγνωρίσουν ειδικά ένα αντιγόνο (με τη βοήθεια του BCR υποδοχέα τους), διευρύνουν την ποικιλία των αντισωμάτων που παράγουν μέσω μοριακών γεγονότων γενετικού ανασυνδυασμού. Η ισοτυπική μεταστροφή (CSR, Class-switch Recombination), μαζί με τη σωματική υπερμετάλλαξη (SHM, Somatic Hypermutation), αποτελούν τις δύο κύριες διαδικασίες ωρίμανσης των B λεμφοκυττάρων και λαμβάνουν χώρα στα βλαστικά κέντρα των δευτερογενών λεμφικών οργάνων. Η πραγματοποίηση και των δύο παραπάνω διεργασιών προϋποθέτει τη συμμετοχή του μορίου CD40. Αποτέλεσμα της ισοτυπικής μεταστροφής είναι η παραγωγή IgG, IgA και IgE αντισωμάτων, που αναγνωρίζουν το ίδιο αντιγόνο με τα IgM και IgD αντισώματα, αλλά επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες (46,47). Δεδομένου του κρίσιμου ρόλου της πρωτεΐνης CD40 στην παραγωγή αντισωμάτων από τα B λεμφοκύτταρα, αλλά και στη μεταστροφή της τάξης των ανοσοσφαιρινών, θα περιμέναμε ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του αντίστοιχου γονιδίου να έχει ισχυρό αντίκτυπο τόσο στις IgG όσο και στις IgA αντισωματικές απαντήσεις, μετά τον εμβολιασμό. Ωστόσο, όπως παρουσιάστηκε και στην ενότητα των αποτελεσμάτων, μόνο στην περίπτωση των IgA αντισωμάτων παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό γονότυπο για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό. Ειδικότερα, διαπιστώσαμε ότι άτομα που φέρουν ένα ή δύο αντίγραφα του αλληλομόρφου που περιέχει θυμίνη στην πολυμορφική θέση (γονότυπος CT ή TT) εμφανίζουν χαμηλότερο τίτλο IgA αντισωμάτων έναντι του ιού SARS-CoV-2 στον ορό, σε σύγκριση με τα άτομα αγρίου-τύπου (γονότυπος CC). Η διαφοροποίηση αυτή στα επίπεδα των παραγόμενων IgA αντισωμάτων παρατηρήθηκε τόσο στις 42 όσο και στις 90 ημέρες μετά τον πρώτο εμβολιασμό. Διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει τη σπουδαιότητα των IgA αντισωμάτων στην άμυνα του οργανισμού έναντι του ιού της γρίπης και του ιού SARS-CoV-2. Μάλιστα, φαίνεται ότι, σε αυτές τις περιπτώσεις, τα IgA αντισώματα παρέχουν ισχυρότερη προστασία, σε σχέση με τα IgG. Πρόσφατα, ο Sterlin και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι οι IgA ανοσοσφαιρίνες του ορού έχουν επτά φορές μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης του ιού SARS-CoV-2, συγκρινόμενες με τις IgG ανοσοσφαιρίνες του ορού (48,49).

Με βάση το παραπάνω εύρημα, πιστεύουμε ότι ο πολυμορφισμός rs1883832 (c.-1C>T) του γονιδίου *CD40* θα μπορούσε να αποτελέσει έναν χρήσιμο γενετικό δείκτη, με ικανότητα να παρέχει μια πρώτη εκτίμηση της IgA αντισωματικής απάντησης, μετά από ενεργητική

ανοσοποίηση έναντι του ιού SARS-CoV-2, με εμβόλιο mRNA (BNT162b2, Comirnaty[®], Pfizer/BioNTech). Η πληροφορία αυτή θα μπορούσε να αξιοποιηθεί μελλοντικά για το σχεδιασμό εξατομικευμένων σχημάτων εμβολιασμού, τα οποία θα λαμβάνουν υπόψη τους τις γενετικές διαφορές μεταξύ των εμβολιαζόμενων ατόμων, διασφαλίζοντας έτσι τη βέλτιστη προστασία για κάθε μεμονωμένο άτομο. Η πρόβλεψη της αποτελεσματικότητας του εμβολιασμού με τη διεξαγωγή κατάλληλων γενετικών ελέγχων, πριν από τη χορήγηση του εμβολίου, θα μπορούσε να συμβάλει στη ρύθμιση των χορηγούμενων δόσεων, ώστε αυτές να ανταποκρίνονται στις ιδιαίτερες ανάγκες του κάθε ατόμου. Για παράδειγμα, αν, με βάση τα αποτελέσματα της γενετικής ανάλυσης, κρίνεται ότι ορισμένα άτομα θα αποκριθούν ανεπαρκώς στον εμβολιασμό, θα μπορούσε να χορηγηθεί σε αυτά μια επιπλέον δόση του εμβολίου. Αντίθετα, άτομα για τα οποία εκτιμάται ότι θα αναπτύξουν υπερβολικής έντασης ανοσιακές απαντήσεις, θα μπορούσαν να λάβουν μικρότερο αριθμό δόσεων. Κάτι τέτοιο θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμο όχι μόνο από υγειονομική αλλά και από οικονομική άποψη (31).

Η ανάδειξη κρίσιμων γενετικών παραγόντων που τροποποιούν τις κυτταρικές και αντισωματικές απαντήσεις έναντι των εμβολίων θα μπορούσε να συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη ασφαλών και αποτελεσματικών εμβολίων, που θα παρέχουν προστασία σε όλα τα άτομα ενός εμβολιαζόμενου πληθυσμού, ανεξάρτητα από τις γενετικές διαφορές τους. Τέτοιου είδους προσεγγίσεις, που λαμβάνουν υπόψη τους το γενετικό υπόβαθρο των εμβολιαζόμενων ατόμων, αναμένεται να μειώσουν τη διστακτικότητα της κοινής γνώμης και να ενισχύσουν την εμπιστοσύνη της απέναντι στα εμβόλια αλλά και στο θεσμό του εμβολιασμού γενικότερα. Έτσι, η εφαρμογή εξατομικευμένων προγραμμάτων εμβολιασμού δεν αποκλείεται να οδηγήσει παράλληλα και σε μια αύξηση του ποσοστού των εμβολιαζόμενων ατόμων στη διεθνή κοινότητα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhao X, Ding Y, Du J, Fan Y. 2020 update on human coronaviruses : One health , one world. *Med Nov Technol Devices* [Internet]. 2020;8(April):100043. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2020.100043>
2. V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [Internet]. Vol. 19, *Nature Reviews Microbiology*. Springer US; 2021. p. 155–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
3. Lim Y, Ng Y, Tam J, Liu D. Human Coronaviruses: A Review of Virus–Host Interactions. *Diseases*. 2016;4(4):26.
4. Pormohammad A, Ghorbani S, Khatami A, Farzi R, Baradaran B, Turner DL, et al. Comparison of confirmed COVID-19 with SARS and MERS cases - Clinical characteristics, laboratory findings, radiographic signs and outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2020;30(4).
5. Azkur AK, Akdis M, Azkur D, Sokolowska M, van de Veen W, Brüggemann MC, et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2020;75(7):1564–81.
6. Pillaiyar T, Meenakshisundaram S, Manickam M. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug Discov Today* [Internet]. 2020;25(4):668–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.01.015>
7. Rahman S, Montero MTV, Rowe K, Kirton R, Kunik F. Epidemiology, pathogenesis, clinical presentations, diagnosis and treatment of COVID-19: a review of current evidence. *Expert Rev Clin Pharmacol* [Internet]. 2021;14(5):601–21. Available from: <https://doi.org/10.1080/17512433.2021.1902303>
8. Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2021;19(3):141–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
9. Tang D, Comish P, Kang R. The hallmarks of COVID-19 disease. *PLoS Pathog* [Internet]. 2020;16(5):1–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008536>
10. Li DD, Li QH. SARS-CoV-2: vaccines in the pandemic era. *Mil Med Res*. 2021;8(1):1–15.
11. Chung JY, Thone MN, Kwon YJ. COVID-19 vaccines: The status and perspectives in delivery points of view. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2021;170:1–25.

Available from: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.12.011>

12. Perico L, Benigni A, Casiraghi F, Ng LFP, Renia L, Remuzzi G. Immunity, endothelial injury and complement-induced coagulopathy in COVID-19. *Nat Rev Nephrol* [Internet]. 2021;17(1):46–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41581-020-00357-4>
13. Bordallo B, Bellas M, Cortez AF, Vieira M, Pinheiro M. Severe COVID-19: What have we learned with the immunopathogenesis? *Adv Rheumatol*. 2020;60(1).
14. Funk CD, Laferrière C, Ardakani A. A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID-19 Pandemic. *Front Pharmacol*. 2020;11(June):1–17.
15. Almehdi AM, Khoder G, Alchakee AS, Alsayyid AT, Sarg NH, Soliman SSM. SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies. *Infection* [Internet]. 2021;49(5):855–76. Available from: <https://doi.org/10.1007/s15010-021-01677-8>
16. Kaddoura M, Allbrahim M, Hijazi G, Soudani N, Audi A, Alkalamouni H, et al. COVID-19 Therapeutic Options Under Investigation. *Front Pharmacol*. 2020;11(August):1–24.
17. Frederiksen LSF, Zhang Y, Foged C, Thakur A. The Long Road Toward COVID-19 Herd Immunity: Vaccine Platform Technologies and Mass Immunization Strategies. *Front Immunol*. 2020;11(July):1–26.
18. Alturki SO, Alturki SO, Connors J, Cusimano G, Kutzler MA, Izmirly AM, et al. The 2020 Pandemic: Current SARS-CoV-2 Vaccine Development. *Front Immunol*. 2020;11(August):1–13.
19. Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021;21(8):475–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00578-z>
20. Teijaro JR, Farber DL. COVID-19 vaccines: modes of immune activation and future challenges. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021;21(4):195–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00526-x>
21. Kyriakidis NC, López-Cortés A, González EV, Grimaldos AB, Prado EO. SARS-CoV-2 vaccines strategies: a comprehensive review of phase 3 candidates. *npj Vaccines* [Internet]. 2021;6(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-021-00292-w>
22. Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, Flight KE, Higham SL, Lemm NM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol*. 2020;202(2):162–92.

23. Rappuoli R, Gregorio E De, Del G, Phogat S, Pecetta S. Vaccinology in the post – COVID-19 era. 2021;118(3):1–7.
24. Kashte S, Gulbake A, El-Amin SF, Gupta A. COVID-19 vaccines: rapid development, implications, challenges and future prospects. *Hum Cell* [Internet]. 2021;34(3):711–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13577-021-00512-4>
25. Nance KD, Meier JL. Modifications in an Emergency: The Role of N1-Methylpseudouridine in COVID-19 Vaccines. *ACS Cent Sci*. 2021;7(5):748–56.
26. Xu S, Yang K, Li R, Zhang L. Mrna vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospect. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(18):6582
27. Park JW, Lagniton PNP, Liu Y, Xu RH. Mrna vaccines for covid-19: What, why and how. *Int J Biol Sci*. 2021;17(6):1446–60.
28. Versteeg L, Almutairi MM, Hotez PJ, Pollet J. Enlisting the mRNA vaccine platform to combat parasitic infections. *Vaccines*. 2019;7(4):1–19.
29. Zimmermann P, Curtis N. Factors That Influence the Immune Response to Vaccination. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(2):1–50.
30. Kimman TG, Vandebriel RJ, Hoebee B. Genetic variation in the response to vaccination. *Community Genet*. 2007;10(4):201–17.
31. Omersel J, Kuželički NK. Vaccinomics and adversomics in the era of precision medicine: A review based on hbv, mmr, hpv, and covid-19 vaccines. *J Clin Med*. 2020;9(11):1–22.
32. Linnik JE, Egli A. Impact of host genetic polymorphisms on vaccine induced antibody response. *Hum Vaccines Immunother* [Internet]. 2016;12(4):907–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21645515.2015.1119345>
33. Poland GA, Ovsyannikova IG, Jacobson RM, Smith DI. Heterogeneity in vaccine immune response: The role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(6):653–64.
34. Poland GA, Kennedy RB, McKinney BA, Ovsyannikova IG, Lambert ND, Jacobson RM, et al. Vaccinomics, adversomics, and the immune response network theory: Individualized vaccinology in the 21st century. *Semin Immunol*. 2013;25(2):89–103.
35. Xu X xiao, Wan H, Nie L, Shao T, Xiang L xin, Shao J zhong. RIG-I: a multifunctional protein beyond a pattern recognition receptor. *Protein Cell*. 2018;9(3):246–53.
36. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2020;20(9):537–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0288-3>

37. Hu J, Nistal-Villán E, Voho A, Ganee A, Kumar M, Ding Y, et al. A Common Polymorphism in the Caspase Recruitment Domain of RIG-I Modifies the Innate Immune Response of Human Dendritic Cells. *J Immunol*. 2010;185(1):424–32.
38. Ovsyannikova IG, Haralambieva LH, Dhiman N, O’Byrne MM, Pankratz VS, Jacobson RM, et al. Polymorphisms in the vitamin A receptor and innate immunity genes influence the antibody response to rubella vaccination. *J Infect Dis*. 2010;201(2):207–13.
39. Chatzigeorgiou A, Lyberi M, Chatzilymperis G, Nezos A, Kamper E. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors*. 2009;35(6):474–83.
40. Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today*. 1992;13(11):431–3.
41. Clark EA. A short history of the B-cell-associated surface molecule CD40. *Front Immunol*. 2014;5(SEP):1–6.
42. Jiang C, Trudeau SJ, Cheong TC, Guo R, Teng M, Wang LW, et al. CRISPR/Cas9 Screens Reveal Multiple Layers of B cell CD40 Regulation. *Cell Rep [Internet]*. 2019;28(5):1307-1322.e8.
Available from: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.079>
43. Cassiano GC, Furini AAC, Capobianco MP, Storti-Melo LM, Cunha MG, Kano FS, et al. Polymorphisms in B cell co-stimulatory genes are associated with IgG antibody responses against blood-stage proteins of plasmodium vivax. *PLoS One*. 2016;11(2):1–15.
44. Qin J, Xing J, Liu R, Chen B, Chen Y, Zhuang X. Association between CD40 rs1883832 and immune-related diseases susceptibility: A meta-analysis. *Oncotarget*. 2017;8(60):102235–43.
45. Bettini E, Locci M. SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological mechanism and beyond. *Vaccines*. 2021;9(2):1–20.
46. Cerutti A. The regulation of IgA class switching. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(6):421–34.
47. Durandy A, Kracker S. Immunoglobulin class-switch recombination deficiencies. 2012;
48. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med*. 2021;13(577):1–14.
49. Wisniewski A V., Luna JC, Redlich CA. Human IgG and IgA responses to COVID-19 mRNA vaccines. *PLoS One [Internet]*. 2021;16(6 June):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0249499>