



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Θέμα: Μοριακή στόχευση πολυμορφισμών και βιοπληροφορική προσέγγιση του φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας στα T λεμφοκύτταρα για την μελέτη της ετερογένειας στην σοβαρότητα της COVID-19

Αχιλλέας-Παναγιώτης Γαλανόπουλος

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Σπελέτας Ματθαίος, Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας, Επιβλέπων
- Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας
- Μπόγδανος Δημήτριος, Καθηγητής Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στις Κλινικές Εφαρμογές Μοριακής Ιατρικής.

Λάρισα, Οκτώβριος, 2022



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Title: Molecular targeting of polymorphisms and bioinformatic approach of the T cell cross reactivity phenomenon in order to study the heterogeneity of COVID-19 severity

By
Achilleas-Panagiotis Galanopoulos

Three members of Examination Committee:

- Speletas Matthaios, Professor of Medical Immunology, Supervisor
- Petinaki Efthimia, Professor of Biopathology and Clinical Microbiology
- Bogdanos Dimitrios, Professor of Pathology and Autoimmune Diseases

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 Clinical Applications of Molecular Medicine.

Larissa, October, 2022

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
Ο νέος κορονοϊός SARS-CoV-2	8
Ο υποδοχέας ACE2	9
Το ένζυμο TMPRSS2.....	10
Τ λεμφοκύτταρα	11
Τ κυτταρικός υποδοχέας.....	12
Το φαινόμενο διασταυρούμενης- δραστικότητας	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	19
ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	21
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
Ομάδα μελέτης	21
Μελέτη χυμικής και κυτταρικής ανοσίας ενάντια στον SARS-CoV-2	22
Μοριακές τεχνικές.....	22
Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)	23
Καθαρισμός PCR προϊόντων (Purification)	24
Απομόνωση DNA από γέλη αгарόζης (Gel extraction)	25
Αλληλούχιση κατά Sanger	26
Συλλογή ανοσογενετικής πληροφορίας από βάσεις δεδομένων	26
MIRA dataset	26
McPAS, TCR3d και VDJdb	27
Εκπαίδευση μοντέλων μηχανικής μάθησης και αξιολόγηση σημαντικότητας των χαρακτηριστικών	29
Περιγραφική ανάλυση του MIRA dataset.....	32
Ανάλυση φαινομένου διασταυρούμενης δραστικότητας	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	39
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	39
Μοριακή Στόχευση περιοχών ενδιαφέροντος στα γονίδια <i>ACE2</i> και <i>TMPRSS2</i>	39
Αποτελέσματα προσέγγισης μηχανικής μάθησης	40
Αποτελέσματα περιγραφικής ανάλυσης κλωνοτύπων του MIRA dataset	41
Αποτελέσματα διερεύνησης τους φαινομένου διασταυρούμενης δραστικότητας των κλωνοτύπων του MIRA dataset.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	45
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	45
ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

«...τίποτα στη Βιολογία δεν έχει νόημα... παρά υπό το φως της Εξέλιξης ...»

Theodosius Dobzhansky



ΠΡΟΛΟΓΟΣ - ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της διπλωματικής μου εργασίας για την ολοκλήρωση των μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων και η διεξαγωγή τους έλαβαν χώρα υπό την συνεργασία των εργαστηρίων Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας και Υγιεινής και Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής, στην Λάρισα, υπό την καθοδήγηση και επίβλεψη των Καθηγητών Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας και Υγιεινής και Επιδημιολογίας κκ Σπελέτα Ματθαίου και Χατζηχριστοδούλου Χρήστου, στους οποίους οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ για την συνεχή και αμέριστη στήριξη, όπως και για όλα όσα μου έχουν μάθει.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κα Πετεινάκη Ευθυμία, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιοπαθολογίας - Κλινικής Μικροβιολογίας και τον κο Μπόγδανο Δημήτριο, Καθηγητή Παθολογίας και Αυτοάνοσων Νοσημάτων για την συμμετοχή τους στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της διπλωματικής μου εργασίας.

Ιδιαίτερη ευγνωμοσύνη οφείλω επίσης, στον Μεταδιδακτορικό Ερευνητή κο Γεωργακίλα Γιώργο για την διεκπεραίωση της προσέγγισης μηχανικής μάθησης, την εκπαίδευσή μου στην βιοπληροφορική, τις καθοριστικής σημασίας συμβουλές του και την ουσιαστική συνεργασία καθώς και στον Ιατρό κο Τσινάρη Ζαφειρή για την επίβλεψη και την άριστη συνεργασία μας.

Θερμές ευχαριστίες οφείλω στην κα Καλαλά Φανή Επίκουρο Καθηγήτρια Ιατρικής Ανοσολογίας, στην υποψήφια Διδάκτορα κα Ραφτοπούλου Σοφία και στην Τεχνολόγο Ιατρικών εργαστηρίων κα Φουσίκα Νάνσυ για το θερμό καλωσόρισμα και την ουσιαστική εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω για την συνεργασία μας από το Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας την Διδάκτορα κα Σάρρου Στυλιανή, την κα Περιστέρη Νάνσυ, την κα Παλιάτσα Βάλια, τον κο Μπακαρό Ευάγγελο και την κα Ασβεστοπούλου Ελίνα, και και από το Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Υγιεινής και Επιδημιολογίας κα Μουχτούρη Βαρβάρα, την Διδάκτορα κα Κυρίτση Μαρία, την υποψήφια Διδάκτορα κα Μπογογιαννίδου Ζαχαρούλα και την υπόψηφια Διδάκτορα κα Βουλγαρίδη Ιωάννα.

Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Θανάση και Ζαφειρή, που με την αμέριστη στήριξη, την εμπιστοσύνη και την υπομονή τους συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση των στόχων μου αλλά και για το σημαντικότερο, το οποίο δεν διδάσκεται στα θρανία αλλά γαλουχείται... το να με κάνουν **ΑΝΘΡΩΠΟ**.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η λοίμωξη COVID-19 χαρακτηρίζεται από μεγάλο εύρος κλινικής ετερογένειας, από οξεία, έως ήπια και ασυμπτωματική νόσο. Ερευνητικό ενδιαφέρον εμφανίζουν άτομα που ενώ ήρθαν σε επαφή με νοσούντες χωρίς προφυλακτικά μέσα, δεν μολύνθηκαν από τον SARS-CoV-2, ούτε σε επίπεδο ασυμπτωματικής νόσου. Στην παρούσα μελέτη περιγράφονται και διερευνώνται τέσσερα τέτοια "άτρωτα" άτομα, στοχεύοντας περιοχές των γονιδίων *ACE2* και *TMPRSS2*, που εμφανίζουν κομβικό ρόλο για την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή. Παρόλο που σε δύο άτομα ανιχνεύθηκε ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs12329760 στο εξόνιο 6 του γονιδίου *TMPRSS2* σε ομοζυγωτία και ετεροζυγωτία αντίστοιχα, δεν ανιχνεύθηκαν γενετικές βλάβες. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει μετατοπιστεί προς τη συσχέτιση του ανοσολογικού ρεπερτορίου των T λεμφοκυττάρων με την εξέλιξη και σοβαρότητα της COVID-19, με τη χρήση τεχνολογιών αλληλούχισης των T κυτταρικών υποδοχέων (TCR-Seq). Η βάση δεδομένων Multiplexed Identification of T cell Receptor Antigen (MIRA), που αποτελεί υποσύνολο της μελέτης immunoACCESS[©], παρέχει χιλιάδες TCRs που μπορούν να αναγνωρίσουν ειδικά επιτόπους του SARS-CoV-2. Οι κλωνότυποι της βάσης MIRA στοχεύθηκαν μέσω περιγραφικής ανάλυσης και μιας νέας προσέγγισης μηχανικής μάθησης για την ανάλυση δεδομένων TCR-Seq, με δυνατότητα εύρεσης αντιγόνων που αφορούν διάκριση μεταξύ ατόμων που νόσησαν από COVID-19 και υγιών ατόμων βάσει διαφορών στην ανοσιακή απάντηση. Ορισμένα αντιγόνα εμφάνισαν κοινά επίπεδα αναγνώρισης από κλωνοτύπους του MIRA, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ύπαρξης πιθανής διασταυρούμενης δραστηριότητας μεταξύ του SARS-CoV-2 και άλλων λοιμωδών παραγόντων, υπόθεση που ελέγχθηκε μέσω σύγκρισης των συγκεκριμένων TCR με δεδομένα από άλλες δημόσιες βάσεις. Τα αποτελέσματα παρέχουν πληροφορία σχετικά με διασταυρούμενη δραστηριότητα μεταξύ του SARS-CoV-2 και άλλων παθογόνων (ή νόσων) όπως το μυκοβακτήριο της φυματίωσης και ο ιός της γρίπης. Έτσι, προκύπτουν ενδείξεις για τον προστατευτικό ρόλο κλωνοτύπων διασταυρούμενης δραστηριότητας στην COVID-19 διαμορφώνοντας το επόμενο βήμα που αφορά την διερεύνηση ανίχνευσής τους στο ρεπερτόριο των «ατρώτων» ατόμων της παρούσας μελέτης.

ABSTRACT

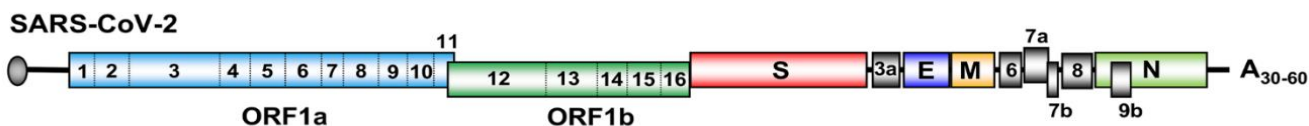
Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is characterized by wide clinical variability, from acute illness to mild and even asymptomatic disease. A more interesting phenomenon concerns the presence of individuals who came into close contact with COVID-19 patients without prophylaxis but were never infected, even as an asymptomatic disease. In this study four such “invulnerable” individuals are described and explored for carrying genetic defects in hot-spot regions of *ACE2* and *TMPRSS2* genes, which are responsible for virus entry into the host cells. Although two individuals carried the functional polymorphism rs12329760 into exon 6 of *TMPRSS2* gene in homozygous and heterozygous state, respectively, no pathogenic defects were detected in this cohort. Furthermore, it’s worth noting that the scientific community’s focus has recently shifted towards the association of the T cell immunological repertoire with COVID-19 progression and severity, by utilising T cell receptor sequencing (TCR-Seq) assays. The Multiplexed Identification of T cell Receptor Antigen (MIRA) dataset, which is a subset of the immunoACCESS[®] study, provides thousands of TCRs that can specifically recognize SARS-CoV-2 epitopes. Clonotypes of MIRA dataset were processed through exploratory analysis and a novel Machine Learning assisted approach for analysing TCR-Seq data, with the ability to unveil key antigens that can accurately distinguish between convalescent and healthy individuals based on differences in the triggered immune response. Some antigens were found to exhibit equal levels of clonotype recognition in both cohorts leading to the assumption of putative cross-reactivity between SARS-CoV-2 and other infectious agents. This hypothesis was tested by comparing MIRA TCRs with data from other public repositories. The results provide evidence regarding cross reactivity between SARS-CoV-2 and other pathogens (or diseases) like *M. tuberculosis* and Influenza virus. Such evidence of cross-reactive clonotypes’ protective role in COVID-19, leads to the next step which is the investigation of their detection in “invulnerable” individuals’ repertoire.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο νέος κορονοϊός SARS-CoV-2

Ο SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus) είναι ένας RNA beta κορονοϊός με φυλογενετικές ομοιότητες με τον SARS-CoV και τον MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome coronavirus)(1). Είναι υπεύθυνος για την λοίμωξη Coronavirus disease 2019 (COVID-19) και έχει γονιδίωμα 29,9 kb. Στο γονιδίωμά του παρατηρούνται οι περιοχές ORF1a και ORF1b που αφορούν έκφραση των μη δομικών πρωτεϊνών (non structural proteins, nsp1-16) όπως φαίνεται στην Εικόνα 1(2).



Εικόνα 1: Το γονιδίωμα του SARS-CoV-2 (Πηγή Ayslan et al. 2021, SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication)

Πρόκειται για 2 διαφορετικά αναγνωστικά πλαίσια όπου μπορεί είτε να πραγματοποιηθεί μετάφραση σε ένα εκ των δύο είτε να συνδυαστούν σε ένα αναγνωστικό πλαίσιο το ORF1ab που αφορά και τις 2 περιοχές. Επιπρόσθετα, το θετικής πολικότητας γονιδίωμα του SARS-CoV-2 κωδικοποιεί την παραγωγή 6 βοηθητικών πρωτεϊνών και άλλων δομικών πρωτεϊνών που παρατηρούνται και σε άλλους κορονοϊούς όπως την Spike (S), τις πρωτεΐνες της μεμβράνης, του φακέλου και του νουκλεοκαπιδίου(3). Πιο συγκεκριμένα, η S αποτελείται από τις υπομονάδες S1 και S2 που εξυπηρετούν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή(3). Η S1 είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και σύνδεση με τους υποδοχείς του ξενιστή, ενώ η S2 εμπλέκεται στην στη σύντηξη κυτταρικής-ικής μεμβράνης και την ενδοκυττάρωση του ιού(3). Για την είσοδο του SARS-CoV-2 στο κύτταρο-ξενιστή απαιτείται σύνδεση της S1 με τον υποδοχέα ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) μέσα από την ειδική υπομονάδα του RBD (Receptor Binding Domain)(3). Επιπρόσθετα, το ένζυμο TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2) τέμνει την S πρωτεΐνη, γεγονός απαραίτητο για την επιτυχή ενδοκυττάρωση του ιού(3,4). Η επιτυχής τομή και σύνδεση της S πρωτεΐνης του ιού από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες του ξενιστή οδηγεί σε αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση της ικής και της κυτταρικής μεμβράνης με τελικό αποτέλεσμα την δημιουργία ενός υβριδικού πόρου μέσω του οποίου το γονιδίωμα του ιού δύναται να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή(5).

Μετά την είσοδό του το ιικό RNA λειτουργεί άμεσα σαν mRNA και πραγματοποιείται μετάφραση 2 πολυπρωτεϊνών από τις περιοχές ORF1a και ORF1b (ή μετάφραση της ORF1ab συνολικά) όπου

ακολουθεί τομή από πρωτεάσες προωθώντας την παραγωγή μη δομικών πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αντιγραφή και μεταγραφή του ιικού γονιδιώματος.

Η λοίμωξη COVID-19 χαρακτηρίζεται από μεγάλη ετερογένεια σε ένα ευρύ κλινικό φάσμα από ασυμπτωματική νόσο έως και οξεία όπου απαιτείται νοσηλεία(6,7). Η ασυμπτωματική λοίμωξη δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και αφορά περιπτώσεις όπου πολλές φορές η νόσος δεν γίνεται καν αντιληπτή. Σε αυτό το πλαίσιο μελέτες υποστηρίζουν ότι μπορεί η αποτελεσματικότητα της φυσικής ανοσίας να αντιμετωπίζει εξολοκλήρου τον ιό χωρίς να προκύπτουν «ίχνη» της προσαρμοστικής ανοσίας(7). Μια άλλη θεωρία εστιάζει στον υποδοχέα ACE2 και γενετικές βλάβες ή πολυμορφισμούς του που ενδέχεται να μπορούν να επηρεάσουν την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή(8). Μία άλλη μελέτη προτείνει ότι σε ορισμένες περιπτώσεις επαφής με τον SARS-CoV-2 η λοίμωξη μπορεί να αντιμετωπιστεί τόσο γρήγορα όπου τα συγκεκριμένα άτομα δεν εμφανίζουν ποτέ θετικό έλεγχο ούτε και παράγουν αντισώματα ώστε να είναι δυνατό να ανιχνευθούν στο περιφερειακό αίμα υποδηλώνοντας επαφή με τον ιό (9). Γίνεται λόγος για T λεμφοκύτταρα μνήμης τα οποία μπορεί να έχουν προκύψει από την ανοσιακή απάντηση σε άλλα παθογόνα όπως άλλοι κορονοϊοί που προκαλούν κοινό κρυολόγημα τα οποία πιθανά είναι σε θέση να αντιμετωπίσουν γρήγορα και αποτελεσματικά τον SARS-CoV-2.

Από την αρχική εμφάνισή της COVID-19 στην Wuhan της Κίνας έως και σήμερα έχουν καταγραφεί περίπου 619 εκατομμύρια επιβεβαιωμένα κρούσματα σύμφωνα με το Johns Hopkins Coronavirus Resource Centre (ενημέρωση 05/10/2022)(10). Τα 2 τελευταία χρόνια η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα καθώς και η βιομηχανία στον ευρύτερο χώρο της βιο-ιατρικής και φαρμακευτικής έχουν εστιάσει στην έρευνα προγνωστικών παραγόντων και θεραπευτικών προσεγγίσεων όπως και στην ανάπτυξη και σχεδιασμό διαφορετικών εμβολίων για την καταπολέμηση της πανδημίας που έχει προκύψει από την COVID-19.

Ο υποδοχέας ACE2

Το ένζυμο ACE2 είναι μια καρβοξυ-πεπτιδάση και αρνητικός ρυθμιστής του συστήματος ρενίνης-αγγειοτενσίνης (RAS, renin angiotensin system) παίζοντας σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση του όγκου του αίματος και της συστηματικής αρτηριακής πίεσης(11). Εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στο λεπτό έντερο, στους όρχεις, τα νεφρά, την καρδιά, τον θυροειδή και τον λιπώδη ιστό, ενώ μέσα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στους πνεύμονες όπου θετική ή αρνητική ρύθμιση λαμβάνουν χώρα ανάλογα με τα την σηματοδότηση που διαμορφώνεται από το ανοσιακό σύστημα(12). Υπάρχουν δύο σχετικές μορφές του ενζύμου ACE2, η διαλυτή (sACE2, soluble ACE2) που παρατηρείται στην κυκλοφορία του αίματος και η μεμβρανική (mACE2, membrane ACE2) που παίζει τον ρόλο υποδοχέα(13,14).

Η μεμβρανική μορφή χωροθετείται στην επιφάνεια των κυττάρων και αποτελείται από μια εξωκυτταρική N-τελική υπομονάδα, μια C-τελική υπομονάδα και μια συντηρημένη υπομονάδα πρόσδεσης (zinc binding domain)(14). Πρόκειται για τον υποδοχέα σύνδεσης με την S πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 και η αλληλεπίδραση με την S1 υπομονάδα είναι καθοριστικής σημασίας για την ενδοκυττάρωση του ιού(14). Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο ACE2 βρίσκεται στο X χρωμόσωμα και αποτελείται από 18 εξόνια(15). Διαφορετικές γενετικές θέσεις του έχουν μελετηθεί για την σημασία τους ως προς τον κύκλο ζωής του ιού. Πιο συγκεκριμένα, η λυσίνη 31 της πρωτεΐνης που διαμορφώνεται (εξόνιο 1) εμπλέκεται στην σύνδεση με της S και τα κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης στις θέσεις από 697 έως 716 είναι σημαντικά για την αλληλεπίδραση του μορίου με το ένζυμο TMPRSS2(16,17).

Το ένζυμο TMPRSS2

Το ένζυμο TMPRSS2 είναι μια πρωτεάση σερίνης που βρίσκεται αγκυροβολημένη στην κυτταρική μεμβράνη. Οι πρωτεολυτικές ιδιότητές της σχετίζονται με την έναρξη του ιικού κύκλου καθώς ενεργοποιεί την S γλυκοπρωτεΐνη των κορονοϊών (HCoV-229E, HCoV-EMC), την πρωτεΐνη σύντηξης στον ιό Sendai, στον μεταπνευμοϊό, στον ιό parainfluenza και την πρωτεΐνη αιμογλουτινίνη του ιού της Influenza(18–21).

Εκφράζεται σε υψηλό βαθμό στον προστάτη, στην ουροδόχο κύστη, στα νεφρά και τους ιστούς της αναπνευστικής οδού(22). Στους πνεύμονες η έκφραση χαρακτηρίζεται από τον τροπισμό του ιού και την παθογένεια της λοίμωξης. Η έκφρασή του φαίνεται να είναι πιο υψηλή σε πνευμονικά κύτταρα που εκφράζουν ACE2 και φαίνεται να παίζει κομβικό ρόλο για τον πολλαπλασιασμό των κορονοϊών(23)(24). Το ένζυμο TMPRSS2 επηρεάζει την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή με δύο τρόπους : προκαλεί τομή στον υποδοχέα ACE2 και στην S πρωτεΐνη ευνοώντας την σύνδεση S – ACE2 και την ενδοκυττάρωση του ιού(25)(26). Το γονίδιο *TMPRSS2* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 21 και αποτελείται από 14 εξόνια(27).

Στο εξόνιο 6 βρίσκεται ο πολυμορφισμός rs12329760 (c.478G>A). Πρόκειται για μια κοινή παρανοηματική μεταλλαγή που οδηγεί σε αντικατάσταση της βαλίνης 160 από μεθειονίνη (Val160Met) και η οποία έχει χαρακτηριστεί ως επιβλαβής (deleterious) για το πρωτεϊνικό μόριο από βιοπληροφορική προσέγγιση(3). Πιο συγκεκριμένα, διαμορφώνεται μεγαλύτερη πρωτεΐνη τσέπης (pocket protein) με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η στερεοδιαμόρφωση του μορίου και βάσει άλλης μιας υπολογιστικής μελέτης υπάρχει πιθανότητα αναστολής της ενζυμικής λειτουργίας(28).

T λεμφοκύτταρα

Τα T λεμφοκύτταρα είναι μία από τις τρεις κατηγορίες λεμφοκυττάρων και αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της προσαρμοστικής ανοσίας(29). Η παραγωγή και ωρίμανσή τους συμβαίνει στον θύμο αδένα. Χαρακτηρίζονται από τον επιφανειακό δείκτη CD3 που εμπλέκεται στην μεταγωγή σήματος ενδοκυτταρικά. Σχετίζονται με την κυτταρική ανοσία και επιτηρούν λεμφικούς και περιφερικούς ιστούς στοχεύοντας αντιγόνα(29).

Στην επιφάνεια των T λεμφοκυττάρων εκφράζεται ένα αντιγονο-δεσμευτικό μόριο που ονομάζεται T κυτταρικός υποδοχέας (T cell receptor, TCR)(30). Ο TCR δεν δύναται να αλληλεπιδρά με ελεύθερα αντιγόνα αλλά είναι ικανός να αναγνωρίζει πεπτίδια τα οποία εναποτίθενται σε μεμβρανικές πρωτεΐνες που ονομάζονται μόρια του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC). Η συγκεκριμένη ιδιότητα ονομάζεται εαυτός-MHC περιορισμός (self-MHC restriction)(31). Πρόκειται για πολυμορφικά μόρια γλυκοπρωτεϊνικής φύσης που συμμετέχουν στην διαδικασία της αντιγονοπαρουσίασης, η οποία αφορά την αναγνώριση και παρουσίαση του αντιγόνου στις κυτταρικές μεμβράνες κυττάρων που ονομάζονται αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (antigen presenting cells, APC)(32). Χωρίζονται σε δύο βασικούς τύπους μορίων τα MHC τάξης I (MHC-I) και τα MHC τάξης II (MHC-II). Πιο συγκεκριμένα τα MHC-I παρίστανται σχεδόν σε όλα τα εμπύρηνα κύτταρα, ενώ τα MHC-II ανιχνεύονται στην επιφάνεια των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων (δενδριτικά κύτταρα, μακροφάγα, B λεμφοκύτταρα). Η αναγνώριση ενός συμπλέγματος αντιγόνου-μορίου MHC από τον TCR συνεπάγεται την έναρξη σειράς βιοχημικών διεργασιών ενδοκυτταρικά, που οδηγεί στην παύση της φάσης ηρεμίας στην οποία βρίσκονται μέχρι πρότινος τα κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται οδηγώντας στην παραγωγή ειδικών δραστικών T λεμφοκυττάρων καθώς και T λεμφοκυττάρων μνήμης(29).

Δύο βασικοί υποπληθυσμοί T λεμφοκυττάρων είναι τα βοηθητικά (T helper cells) και τα κυτταροτοξικά (T cytotoxic cells) T λεμφοκύτταρα(29). Διαφέρουν ως προς την ύπαρξη μεμβρανικών γλυκο-πρωτεϊνών στην επιφάνειά τους. Πιο συγκεκριμένα, κύτταρα του πληθυσμού που αφορά έκφραση του δείκτη CD4 (CD4⁺ T λεμφοκύτταρα) δρουν σαν βοηθητικά T λεμφοκύτταρα, ενώ κύτταρα του πληθυσμού που αφορά έκφραση του δείκτη CD8 (CD8⁺ T λεμφοκύτταρα) δρουν σαν κυτταροτοξικά T λεμφοκύτταρα. Επιπρόσθετα, τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια κυττάρων όταν αυτά είναι συνδεδεμένα με MHC-II μόρια, ενώ τα CD8⁺ T λεμφοκύτταρα αναγνωρίζουν αντιγόνα στην επιφάνεια κυττάρων όταν αυτά είναι συνδεδεμένα με MHC-I μόρια. Ο λόγος των προαναφερόμενων υποπληθυσμών T λεμφοκυττάρων στο περιφερειακό αίμα είναι CD4⁺/CD8⁺ = 2:1 υπό φυσιολογικές συνθήκες και μπορεί να αλλάζει κάτω από παθολογικές καταστάσεις.

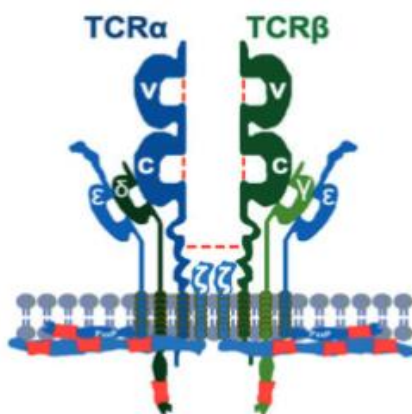
Μετά την αλληλεπίδραση με το αντιγόνο τα βοηθητικά CD4⁺ T λεμφοκύτταρα διαφοροποιούνται και προωθούν την ανοσιακή απάντηση εκκρίνοντας κυτταροκίνες, υποβοηθώντας την ενεργοποίηση B λεμφοκυττάρων, κυτταροτοξικών T λεμφοκυττάρων, μακροφάγων και άλλων κυττάρων του ανοσιακού συστήματος(33). Από την άλλη πλευρά τα κυτταροτοξικά CD8⁺ T λεμφοκύτταρα είναι υπεύθυνα για τις ανοσιακές απαντήσεις έναντι νεοπλασματικών κυτάρων, κυττάρων μολυσμένων από ιούς και κυττάρων που προέρχονται από ξένο μόσχευμα. Κάποιοι υποπληθυσμοί CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκυττάρων διαφοροποιούνται σε κύτταρα μνήμης διαμορφώνοντας γρήγορη και αποτελεσματική απάντηση σε μελλοντική έκθεση από το ίδιο αντιγόνο(34).

T κυτταρικός υποδοχέας

Η αναγνώριση αντιγόνου αποτελεί βασική λειτουργία των T λεμφοκυττάρων και επιτελείται από τον T κυτταρικό υποδοχέα (T cell receptor, TCR)(30). Πρόκειται για ένα ετερο-διμερές μεμβρανικό σύμπλοκο που αποτελείται από α και β ή γ και δ (σπάνια) αλυσύς. Πιο συγκεκριμένα, οι TCR που απαρτίζονται από α και β αλυσύς αποτελούν βασικό κομμάτι της προσαρμοστικής ανοσίας και σχετίζονται με υψηλά επίπεδα ειδικότητας. Αντιθέτως, οι TCR που απαρτίζονται από γ και δ αλυσύς εμφανίζουν διαφορετική δομική οργάνωση αναγνωρίζουν συγκεκριμένες ομάδες αντιγόνων σε συγκεκριμένες ομάδες παθογόνων χωρίς ανάγκη ύπαρξης μορίου MHC και διατελούν μηχανισμό δράσης που ομοιάζει με εκείνον την έμφυτης ανοσίας. Ο TCR συνδέεται στην κυτταρική μεμβράνη μέσω του δείκτη CD3 που σχετίζεται με την μεταγωγή σήματος ενδοκυττάρια(29).

Δομικά χαρακτηριστικά

Οι αλυσύς α, β, γ και δ χαρακτηρίζονται ως μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών λόγω υψηλής δομικής ομοιότητας με τα αντίστοιχα μόρια των B κυτταρικών υποδοχέων (ανοσοσφαιρίνες)(29). Σε ένα μόριο TCR κάθε αλυσύς που συμμετέχει διαχωρίζεται σε επικράτειες με διαφορετική λειτουργική υπόσταση (Εικόνα 2).

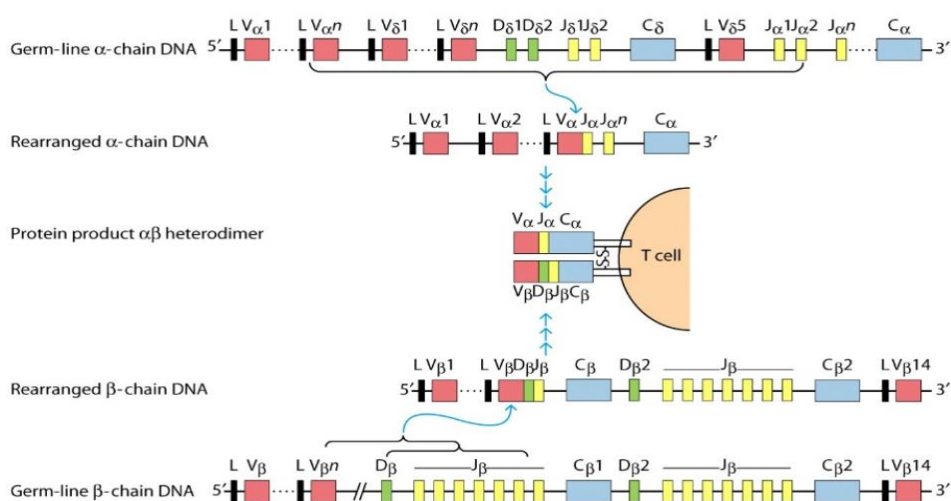


Εικόνα 2:Δομικό πρότυπο του T κυτταρικού υποδοχέα T cell receptor, TCR (Πηγή Mariuzza et al.2022, *The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma*)

Η Ν-τελική επικράτεια και στις δύο αλυσουσ αφορά υψηλή ποικιλομορφία ως προς την αλληλουχία της, σχετίζεται με την αντιγονική αναγνώριση και ονομάζεται μεταβλητή περιοχή (variable, V)(35). Η C-τελική επικράτεια εμφανίζει υψηλή συντηρητικότητα και ονομάζεται σταθερή περιοχή (constant, C). Οι δύο επικράτειες συνδέονται με μια αλληλουχία σύνδεσης η οποία διαμορφώνεται από ένα δισουλφιδικό δεσμό ανάμεσα σε δύο κατάλοιπα κυστεΐνης (ένα σε κάθε επικράτεια). Επιπρόσθετα, οι δύο επικράτειες φέρουν δια-μεμβρανικό τμήμα πλούσιο σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα που αλληλεπιδρούν με το σύμπλεγμα CD3 εξυπηρετώντας την ροή της μεταγωγής σήματος στο ενδοκυτταρικό κομμάτι του κυττάρου. Γενικά στο περιφερικό αίμα το 90-99% των T λεμφοκυττάρων σχηματίζουν TCR από ετερο-διμερή α και β αλυσών, ενώ 1-10% των λεμφοκυττάρων σχηματίζουν TCR από ετερο-διμερή γ και δ αλυσών(29).

Γενετική οργάνωση γονιδίων των TCR

Η οργάνωση και αναδιάταξη των γονιδίων του TCR διαμορφώνει υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας και σχετίζεται άμεσα με την αντιγονική ειδικότητα(36). Ο μηχανισμός αναδιάταξης των γονιδίων του TCR από την βλαστική σειρά (germline) ώστε να δημιουργηθούν λειτουργικά γονίδια εμφανίζει σε σημαντικό ομοιότητα με τον μηχανισμό που λαμβάνει χώρα στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών(29). Έτσι λοιπόν, στον άνθρωπο οι γενετικοί τόποι των γονιδίων των TCR οργανώνονται σε ομάδες γονιδίων που βρίσκονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Για τον σχηματισμό ενός λειτουργικού γονιδίου TCR απαιτείται ένα γονίδιο από κάθε ομάδα. Οι διαφορετικές ομάδες γονιδίων που μπορούν να οδηγήσουν στην σύνθεση ενός μορίου TCR είναι η ομάδα των V (variable) γονιδίων, η ομάδα των D (diversity) και η ομάδα J (junctional) για την μεταβλητή περιοχή μίας αλυσού και η ομάδα C (constant) για την δημιουργία της σταθερής περιοχής (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αναδιάταξη των V(D)J γονιδίων του TCR (Πηγή: Cinelli 2018, Analysis of murine CDR3β repertoires using machine learning techniques)

Ακόμη σε όλους τους γενετικούς τόπους των γονιδίων των TCR παρατηρούνται περιοχές με ρυθμιστικές αλληλουχίες, οι περιοχές L (leader) οι οποίες χωροθετούνται ανοδικά των γονιδίων V και σχετίζονται με μετακίνηση μεταγράφων και την αποτελεσματική διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης(29).

Η αλυσος α προκύπτει από ένα V (TRAV), ένα J (TRAJ) και ένα C (TRAC) γονίδιο. Ο γενετικός τόπος της α αλυσου εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14 και περιλαμβάνει μια περιοχή 1000 kb. Περιέχει 54 TRAV γονίδια τα οποία χωρίζονται σε 41 υποομάδες (οικογένειες), 61 TRAJ γονίδια και ένα μοναδικό TRAC γονίδιο(37). Το πιθανό ρεπερτόριο της α αλυσου περιλαμβάνει 45 με 47 λειτουργικά TRAV γονίδια (οργανωμένα σε 33 με 35 οικογένειες), 50 λειτουργικά TRAJ γονίδια και ένα μοναδικό TRAC γονίδιο(37).

Η αλυσος β αφορά την αναδιάταξη ενός V (TRBV), ενός D (TRBD), ενός J (TRBJ) και ενός C (TRBC) γονιδίου(37). Ο γενετικός τόπος της β αλυσου εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 7 και αφορά περιοχή 620 kb. Περιέχει 64 με 67 TRBV γονίδια τα οποία οργανώνονται σε 32 υποομάδες (οικογένειες), 2 TRBD γονίδια, 14 TRBJ γονίδια και 2 TRBC γονίδια. Το πιθανό ρεπερτόριο της β αλυσου περιλαμβάνει 40 με 48 λειτουργικά TRBV γονίδια (που ανήκουν σε 21 με 23 οικογένειες γονιδίων), τα 2 TRBD γονίδια, 13 TRBJ γονίδια και τα 2 TRBC γονίδια(37).

Αναδιάταξη γονιδίων των TCR

Στο γενετικό υλικό των TCR υπάρχουν συντηρημένες αλληλουχίες ανασυνδυασμού RSS (Recombination Signal Sequences)(36). Παρίστανται στο 3' άκρο των γονιδίων V, στα 5' και 3' άκρα των γονιδίων D καθώς και στο 5' άκρο των γονιδίων J. Δομικά πρόκειται για 2 παλίνδρομα νουκλεοτιδικά τμήματα ένα επταμερές και ένα εννεαμερές που ενδιάμεσα του βρίσκεται μια εμβόλιμη αλληλουχία. Η συγκεκριμένη αλληλουχία μπορεί να αποτελείται από 12 ή από 23 νουκλεοτίδια τα οποία μπορούν να σχηματίζουν 1 και 2 στροφές της έλικας του DNA αντίστοιχα. Ο μηχανισμός της αναδιάταξης πραγματοποιείται μόνο ανάμεσα σε γονίδια που φέρουν την αλληλουχία RSS και ακολουθείται ο κανόνας της στροφής όπου 2 γονίδια μπορούν να αναδιαταχθούν μόνο όταν το ένα εκ των δύο αφορά RSS με εμβόλιμη αλληλουχία 12 νουκλεοτιδίων (1 στροφή) και το άλλο RSS με εμβόλιμη αλληλουχία 23 νουκλεοτιδίων (2 στροφές). Έτσι εμποδίζεται ο ανασυνδυασμός γονιδίων από την ίδια ομάδα.

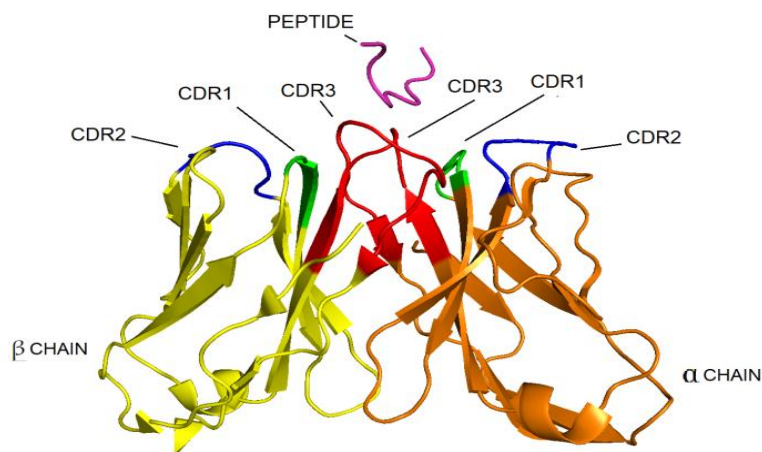
Στο αναπτυξιακό στάδιο των προ-T λεμφοκυττάρων στον θύμο εκφράζονται οι ανασυνδυασμάσες RAG-1 και RAG-2 (recombination activating genes) που δύναται να αναγνωρίζουν τις προαναφερόμενες επταμερείς και εννεαμερείς αλληλουχίες καταλύοντας ενζυμικά την σύνδεση των γονιδίων στα πλαίσια της αναδιάταξης(38). Οι αλληλουχίες RSS αναγνωρίζονται από τις προαναφερόμενες ανασυνδυασμάσες οι οποίες προσδένονται σε αυτές φέροντας σε επαφή τις RSS

διαμορφώνοντας έτσι δομή φουρκέτας. Στη συνέχεια ενζυμικά πραγματοποιείται αποκοπή της μιας αλυσίδας DNA στα συγκεκριμένα σημεία των RSS. Έτσι μια ελεύθερη ομάδα 3'-OH που έχει προκύψει διασπά τον φωσφοδιεστερικό δεσμό που βρίσκεται στην αντιπαράλληλη αλυσίδα υποστηριζόμενη από την ενεργότητα ανασυνδυασμάσης. Με αυτό τον τρόπο δημιουργείται θραύσμα στην διπλή έλικα και δημιουργείται φουρκέτα η οποία έπειτα τέμνεται σε τυχαίο σημείο από την δράση ενδονουκλεάσης. Έτσι προκύπτουν παλίνδρομα (palindromic, P) νουκλεοτίδια. Κατά την τομή από την ενδονουκλεάση προστίθενται επιπλέον παλίνδρομα νουκλεοτίδια στην συγκεκριμένη περιοχή (P-region nucleotide addition). Στα σημεία της τομής μπορεί ακόμη να πραγματοποιηθεί προσθήκη τυχαίων (non-template, N) νουκλεοτιδίων δράση που καταλύεται από το ένζυμο τελική δεοξυνουκλεοτιδική τρανσφεράση (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)(39).

Ποικιλομορφία στον TCR

Τα μόρια των TCR εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας. Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της αναδιάταξης των γονιδίων TCR τόσο ως προς το πλαίσιο του συνδυασμού διαφορετικών γονιδίων όσο και ως προς την προσθήκη τυχαίων νουκλεοτιδίων στα σημεία σύνδεσης όπως και το γεγονός σύνδεσης μιας α με μια β αλυσίδα διαμορφώνουν ρεπερτόριο που θεωρητικά αφορά $2 * 10^{19}$ μοναδικούς TCR(40).

Η μεταβλητή περιοχή του TCR αποτελεί κομμάτι του υποδοχέα που είναι υπεύθυνο για την αναγνώριση του συμπλόκου MHC-αντιγόνο(41). Δομικές μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων X έχουν ανιχνεύσει 6 συγκεκριμένες περιοχές του TCR που αλληλεπιδρούν άμεσα με το σύμπλοκο MHC-αντιγόνο(42). Πρόκειται για μη συντηρημένες αλληλουχίες που διαμορφώνουν λούπες και εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ποικιλομορφίας οι οποίες ονομάζονται CDR (complementarity determining regions)(41,42). Στην αλυσίδα κάθε TCR υπάρχουν 3 CDR αλληλουχίες, οι CDR1, CDR2 και CDR3 και κάθε μία διαμορφώνει λούπα με διαφορετικό ρόλο ως προς την αλληλεπίδραση με το σύμπλοκο MHC-αντιγόνο επομένως 6 CDR αλληλουχίες (μία ανά αλυσίδα) συνολικά αντιστοιχούν σε ένα TCR (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Επισήμανση CDR αλληλουχιών στην μεταβλητή περιοχή του TCR και αλληλεπίδραση με πεπτίδιο (Πηγή: <http://opig.stats.ox.ac.uk/webapps/stcrdab/CDR?pdb=4MNQ>)

Οι CDR1 και CDR2 αφορούν την περιοχή του V γονιδίου είναι πολύ άκαμπτες και σχετίζονται με χαμηλά ή καθόλου επίπεδα ανασυνδυασμού ως προς την αντιγονική αναγνώριση(43). Η CDR3 από την άλλη πλευρά δημιουργεί λούπα υψηλής ευελιξίας με αποτέλεσμα να μπορεί να εμφανίζεται σε διαφορετικά πρότυπα στερεοδιαμόρφωσης κατά την σύνδεση με το σύμπλοκο MHC-πεπτίδιο. Επιπρόσθετα, η CDR3 περιοχή αφορά αναδιάταξη στην οποία συμπεριλαμβάνονται και άλλα γονίδια εκτός του V γονιδίου. Οι δύο CDR3 αλληλουχίες βρίσκονται στο κέντρο της κορυφής του μορίου του TCR και οι δύο βρόχοι σχηματίζουν έναν θύλακα όπου το αντιγόνο μπορεί να κατανεμηθεί και να αλληλοεπιδράσει άμεσα με τον TCR(44–46). Συγκεκριμένα η CDR3 αφορά έκταση που σχετίζεται με V και J γονίδια στην περίπτωση της α αλυσίδας και V, D και J γονίδια στην περίπτωση της β αλυσίδας. Ως εκ τούτου η CDR3 περιοχή της β αλυσίδας (CDR3β) εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα ποικιλομορφίας στον TCR(47–49) .

Το φαινόμενο διασταυρούμενης- δραστικότητας

Το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστικότητας (cross reactivity) αφορά την ικανότητα των μορίων TCR να αναγνωρίζουν διαφορετικούς συνδυασμούς συμπλόκων MHC-πεπτιδίων (συγγενικούς και όμοιους προσδέτες) σε αντίστοιχο μηχανισμό με εκείνο που το συγκεκριμένο φαινόμενο παρατηρείται και στα αντισώματα(50). Το συγκεκριμένο φαινόμενο σχετίζεται με την ποσότητα διαφορετικών πεπτιδίων που μπορούν να αναγνωριστούν και αφορά υψηλή ποικιλομορφία όπου ένας TCR μπορεί να αναγνωρίζει εκατοντάδες έως και χιλιάδες διαφορετικά πεπτίδια. Επιπρόσθετα, προτείνεται ότι τα επίπεδα του συγκεκριμένου φαινομένου διαφέρουν μεταξύ της αναγνώρισης αντιγόνων που συνδέονται με MHC-I και MHC-II(47).

Το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστικότητας μπορεί να διαμορφωθεί από την δομική προσαρμογή που εμφανίζουν οι ευέλικτες λούπες των CDR περιοχών δίνοντάς τους την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με διαφορετικά πεπτίδια(49,51). Έτσι το ίδιο μόριο TCR μπορεί να συνδέεται με διαφορετικά σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου μέσω διαφορετικών προσανατολισμών πρόσδεσης (docking orientation)(52). Επίσης, διαφορετικά σύμπλοκα MHC-πεπτιδίου μπορούν να σχηματίζουν όμοιες επιφάνειες λόγω κοινών αμινοξικών αλληλουχιών ή και λόγω ομοιοτήτων στο μέγεθος, το φορτίο και την υδροφοβικότητα που αφορούν την στερεοδιάταξη(53,54). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστικότητας εμπίπτει σε μηχανισμό σύνδεσης «κλειδί-κλειδαριά» όπου ακόμη και η σύνδεση σε μικρό βαθμό μπορεί να είναι λειτουργική αν τα πεπτίδια που την εξυπηρετούν διακατέχονται από συγκεκριμένα συντηρημένα αμινοξικά κατάλοιπα τα οποία χαρακτηρίζονται “hotspots”(47,55). Αντίστοιχη εξήγηση προτείνεται σε άλλη μελέτη(53) όπου υποστηρίζεται ότι πεπτίδια που συνδέονται με όμοια MHC μόρια χρειάζεται να μοιράζονται 5 αμινοξικά κατάλοιπα για την διασταυρούμενη αντίδραση με τον ίδιο TCR στα οποία μπορούν να συμπεριλαμβάνονται κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν άμεσα με την CDR3 περιοχή. Στο ίδιο πλαίσιο προτείνεται η παρουσία συντηρημένων αμινοξέων στις CDR3 περιοχές και των δύο αλύσων για αλληλεπίδραση με κοινά πεπτίδια(47).

Το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστικότητας στα T λεμφοκύτταρα χαρακτηρίζεται ως το ένα επίπεδο της ετερόλογης ανοσίας η οποία αφορά την στόχευση ενός παθογόνου έπειτα της έκθεσης σε άλλα παθογόνα(56). Το άλλο επίπεδο της ετερόλογης ανοσίας αφορά την ενεργοποίηση T λεμφοκυττάρων που οφείλεται σε ανεξάρτητο ερέθισμα που οδηγεί σε απελευθέρωση υψηλών επιπέδων κυτταροκινών ή στην χαμηλής συγγένειας αλληλεπίδραση με σύμπλοκο MHC-πεπτιδίου(57,58). Η ετερόλογη ανοσία έχει μελετηθεί εκτενώς για ιογενείς λοιμώξεις σε πολλούς οργανισμούς μοντέλα, όπως επίσης και στον άνθρωπο όπου το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστικότητας θα μπορούσε να επηρεάσει την σοβαρότητα σε νόσους που οφείλονται σε ιούς(59–61).

Τον τελευταίο χρόνο η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της προς την σχέση της ανοσιακής απάντησης των Τ λεμφοκυττάρων στην COVID-19 σε σχέση με την ευαισθησία και σοβαρότητα της νόσου(62–68). Η μελέτη των Τ λεμφοκυττάρων φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητος δείκτης των παρελθοντικών λοιμώξεων σε σχέση με την εξέταση των αντισωμάτων. Προσεγγίσεις μεγάλης κλίμακας με στόχο την απάντηση των Τ λεμφοκυττάρων μπορούν να προσφέρουν σημαντική πληροφορία σε σχέση με τις έννοιες του κλωνικού βάθους, πλάτους και της κλωνικής δυναμικής σε συσχέτιση με την συμπτωματολογία και σοβαρότητα της νόσου(69). Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με τους κορονοϊούς Middle East Respiratory Syndrome (MERS) και SARS-CoV-1 υποστηρίζουν ότι ειδικοί πληθυσμοί Τ λεμφοκυττάρων σχετιζόμενοι με αυτούς μπορούν να ανιχνεύονται για μακρά διάρκεια(70,71). Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση του SARS-CoV-2(72)(73). Τέτοιες παρατηρήσεις διαμορφώνουν την υπόθεση του φαινομένου της διασταυρούμενης δραστηριότητας όπου προϋπάρχοντες κλώνοι Τ λεμφοκυττάρων που προέκυψαν από παρελθοντική λοίμωξη ή εμβολιασμό μπορούν να έχουν προστατευτική δράση κατά επόμενη έκθεση σε παθογόνα. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν αναφορές σχετικά με το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστηριότητας ανάμεσα στον SARS-CoV-2 και άλλους κορονοϊούς. Πιο συγκεκριμένα, έχει περιγραφεί ότι εξουδετερωτικά αντισώματα προερχόμενα από Β λεμφοκύτταρα μνήμης, απομονωμένα από άτομο που είχε μολυνθεί από τον SARS-CoV-1 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με την S πρωτεΐνη του SARS-CoV-2(74). Επιπρόσθετα, κλώνοι Τ λεμφοκυττάρων που μπορούν να αναγνωρίσουν αντιγόνα του SARS-CoV-2 φαίνεται να έχουν προκύψει κατά κάποια παρελθοντική λοίμωξη από άλλους κορονοϊούς σε ποσοστό 20% με 50% ατόμων που δεν έχουν νοσήσει από την COVID-19(75–80). Τέτοιοι προϋπάρχοντες κλώνοι θα μπορούσαν να επηρεάζουν τις κλινικές εκδηλώσεις της COVID-19 επηρεάζοντας την ευαισθησία και σοβαρότητα της νόσου.

Εντούτοις, το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστηριότητας μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα για τον άνθρωπο. Πιο συγκεκριμένα, αυτοάνοσες διαταραχές έπειτα ανοσιακής απάντησης έναντι παθογόνων μπορούν να σχετίζονται με Τ λεμφοκύτταρα που δρουν στα πλαίσια της διασταυρούμενης δραστηριότητας. Το συγκεκριμένο φαινόμενο καλείται μοριακή μίμηση, όπου πεπτίδια προερχόμενα από παθογόνα ενεργοποιούν αυτοδραστικά Τ λεμφοκύτταρα λόγω δομικής ομοιότητάς τους με ίδια-πεπτίδια προκαλώντας αυτοάνοσα νοσήματα ή επιδεινώνοντας ήδη υπάρχουσες αυτοάνοσες εκδηλώσεις(81–83).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΜΕΛΕΤΗΣ

Αντικείμενο της συγκεκριμένης μελέτης είναι η μοριακή στόχευση πολυμορφισμών και η βιοπληροφορική προσέγγιση του φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας στα Τ λεμφοκύτταρα για την μελέτη της ετερογένειας στην ευαισθησία και σοβαρότητα της COVID-19.

Η λοίμωξη από SARS-CoV-2 εμφανίζει υψηλή ετερογένεια ως προς την συμπτωματολογία και την ευαισθησία σε ένα μεγάλο φάσμα από οξεία νόσο όπου απαιτείται νοσηλεία έως ασυμπτωματική νόσο όπου αρκετές φορές η θετικότητα δεν γίνεται καν αντιληπτή. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον εμφανίζουν άτομα τα οποία αν και ήρθαν σε επαφή με ασθενείς της COVID-19 δεν εμφάνισαν ποτέ ούτε ασυμπτωματική νόσο. Θα μπορούσαμε να χαρακτηρίσουμε τέτοιες περιπτώσεις ατόμων ως «άτρωτους» καθώς φαίνεται να μην είναι δυνατόν να μολυνθούν από τον ιό. Το αίτιο πίσω από το συγκεκριμένο φαινόμενο δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο. Αναγνωρίστηκαν τέσσερις τέτοιες περιπτώσεις ατόμων, όπου ενώ υπήρξε επαφή τους με τον ιό (τα συγκεκριμένα άτομα ζούσαν μαζί με ασθενείς χωρίς προφύλαξη) ωστόσο δεν μολύνθηκαν. Λαμβάνοντας υπ' όψη τον σημαντικό ρόλο των πρωτεϊνών ACE2 και TMPRSS2 για τον κύκλο ζωής του SARS-CoV-2 ακολούθησε η υπόθεση ότι ενδεχομένως κάποιες γενετικές βλάβες στην υπομονάδα του ACE2 που αφορά την αλληλεπίδραση με την S πρωτεΐνη του SARS-CoV-2 ή στο ενεργό κέντρο του ενζύμου TMPRSS2 θα μπορούσαν να αποτελούν αίτιο-κλειδί του προαναφερόμενου φαινοτύπου. Έτσι στοχεύθηκαν και μελετήθηκαν οι αντίστοιχες γενετικές περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, λήφθηκε δείγμα αίματος από τους συμμετέχοντες, ακολούθησε απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) και ενίσχυση των περιοχών ενδιαφέροντος με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τα προϊόντα στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν προκειμένου να εξεταστεί η ύπαρξη γενετικής βλάβης ή πολυμορφισμού που θα μπορούσε να δώσει εξήγηση στο παραπάνω ερευνητικό ερώτημα.

Επιπρόσθετα, προκειμένου να μελετηθεί η ανοσιακή απάντηση των Τ λεμφοκυττάρων κατά την COVID-19 χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την βάση δεδομένων MIRA dataset της πλατφόρμας ImmunoCODE που περιγράφουν κλωνοτύπους σε συνάρτηση με τα αντιγόνα του SARS-CoV-2 που στοχεύουν. Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης πραγματοποιήθηκε περιγραφική ανάλυση των προαναφερόμενων δεδομένων και εφαρμόστηκε μοντέλο μηχανικής μάθησης προκειμένου να μελετηθούν οι κλώνοι που ανιχνεύονται μετά την δοκιμασία MIRA (Multiplex Identification of Antigen Specific TCR) σε άτομα που ήρθαν σε επαφή με τον ιό σε σχέση με υγιείς δότες. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν δημόσιες βάσεις δεδομένων TCR ώστε να ελεγχθεί αν κλωνότυποι ειδικοί για αναγνώριση των αντιγόνων του SARS-CoV-2 δύναται να αποτελούν κομμάτι της ανοσιακής

απάντησης έναντι αντιγόνων από άλλα παθογόνα και νόσους προσεγγίζοντας έτσι την έννοια του φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας.

Οι δυο προαναφερόμενες προσεγγίσεις είχαν σκοπό να διερευνηθούν βασικοί μηχανισμοί της ανοσιακής απάντησης, ώστε να προκύψουν σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την ετερογένεια που παρατηρείται στην σοβαρότητα της COVID-19.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ομάδα μελέτης

Στην μελέτη συμμετείχαν 4 άτομα (άντρες/γυναίκες: 2/2, διάμεσος ηλικιακή τιμή: 43 ετών). Κάθε συμμετέχων παρείχε υπογεγραμμένη συγκατάθεση μετά από ενημέρωση. Η μελέτη διεξήχθη με βάση τις αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι και εγκρίθηκε από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (αριθ. 2116). Πληροφορίες σχετικά με ιατρικό ιστορικό και συνοσηρότητες παρατίθενται στον Πίνακα 1.

No	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Μοριακή ή/και Πρωτεϊνική ανίχνευση SARS-CoV-2	Anti-N και anti-S anti-SARS-CoV-2 δοκιμασίες	Εμβολιασμός	Anti-S IgG μετά εμβολιασμού (CMIA, U/mL)*	Ανίχνευση κυτταρικής ανοσίας (IFN-g mIU/mL)^
1	A	45	Αρνητικό (>2 φορές)	Αρνητικό	Ad26.COV2.S	5915.00	5794.67
2	Θ	44	Αρνητικό (>2 φορές)	»	BNT162b2	443.20	938.56
3	A	39	Αρνητικό (>2 φορές)	»	Όχι		
4	Θ	42	Αρνητικό (>4 φορές)	» (2 φορές)	Όχι		

Πίνακας 1. Δημογραφικά, κλινικά, και εργαστηριακά δεδομένα των συμμετεχόντων

Συντομογραφίες: CMIA: chemiluminescent immunoassay; Θ: θήλυ; A: άρρεν

* Το όριο θετικότητας ήταν 50 U/mL.

^ Το όριο θετικότητας ήταν 100 mIU/mL

Όλοι οι συμμετέχοντες ήρθαν σε άμεση επαφή με COVID-19 ασθενείς μοιράζοντας την ίδια οικία και ζώντας μαζί τους. Οι συμμετέχοντες #1, #2 και #3 (Πίνακας 1) ζούσαν σε οικισμό Ρομά και συνόδευσαν τα παιδιά τους (ενώ ήταν θετικά στην COVID-19) σε δομή απομόνωσης για τουλάχιστον 14 ημέρες. Η συμμετέχουσα #4 δεν μολύνθηκε από τον SARS-CoV-2 ενώ ήρθε σε επαφή με θετικό κρούσμα δύο φορές, όταν νόσησε ο σύζυγος και το παιδί της αντίστοιχα. Όλοι οι συμμετέχοντες ελέγχθηκαν επανειλημμένα με αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR) για ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2 σε ρινοφαρυγγικό δείγμα και το αποτέλεσμα ήταν αρνητικό όλες τις φορές.

Μελέτη χυμικής και κυτταρικής ανοσίας ενάντια στον SARS-CoV-2

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της χυμικής ανοσίας στους συμμετέχοντες με χρήση ανοσο-δοκιμασίας χημειοφωταύγειας (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) και με την μέθοδο ELISA όπως έχει περιγραφεί σε σχετικές μελέτες(84,85) ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο μόλυνσής τους έστω ασυμπτωματικά. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μελέτη της κυτταρικής ανοσίας προσεγγίζοντας την ύπαρξη δραστικών T λεμφοκυττάρων έναντι του SARS-CoV-2 μέσα από την μέτρηση των επιπέδων IFN-γ σε δοκιμασία ELISA μετά από επώαση περιφερικού αίματος με πεπτίδια της S πρωτεΐνης για 20 ώρες όπως έχει περιγραφεί σε σχετική μελέτη(85). Οι προαναφερθείσες δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν στις περιπτώσεις δύο συμμετεχόντων (#1 και #2) όταν είχαν εμβολιαστεί έναντι του SARS-CoV-2 με Ad26.COV2.S (Janssen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium) και BNT162b2(Biotech, Mainz, Germany) πριν από 1,5 και 4 μήνες αντίστοιχα. Ακόμη, δοκιμασία προσέγγισης τόσο της χυμικής όσο και της κυτταρικής ανοσίας πραγματοποιήθηκε και στην περίπτωση της συμμετέχουσας #4.

Μοριακές τεχνικές

Οι γονιδιακές περιοχές ενδιαφέροντος (hot-spot locations) στα γονίδια *ACE2* και *TMPRSS2* στοχεύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και αλληλούχιση κατά Sanger (PCR-Sanger). Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε με το εμπορικό σκεύασμα Bliirt kit (Gdansk, Poland) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή.

- Σε αποστειρωμένο σωληνάριο (ependorf) προστίθενται 200 µl περιφερικού αίματος.
- Προστίθεται 1 ml διαλύματος για λύση ερυθροκυττάρων (Red Blood Cells Lysis Buffer το οποίο συντέθηκε στο εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας) και ακολουθεί επώαση στον εργαστηριακό πάγκο μέχρι να ολοκληρωθεί η λύση των ερυθρών αιμοσφαιρίων.
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 8600 g για 4 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Έπειτα το ίζημα επαναδιαλύεται σε 375 µl GL Buffer.
- Προστίθενται 10 µl Πρωτεΐνάσης K.
- Ακολουθεί επώαση στους 55° C για 30 λεπτά.
- Αφαιρείται το διάλυμα από τους 55° C και 4 µl RNAασης A προστίθενται σε αυτό.

- Έπειτα πραγματοποιείται επώαση στους 37° C για 10 λεπτά.
- Το διάλυμα αφαιρείται από το υδατόλουτρο, προστίθενται 400 µl GB Buffer και ακολουθεί ανάδευση.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 2 λεπτά.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται μία στήλη απομόνωσης (spin column).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 λεπτό.
- Απορρίπτεται το φιαλίδιο collection tube και η στήλη (spin column) μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο collection tube.
- Προστίθενται 600 µl Wash Buffer 1.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
- Προστίθενται 500 µl Wash Buffer 2.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
- Το διάλυμα του φιαλιδίου collection tube απορρίπτεται και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 16.000 g για 2 λεπτά.
- Το φιαλίδιο collection tube απορρίπτεται και η στήλη (spin column) μεταφέρεται στο τελικό φιαλίδιο ependorf.
- Προστίθενται 100 µl διαλύματος έκλουσης (Elution Buffer) και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στον εργαστηριακό πάγκο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 13.000 g για 1 λεπτό.
- Το διάλυμα συλλέγεται σε τελικό φιαλίδιο ependorf και αποθηκεύεται στους -20°C

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Ενισχύθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) 3 εξόνια του γονιδίου *ACE2* και 4 εξόνια του γονιδίου *TMPRSS2*. Πιο συγκεκριμένα, για το γονίδιο *ACE2* στοχεύθηκαν το εξόνιο 1 που κωδικοποιεί το αμινοξικό κατάλοιπο της λυσίνης 31, και τα εξόνια 16 και 17 που κωδικοποιούν μια αμινοξική αλληλουχία πλούσια σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης (κατάλοιπα 697 έως 716). Ως προς το γονίδιο *TMPRSS2* ενισχύθηκαν το εξόνιο 6, που περιλαμβάνει τον λειτουργικό πολυμορφισμό rs12329760, το εξόνιο 9, στο οποίο κωδικοποιείται το κατάλοιπο ιστιδίνης 296, το εξόνιο 10, στο οποίο κωδικοποιείται το κατάλοιπο ασπαρτικού οξέος 345, και το εξόνιο 13, στο οποίο κωδικοποιείται το κατάλοιπο σερίνης 441. Για όλες τις προαναφερθείσες αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν 100 με 200 ng δείγματος DNA και ενισχύθηκαν σε φιαλίδιο PCR-tube τελικού όγκου 30 µl χρησιμοποιώντας 62,5 mM διαλύματος τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων, 500 pmoles από κάθε εκκινητή, 1,5 mM MgCl₂ και 0,8 U DNA πολυμεράσης DFS-Taq DNA polymerase (Bioron GmbH, Romerberg, Germany) σε ένα διάλυμα DFS Buffer που προσφέρεται από τον κατασκευαστή. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν και

προμηθεύθηκαν από την εταιρία Thermo Fisher. Οι συνθήκες θερμοκρασίας καθώς και οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εκκινητών για κάθε αντίδραση παρατίθενται στον Πίνακα 2.

Γονίδιο	Εκινητές	Αλληλουχία	Συνθήκες PCR	Προϊόν PCR
ACE2				
Exon 1	Forward	5'-GGCCATAAAGTGACAGGAGAGGTAAGG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	600 bp
	Reverse	5'-TGGAGGCAAACATCCAATCTCA-3'		
Exon 16	Forward	5'-TCTTCATTCTCTTGATTGTGTCCTCTG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	230 bp
	Reverse	5'-TTGTTGTAATTGGTAACCCCTCAC-3'		
Exon 17	Forward	5'-TCTAAGTGTCCTCTTGCTGTTT-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	252 bp
	Reverse	5'-TAGGAAAGGCCACTTACTTCTTCC-3'		
TMPRSS2				
Exon 6	Forward	5'-AAGAAACTCATGGATAATCCTCCCTCT-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	274 bp
	Reverse	5'-ACAATTGTCCTCCAGCACTCAT-3'		
Exon 9	Forward	5'-GCATCCTCCCTTCCCAAGAG-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	534 bp
	Reverse	5'-AGTGCATACAGCCATGCACTGC-3'		
Exon 10	Forward	5'-GCTCTGTGTTTATGGCTCTGAGAT-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	274 bp
	Reverse	5'-CATCTCTTAAAGATTCTGCCAACCTG-3'		
Exon 13	Forward	5'-TGCGGCAGATTGTGACTTGA-3'	94°C for 2min, followed by 30 cycles (94°C for 30 s, 62°C for 30 s and 72°C for 30s) and a final elongation at 72°C for 5 min	272 bp
	Reverse	5'-AACAGATGTCTGGCTTTGGCT-3'		

Πίνακας 2. Συνθήκες και εκκινητές PCR περιοχές ενδιαφέροντος

Τα προϊόντα της PCR για κάθε αντίδραση ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αгарόζης 2% ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της αντίδρασης.

Καθαρισμός PCR προϊόντων (Purification)

Για τα προϊόντα ενίσχυσης των εξονίων 1, 16 και 17 του *ACE2* και των εξονίων 6 και 10 του *TMPRSS2* πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των προϊόντων PCR. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα PCR purification kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Προστίθενται 50 µl CB Buffer σε κάθε φιαλίδιο με προϊόν PCR.
- Το διάλυμα μεταφέρεται σε ειδικές στήλες (spin columns).
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
- Απορρίπτεται το φιαλίδιο collection tube και η στήλη (spin column) μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο.
- Προστίθενται 700 µL CW Buffer που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).
- Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα. Το διάλυμα της φυγοκέντρησης απορρίπτεται.
- Προστίθενται 700 µL CW Buffer που περιέχει αιθανόλη (Wash Buffer).

- Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 30 δευτερόλεπτα. Το διάλυμα της φυγοκέντρησης απορρίπτεται.
- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 11.000g για 3 λεπτά.
- Απορρίπτεται το φιαλίδιο collection tube και η στήλη (spin column) μεταφέρεται τελικό φιαλίδιο erendorf.
- Προστίθενται 30 μl διαλύματος έκλουσης Elution Buffer (το οποίο έχει προθερμανθεί στους 55-70°C) και ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό στον εργαστηριακό πάγκο.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 11.000 g για 1 λεπτό.
- Το διάλυμα συλλέγεται σε τελικό φιαλίδιο erendorf και αποθηκεύεται στους -20°C.

Απομόνωση DNA από γέλη αγαρόζης (Gel extraction)

Για τα προϊόντα ενίσχυσης των εξονίων 9 και 13 του *TMPRSS2* πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από γέλη καθαρισμός των προϊόντων PCR. Χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό σκεύασμα Gel extraction kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) με βάση τις οδηγίες του κατασκευαστή. Πιο συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για 30-50 λεπτά σε γέλη αγαρόζης 2%.
- Έπειτα το gel τοποθετείται σε μηχανήμα που εκπέμπει υπεριώδες φως (UV transilluminator, UVITEC, Cat.No. M031308) και η επιθυμητή ζώνη (στα 534 bp για το εξόνιο 9 και 272bp για το εξόνιο 13 του γονιδίου *TMPRSS2*) απομονώνεται με νυστέρι και τοποθετείται σε φιαλίδιο erendorf.
- Προστίθεται το L3 (Gel Solubilization Buffer) σε όγκο τριπλάσιο από αυτόν της γέλης που απομονώθηκε.
- Ακολουθεί επώαση στο υδατόλουτρο, στους 50° C για 30-40 λεπτά .
- Προστίθεται ισοπροπανόλη, ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά του περιεχόμενου σε ειδική στήλη (Quick Gel Extraction Column, Invitrogen).
- Έπειτα πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό και απομακρύνεται το διάλυμα της φυγοκέντρησης.
- Προστίθενται 500 μL Wash Buffer, W1.
- Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό και απομακρύνεται το διάλυμα της φυγοκέντρησης.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000 g για 2 λεπτά.
- Απορρίπτεται το collection tube και η στήλη μεταφέρεται στο τελικό tube.
- Προστίθενται 30 μl Elution Buffer (αφού έχει προ-θερμανθεί στους 55-70° C) και ακολουθεί επώαση για 1 λεπτό στον εργαστηριακό πάγκο.

- Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 12.000 g για 1 λεπτό.
- Το διάλυμα συλλέγεται σε τελικό φιαλίδιο erendorff και αποθηκεύεται στους -20°C

Αλληλούχιση κατά Sanger

Ακολούθησε αλληλούχιση κατά Sanger των καθαρισμένων προϊόντων PCR με τον αναλυτή ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) και το εμπορικό σκεύασμα BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems).

Σύλλογή ανοσογενετικής πληροφορίας από βάσεις δεδομένων

Ανοσογενετική πληροφορία σχετικά με T κυτταρικούς υποδοχείς (TCR) συλλέχθηκε από τέσσερις δημόσιες βάσεις δεδομένων, τις MIRA dataset, McPAS, TCR3d και VDJdb. Η πληροφορία είναι δομημένη σε πίνακες που συσχετίζουν αλληλουχίες TCR με πρωτεΐνες/αντιγόνα που στοχεύουν καθώς και τους επιτόπους που αναγνωρίζουν.

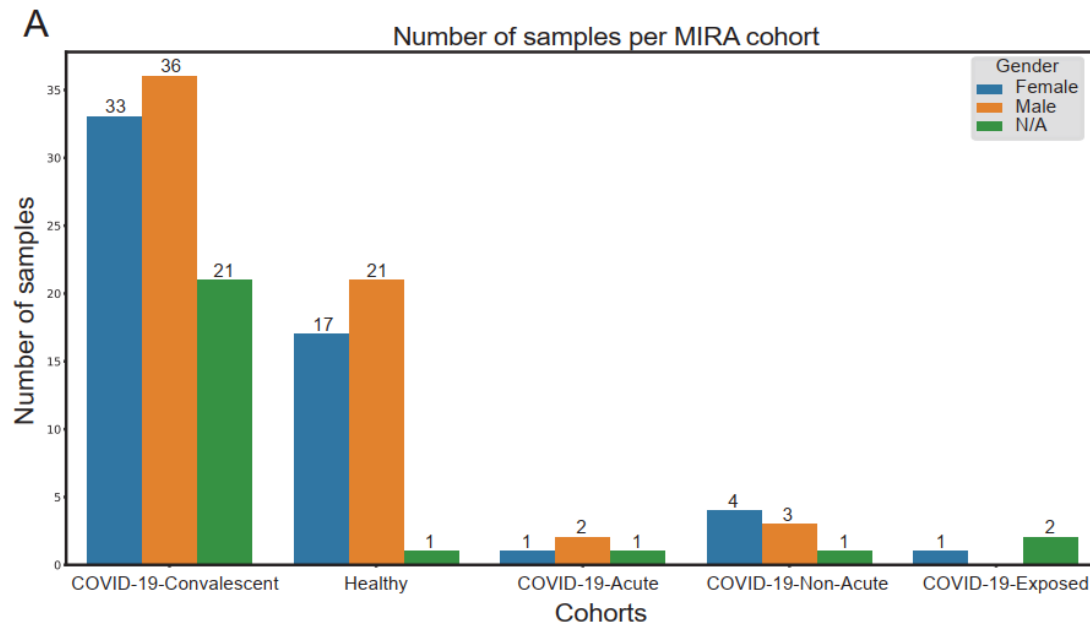
MIRA dataset

Πληροφορία σχετικά με TCR που αναγνωρίζουν επιτόπους του SARS-CoV-2 ανακτήθηκε από την βάση δεδομένων MIRA dataset που αποτελεί υποσύνολο της βάσης immuneACCESS[®](68). Πρόκειται για δεδομένα που προέκυψαν από αλληλούχιση νέας γενιάς στοχεύοντας την β αλυσίδα του TCR (NGS, Immunosequencing) σε συνδυασμό με την δοκιμασία MIRA(86) (Multiplex Identification of Antigen-Specific T cell Receptors)(76) και περιγράφουν ανοσογενετικά συγκεκριμένους T κλωνοτύπους, τους επιτόπους του SARS-CoV-2 που στοχεύονται καθώς και τις σχετικές ικές πρωτεΐνες-αντιγόνα από όπου προέρχονται. Η ταυτότητα κάθε TCR στο MIRA dataset χαρακτηρίζεται από την αλληλουχία της CDR3 (β αλύσου) περιοχής σε αμινοξικό επίπεδο, το V γονίδιο και το J γονίδιο.

Από το συγκεκριμένο dataset ανακτήθηκαν 1.006 μοναδικοί κλωνότυποι από το αρχείο minigene-detail, 11.4411 μοναδικοί κλωνότυποι από το peptide-detail-ci (αφορά CD8+ λεμφοκύτταρα) και 4.651 μοναδικοί κλωνότυποι από το peptide-detail-cii (αφορά CD4+ λεμφοκύτταρα). Επιπρόσθετα, 34 μοναδικοί κλωνότυποι βρέθηκαν στο minigene-detail και στο peptide-detail-ci, ενώ 26 μοναδικοί κλωνότυποι βρέθηκαν στο peptide-detail-ci και peptide-detail-cii.

Το MIRA dataset περιέχει πληροφορία από 144 δείγματα (πειράματα) που προέρχονται από άτομα που ήρθαν σε επαφή με τον SARS-CoV-2 καθώς και από υγιείς δότες. Σε κάποιες περιπτώσεις πάνω

από ένα δείγματα έχουν ληφθεί από το ίδιο άτομο. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για 90 δείγματα που προέρχονται από άτομα που έχουν αναρρώσει από COVID-19 (COVID-19 Convalescent), 39 δείγματα από υγιή άτομα χωρίς γνωστή επαφή με τον ιό (Healthy – no known exposure), 4 δείγματα από οξεία νόσο (COVID-19-acute), 8 δείγματα από από μη οξεία νόσο (COVID-19-non-acute) και 3 δείγματα από άτομα που απλά εκτέθηκαν στον ιό (COVID-19-exposed) όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Ο αριθμός των δειγμάτων (πειραμαμάτων) του MIRA dataset και οι κλινικές ομάδες

Για την ανάλυση της συγκεκριμένης μελέτης χρησιμοποιήθηκε πληροφορία προερχόμενη μόνο από τις ομάδες των υγιών ατόμων (Healthy – no known exposure) και των ατόμων που έχουν αναρρώσει από COVID-19 (COVID-19 Convalescent) καθώς οι άλλες ομάδες αφορούν περιορισμένο αριθμό δειγμάτων.

McPAS, TCR3d και VDJdb

Χρησιμοποιήθηκαν πίνακες δεδομένων προερχόμενοι από δημόσιες βάσεις TCR με ανοσογενετική πληροφορία σχετικά με κλωνοτύπους και τα παθολογικά αίτια που οδηγούν στην κλωνική διέγερσή τους, αυτή τη φορά σχετικά με πληθώρα παθογόνων και νοσημάτων. Τα συγκεκριμένα δεδομένα χρησιμοποιήθηκαν ώστε να διερευνηθεί η συμμετοχή κλωνοτύπων που αναγνωρίζουν SARS-CoV-2 ειδικούς επιτόπους, στην ανοσιακή απάντηση έναντι άλλων παθογόνων και νόσων.

Η βάση δεδομένων McPAS (Pathology-associated TCR database)(87) περιλαμβάνει αλληλουχίες TCR σχετιζόμενες με κλινικές εκδηλώσεις, περιλαμβάνοντας πληροφορία για την παθολογία, τον τύπο του T λεμφοκυττάρου, το όργανο και ιστό της ανοσιακής απάντησης, το αντιγόνο-στόχο και σχετιζόμενα με τον επίτοπο MHC μόρια. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν την CDR3 (β

αλύσου) αλληλουχία και την παθολογική κατάσταση που αφορά την ανοσιακή απάντηση. Τα δεδομένα της McPAS ανακτήθηκαν στις 4/1/2022.

Η βάση δεδομένων TCR3d(88) περιέχει πειραματικά προσδιορισμένη πληροφορία σχετικά με την στερεοδιαμόρφωση TCR. Επιπρόσθετα, περιέχει αλληλουχίες TCR, τα αντιγόνα που στοχεύουν και τα παθογόνα από όπου προέρχονται, όπως και σχετικά MHC μόρια. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που αφορούν την CDR3 (β αλύσου) αλληλουχία και ιούς που σχετίζονται με την αντίστοιχη ανοσιακή απάντηση. Τα δεδομένα ανακτήθηκαν στις 13/1/2022.

Η βάση δεδομένων VDJdb(89) περιέχει αλληλουχίες TCR, τα αντιγόνα που αναγνωρίζουν και τα σχετικά MHC μόρια. Χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα σχετικά με την CDR3 (β αλύσου) αλληλουχία και το είδος από το οποίο προέρχεται ο επίτοπος που στοχεύει ο συγκεκριμένος TCR. Τα δεδομένα ανακτήθηκαν στις 22/3/2022.

Καθαρισμός δεδομένων (filtering)

Εφαρμόστηκαν διαφορετικά φίλτρα ώστε η ανάλυση να αφορά έγκυρες και λειτουργικές αλληλουχίες TCR με βάση την ορολογία του IMGT (International Immunogenetics Information System)(90).

Πιο συγκεκριμένα, το πρώτο φίλτρο αφορά στην οριοθέτηση της περιοχής CDR3. Η περιοχή CDR3 οριοθετείται μεταξύ 2 συντηρημένων αμινοξικών καταλοίπων, μιας κυστεΐνης (CYS) στη θέση 104 και μιας τρυπτοφάνης (W) ή φαινυλαλανίνης (F) στη θέση 118 (με βάση το IMGT). Χρησιμοποιήθηκαν μόνο TCRs με οριοθετημένη CDR3 αλληλουχία.

Επιπρόσθετα εφαρμόστηκε δεύτερο φίλτρο σχετικά με επιλογή αλληλουχιών που προέκυψαν από υψηλή ποιότητα αλληλούχισης. Συγκεκριμένα, απορρίφθηκαν αλληλουχίες με μη ειδικούς χαρακτήρες στην CDR3 περιοχή οι οποίοι δεν αντιστοιχούν σε αμινοξέα και αφορούν είτε λάθη στην διαδικασία της αλληλούχισης είτε μη λειτουργικές αλληλουχίες (X, *, . και #). Σε περιπτώσεις που παρατηρείται το σύμβολο X είναι αδύνατο να χαρακτηριστεί το αμινοξύ, ενώ το σύμβολο # αφορά αλληλουχίες εκτός αναγνωστικού πλαισίου (out of frame) και το σύμβολο * αντιστοιχεί σε κωδικόνιο λήξης.

Το τρίτο φίλτρο αφορά τη λειτουργικότητα του αναδιαταγμένου TRBV γονιδίου. Έτσι επιλέγονται αλληλουχίες με λειτουργικό γονίδιο V και απορρίπτονται ψευδογονίδια και γονίδια TRBV με ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF).

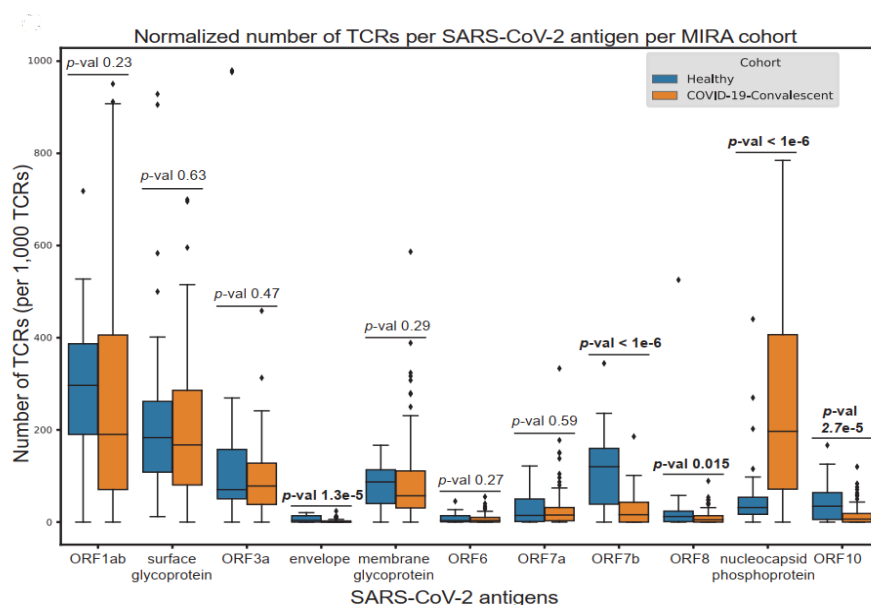
Το τέταρτο φίλτρο αφορά στη λειτουργικότητα της αναδιάταξης των γονιδίων της β αλυσίδας του TCR. Με αυτό το φίλτρο επιλέγονται οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν μόνο σε λειτουργικές αναδιατάξεις.

Τα προαναφερόμενα φίλτρα εφαρμόστηκαν για την πληροφορία που χρησιμοποιήθηκε από τις 4 βάσεις δεδομένων MIRA dataset, McPAS, TCR3d και VDJdb. Επιπρόσθετα, συγκεκριμένα για το

MIRA dataset, κλωνότυποι χωρίς συγκεκριμένο V στο MIRA dataset (επισημασμένοι με X) δεν χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. Ακόμη από τις 3 βάσεις δεδομένων McPAS, TCR3d και VDJdb χρησιμοποιήθηκε μόνο πληροφορία σχετικά με την β αλυσίδα της CDR3 και την ανοσιακή απάντηση στον άνθρωπο. Επίσης, στον πίνακα της VDJdb υφίσταται στήλη με τιμή εμπιστοσύνης για κάθε καταγραφή, όπου όσο υψηλότερη είναι η τιμή τόσο πιο αξιόπιστα είναι τα δεδομένα. Εγγραφές με τιμή εμπιστοσύνη 0 δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Κάποιες αλληλουχίες υπόκειντο συγκεκριμένη επεξεργασία διόρθωσης βάσει της ορολογίας του IMGT στην συγκεκριμένη βάση δεδομένων. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Επιπρόσθετα, στον πίνακα που προέρχεται από την McPAS υπάρχει στήλη που σχετίζεται με την μέθοδο αναγνώρισης αντιγόνου και η πληροφορία αφορά κατηγορίες μεθόδων. Μέθοδοι σχετιζόμενες με την κατηγορία 3 δεν συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση σύμφωνα με τις συστάσεις για εγκυρότητα στην διαδικτυακή σελίδα της βάσης.

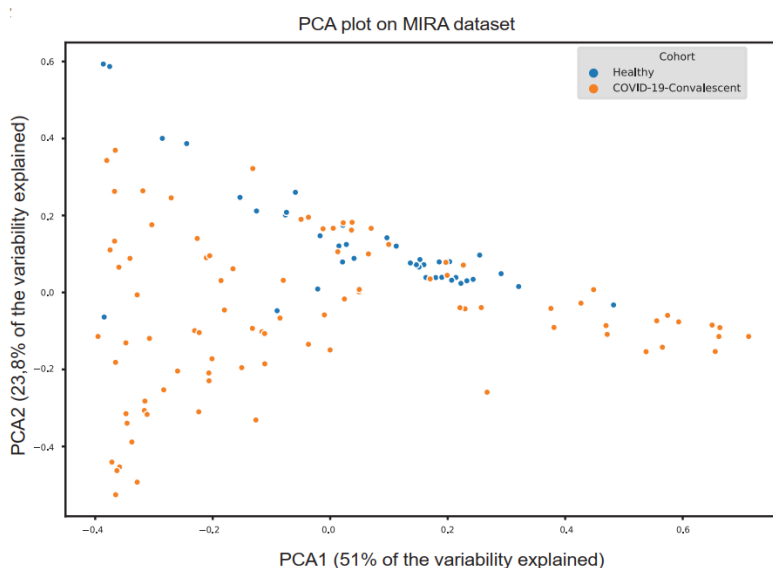
Εκπαίδευση μοντέλων μηχανικής μάθησης και αξιολόγηση σημαντικότητας των χαρακτηριστικών

Τα 90 δείγματα της ομάδας COVID-19 Convalescent χαρακτηρίστηκαν σαν θετικά και τα 39 δείγματα της ομάδας Healthy (no known exposure) χαρακτηρίστηκαν ως αρνητικά. Για κάθε δείγμα διαμορφώθηκε ένα διάλυμα 11 διαστάσεων (που αφορά τα 11 αντιγόνα του SARS-CoV-2 στο MIRA dataset) το οποίο αποτελείται από κανονικοποιημένες τιμές που αντικατοπτρίζουν το ποσοστό των TCR που αναγνωρίζουν το συγκεκριμένο αντιγόνο σε σχέση με τον συνολικό αριθμό TCR που ανιχνεύθηκαν στο δείγμα (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Κανονικοποιημένος αριθμός TCR που αναγνωρίζουν το κάθε αντιγόνο του SARS-CoV-2 για θετικά και αρνητικά δείγματα

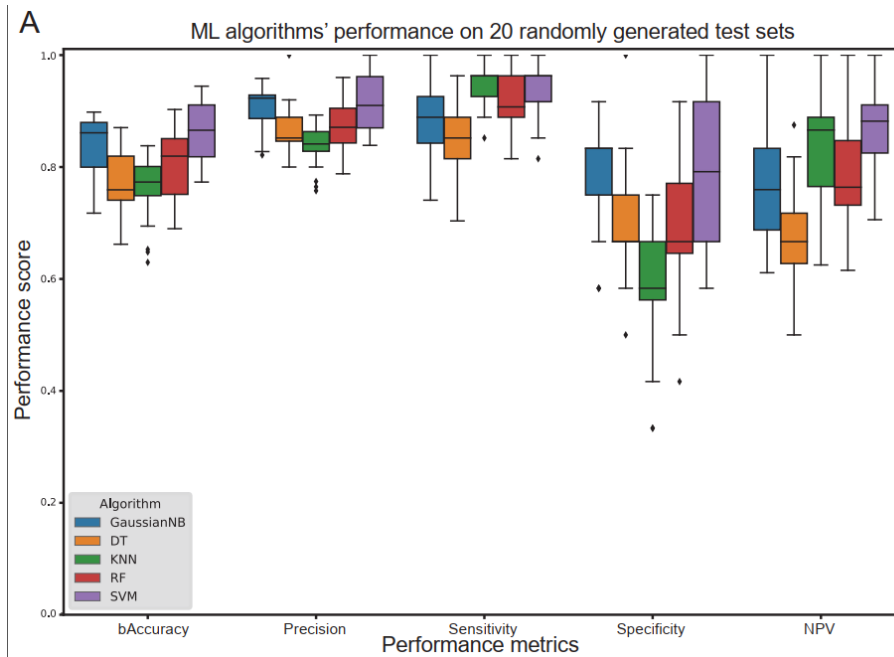
Σε αυτό το πλαίσιο πραγματοποιήθηκε περιγραφή της ετερογένειας των δεδομένων με με μείωση της διαστατικότητας (dimensionality reduction) βάσει της μεθόδου PCA (Principal Component Analysis) η οποία οπτικοποιείται στην Εικόνα 7.



Εικόνα 7: Διάγραμμα PCA για περιγραφή της ετερογένειας μεταξύ θετικών και αρνητικών δειγμάτων ως προς την αναγνώριση των 11 αντιγόνων του SARS-CoV-2 στο MIRA dataset.

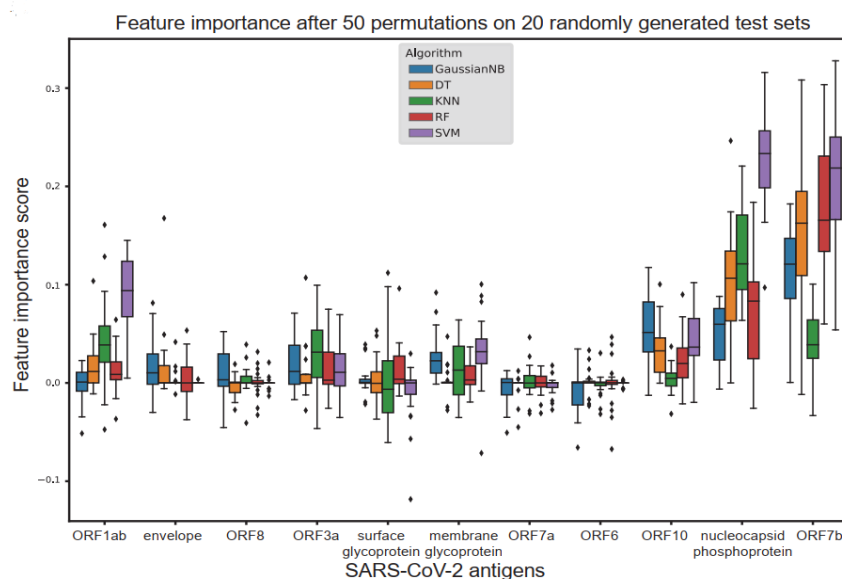
Τόσο τα θετικά όσο και τα αρνητικά δείγματα χωρίστηκαν τυχαία σε ομάδα εκπαίδευσης (training set) και ομάδα δοκιμής (test set) σε αναλογία 7:3. Η συγκεκριμένη διαδικασία επαναλήφθηκε 20 φορές ώστε να δημιουργηθούν διαφορετικοί συνδυασμοί δειγμάτων στις ομάδες εκπαίδευσης και δοκιμής και να αποφευχθεί μεροληψία που θα μπορούσε να οφείλεται στον διαχωρισμό των δειγμάτων.

Οι συγκεκριμένες ομάδες χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση και αξιολόγηση συνολικά 100 μοντέλων βασισμένων σε ευραίως γνωστούς αλγόριθμους μηχανικής μάθησης, τους Gaussian Naive Bayes (GaussianNB), Decision Trees (DT), K-Nearest Neighbours (KNN), Random Forests (RF) και Support Vector Machines (SVM). Πιο συγκεκριμένα, οι 5 αλγόριθμοι εκτελέστηκαν 20 φορές για κάθε διαφορετικό συνδυασμό ομάδας εκπαίδευσης και ελέγχου. Ακολούθησε αξιολόγηση των μετρήσεων επίδοσης σχετικά με την ακρίβεια, την ευαισθησία και την ειδικότητα της μεθόδου (balanced accuracy, precision, sensitivity, specificity και negative predictive value) ελέγχοντας έτσι την ικανότητα πρόβλεψης (Εικόνα 8).



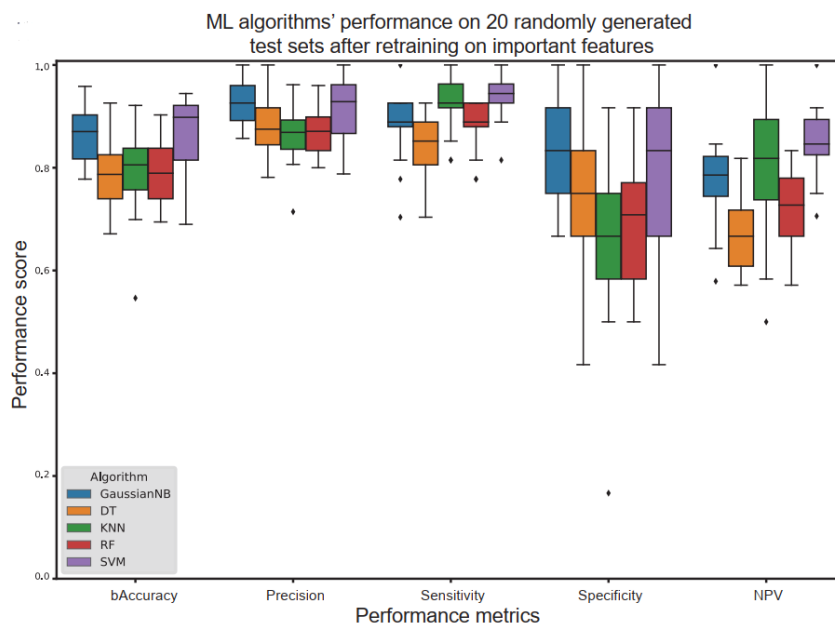
Εικόνα 8: Αξιολόγηση πρόβλεψης των αλγορίθμων μηχανικής μάθησης

Δεδομένου ότι εκπαιδεύτηκαν και συγκρίθηκαν 20 μοντέλα για κάθε αλγόριθμο μηχανικής μάθησης, όλα τα διαγράμματα επιδόσεων απεικονίζουν τις κατανομές της βαθμολογίας των μετρικών από όλες τις ομάδες δοκιμών, παρέχοντας ενδείξεις για την πιθανή μεροληψία του διαχωρισμού εκπαίδευσης/δοκιμής και την ετερογένεια των δεδομένων. Επιπρόσθετα, η σημαντικότητα κάθε χαρακτηριστικού εκτιμήθηκε με 50 επαναλαμβανόμενες τυχαίες διαφοροποιήσεις των τιμών των μεμονωμένων χαρακτηριστικών, για να εκτιμηθεί η μείωση ή η αύξηση της απόδοσης των μοντέλων (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Έλεγχος σημαντικότητας κάθε χαρακτηριστικού (αντιγόνου) με επαναλαμβανόμενες διαφοροποιήσεις των τιμών τους και αξιολόγηση επιρροής του μοντέλου

Για κάθε αλγόριθμο μηχανικής μάθησης, τα χαρακτηριστικά με διάμεση βαθμολογία άνω του 0,01 επιλέχθηκαν για έναν δεύτερο γύρο εκπαίδευσης και αξιολόγησης, ακολουθώντας την προαναφερθείσα μεθοδολογία (Εικόνα 10).

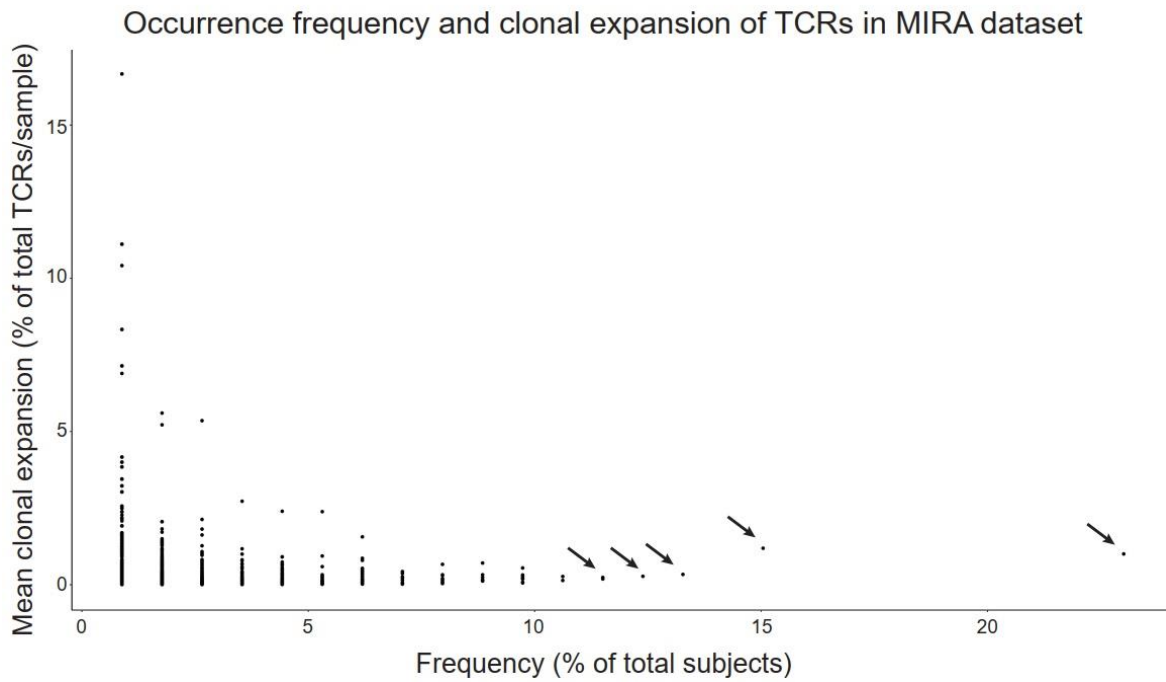


Εικόνα 10: Αξιολόγηση ικανότητας πρόβλεψης των αλγορίθμων μετά από 20 προσεγγίσεις εκπαίδευσης/δοκιμής σύμφωνα με τα σημαντικά χαρακτηριστικά (αντιγόνα) για τον διαχωρισμό θετικών και αρνητικών δειγμάτων

Περιγραφική ανάλυση του MIRA dataset

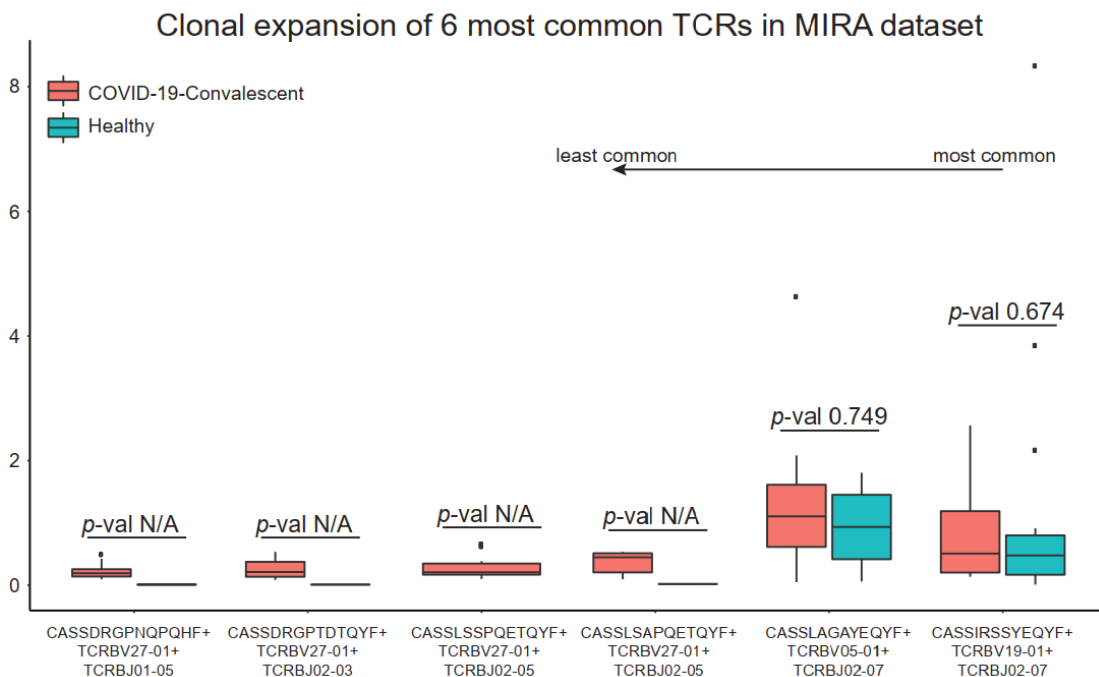
Στην ανάλυση της συγκεκριμένης μελέτης η έννοια του κλωνοτύπου χρησιμοποιείται προκειμένου να περιγράψει το σύνολο αλληλουχιών με την ίδια περιοχή CDR3 σε αμινοξικό επίπεδο, το ίδιο V γονίδιο και μέλος οικογένειας και το ίδιο J γονίδιο και μέλος οικογένειας.

Η κλωνική επέκταση για κάθε κλωνότυπο του MIRA dataset προσδιορίστηκε για κάθε δείγμα (MIRA πείραμα). Πιο συγκεκριμένα, η μέτρηση αφορούσε διαίρεση του αριθμού που παρατίθεται ο συγκεκριμένος κλωνότυπος στα δεδομένα προς το σύνολο των κλωνοτύπων για ένα συγκεκριμένο πείραμα/δείγμα. Στη συνέχεια οι τιμές που αφορούν κάθε πείραμα/δείγμα όπου ανιχνεύθηκε ο συγκεκριμένος κλωνότυπος χρησιμοποιούνται για να υπολογιστεί μέση τιμή η οποία αντικατοπτρίζει την μέση κλωνική επέκταση του συγκεκριμένου κλωνοτύπου. Ακόμη για κάθε κλωνότυπο που ανιχνεύθηκε από την δοκιμασία MIRA υπολογίστηκε η συχνότητά του στο δείγμα. Η συσχέτιση συχνότητας και μέσης κλωνικής επέκτασης για κάθε κλωνότυπο αποτυπώνεται στην Εικόνα 11.



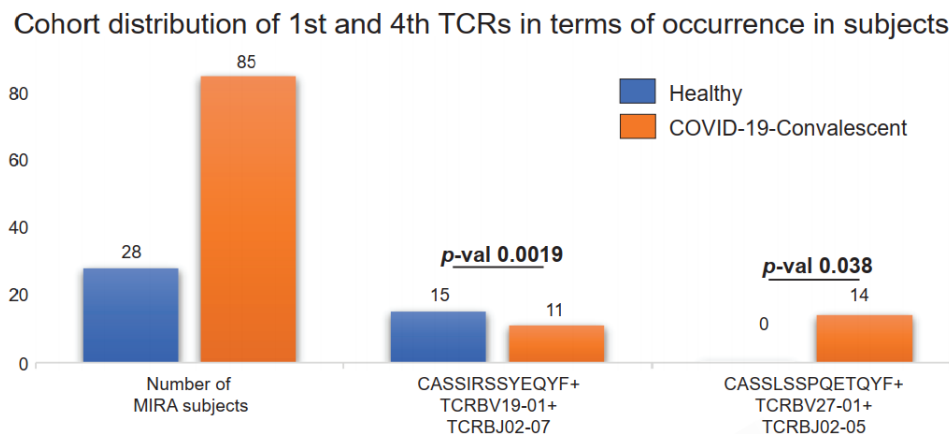
Εικόνα 11: Συσχέτιση συχνότητας και μέσης κλωνικής επέκτασης για κάθε κλωνότυπο του MIRA dataset.

Οι 6 πιο κοινοί κλωνότυποι στο αναλύθηκαν περαιτέρω προσεγγίζοντας συσχέτιση κλωνικής επέκτασης και κλινικού αντίκτυπου στον πληθυσμό του MIRA dataset. Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα κλωνικής επέκτασης προσεγγίστηκαν για κάθε κλινική ομάδα και (COVID-19-Convalescent/Healthy) και απεικονίζονται στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12: Συσχέτιση κλωνικής επέκτασης με την κλινική ομάδα για τους 6 πιο συχνούς κλωνοτύπους του MIRA dataset.

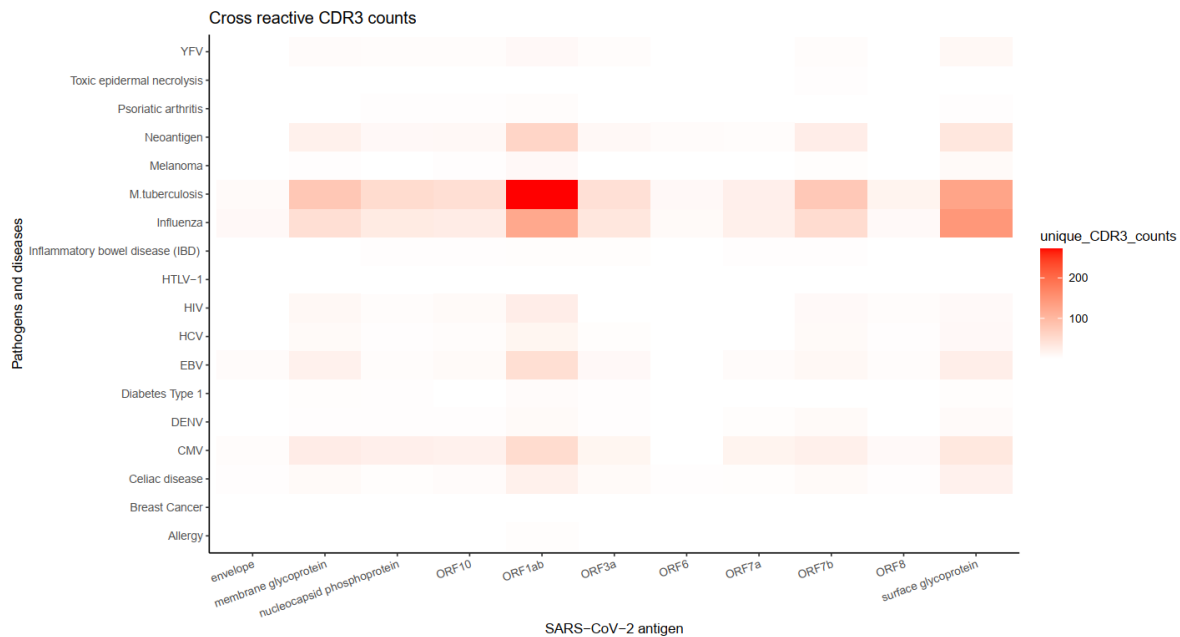
Επιπρόσθετα, για κάθε κλωνότυπο εκ των 6 πιο συχνών υπολογίστηκε η διακύμανση ως προς τις κλινικές ομάδες πραγματοποιώντας έλεγχο στατιστικής σημαντικότητας με εφαρμογή Fisher's exact test. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για τον 1^ο και τον 4^ο πιο κοινό κλωνότυπο (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Διακύμανση κλινικών ομάδων στις περιπτώσεις αντίγνωσης του 1^{ου} και 4^{ου} πιο κοινού κλωνοτύπου του MIRA dataset.

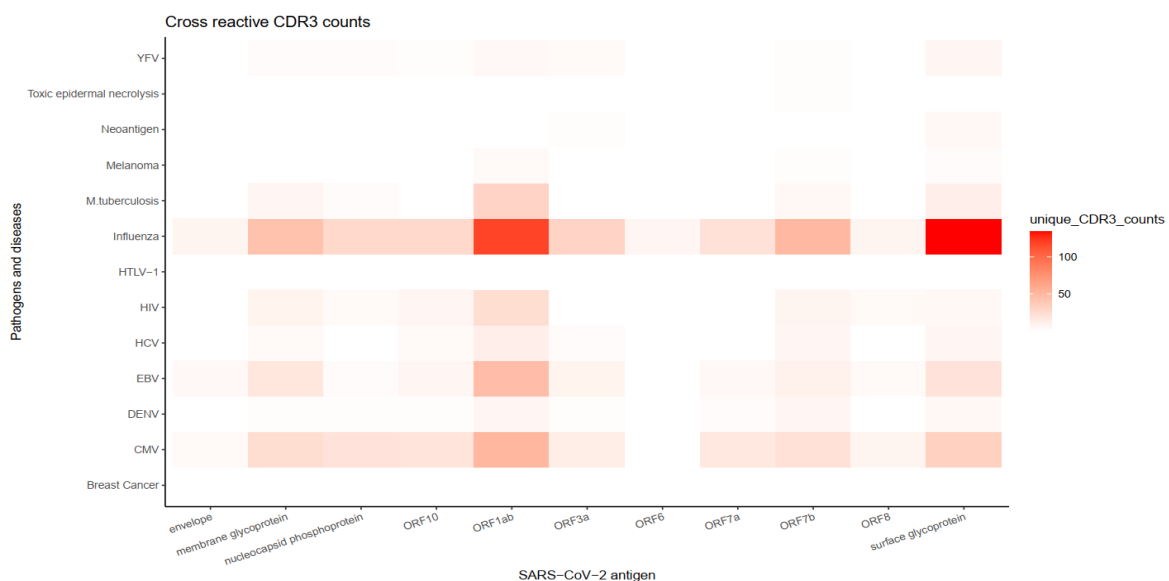
Ανάλυση φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας

Το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστηριότητας ανάμεσα στον SARS-CoV-2 και σε άλλα παθογόνα μελετήθηκε υπό το πρίσμα T κλωνοτύπων από τις βάσεις MIRA dataset, McPAS, TCR3d και VDJdb. Πιο συγκεκριμένα, ελέγχθηκε το ενδεχόμενο ύπαρξης κλωνοτύπων που αναγνωρίζουν αντιγόνα του SARS-CoV-2 στο MIRA dataset και ταυτόχρονα αναγνωρίζουν αντιγόνα σχετιζόμενα με άλλα παθογόνα ή παθολογικές καταστάσεις στις βάσεις δεδομένων McPAS, TCR3d και VDJdb. Πραγματοποιήθηκε ποσοτική ανάλυση υπολογίζοντας συγκεκριμένα τον αριθμό μοναδικών CDR3-συνδέσεων μεταξύ SARS-CoV-2 και άλλων παθογόνων ή νόσων. Μετρήθηκαν δηλαδή οι CDR3 αλληλουχίες που βρέθηκαν να εμπλέκονται στην ανοσιακή απάντηση του SARS-CoV-2 από τη μία και άλλων παθολογικών καταστάσεων από την άλλη (Εικόνα 14).



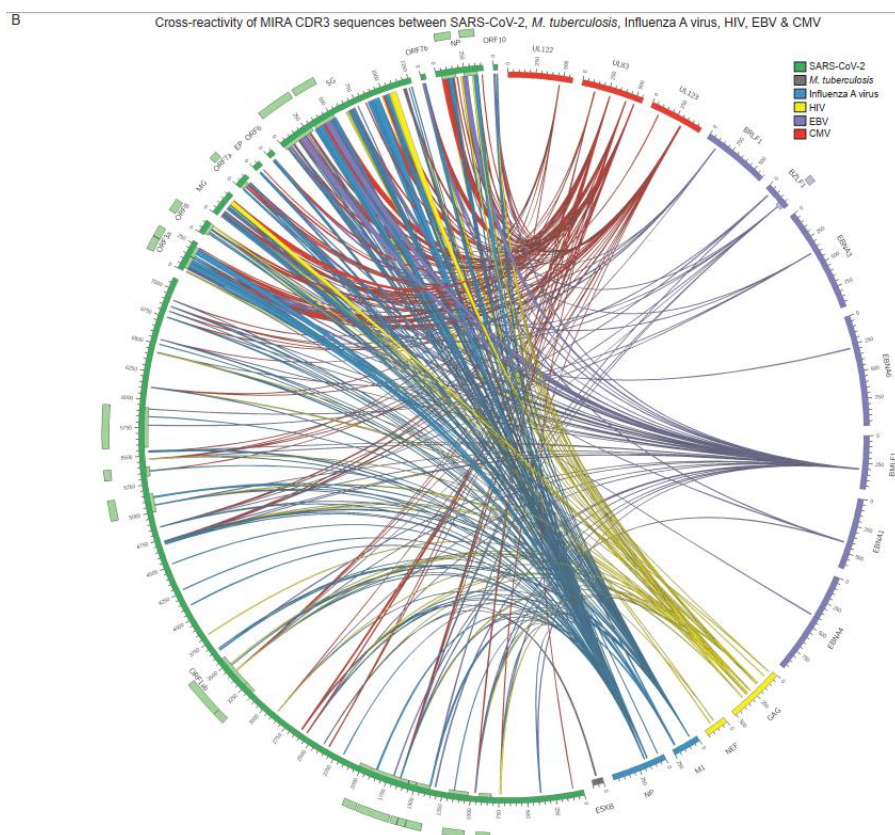
Εικόνα 14: Απεικόνιση μοναδικών CDR3 αλληλουχιών (cross reactive CDR3) οι οποίες πλαισιώνουν τις συνδέσεις αντιγόνων του SARS-CoV-2 και άλλων αντιγόνων.

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου μια συγκεκριμένη CDR3 αλληλουχία εμπλέκεται στην αναγνώριση επιτόπων από διαφορετικά αντιγόνα. Έτσι, ο αριθμός των συνδέσεων (διασταυρούμενης δραστηριότητας) μεταξύ του SARS-CoV-2 και άλλων παθογόνων ή νόσων δεν αντικατοπτρίζει τον αριθμό των μοναδικών CDR3 αλληλουχιών του MIRA dataset. Η ίδια προσέγγιση έγινε σε 2 επίπεδα ανάλυσης, στοχεύοντας όλες τις CDR3 αλληλουχίες και στοχεύοντας μόνο τις CDR3 αλληλουχίες που προέρχονται από CD4+ ή CD8+ T λεμφοκύτταρα, προκειμένου να ανιχνευθεί πιθανή λειτουργική συσχέτιση. Η προσέγγιση που αφορά σύγκριση μόνο για CDR3 αλληλουχίες προερχόμενες από CD8+ T λεμφοκύτταρα οπτικοποιείται στην Εικόνα 15.



Εικόνα 15: Απεικόνιση μοναδικών CDR3 αλληλουχιών (cross reactive CDR3) οι οποίες πλαισιώνουν τις συνδέσεις αντιγόνων του SARS-CoV-2 και άλλων αντιγόνων (CDR3 αλληλουχίες προερχόμενες από CD8+ T λεμφοκύτταρα)

Προκειμένου να αναγνωριστούν αντιγονικές περιοχές κρίσιμες για την αλληλεπίδραση με CDR3 αλληλουχίες διασταυρούμενης δραστηριότητας οι επίτοποι που αναγνωρίζονται στοιχήθηκαν (alignment) στις πρωτεΐνες των παθογόνων, σαν ένα πρώτο βήμα συσχέτισης των αντίστοιχων περιοχών. Οι συγκεκριμένες συνδέσεις οπτικοποιούνται στην Εικόνα 16 με circular plot.

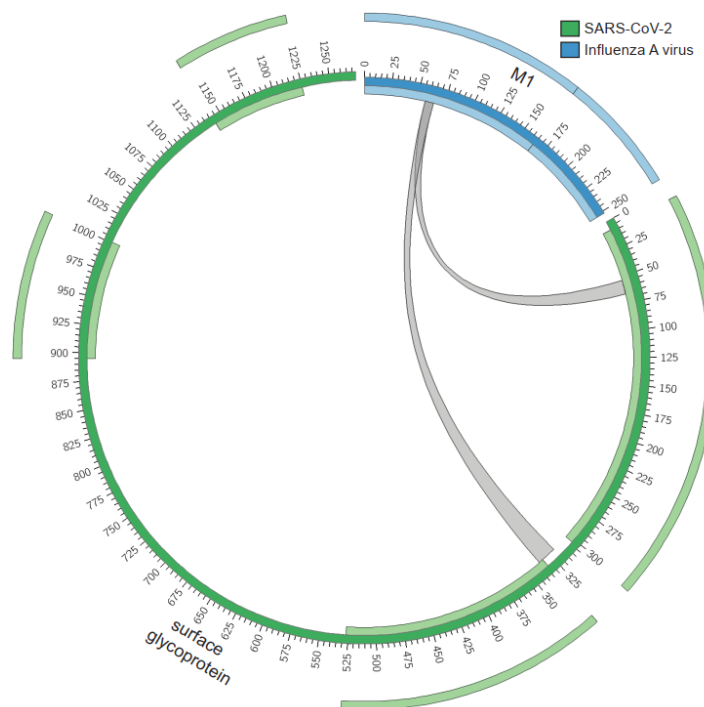


Εικόνα 16: Οπτικοποίηση του φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας ανάμεσα στον SARS-CoV-2 και άλλα παθογόνα.

Μέσα από την συγκεκριμένη εικόνα οπτικοποιείται το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστηριότητας. Πιο συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν τα παθογόνα που φάνηκε να περιγράφουν το συγκεκριμένο φαινόμενο σε μεγαλύτερο βαθμό (*M. tuberculosis*, Influenza virus (A subtype), CMV, EBV και HIV). Τα τόξα που απαρτίζουν κυκλικά το γράφημα αφορούν διαφορετικά αντιγόνα και είναι χρωματισμένα ανάλογα με το παθογόνο από το οποίο προέρχονται. Οι συνδέσεις μεταξύ συγκεκριμένων επιτόπων (στο εύρος των αντιγονικών περιοχών που παρίστανται) αφορούν CDR3 αλληλουχίες που διεκπεραιώνουν το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστηριότητας. Σε κάποιες περιπτώσεις παθογόνων (κυρίως στην περίπτωση από *M. tuberculosis*) οι επίτοποι που αναγνωρίζονται λείπουν από τις βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν και για αυτό οι αντίστοιχες συνδέσεις που απεικονίζονται είναι περιορισμένες.

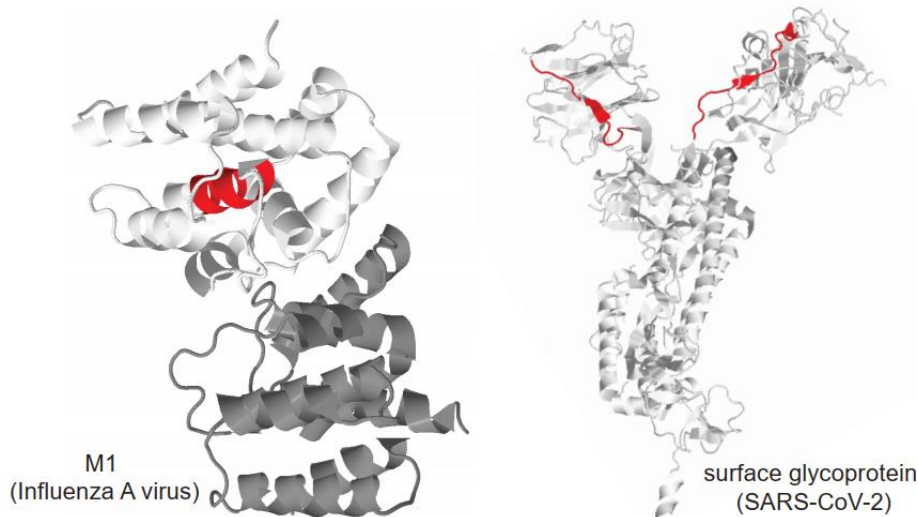
Η ίδια προσέγγιση πραγματοποιήθηκε με άλλο ένα circular plot αυτή τη φορά ειδικά για τον πιο κοινό κλώνο του MIRA dataset απεικονίζοντας το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστηριότητας που αφορά μεταξύ της Spike πρωτεΐνης του ιού SARS-CoV-2 και της M1 πρωτεΐνης του ιού Influenza (Εικόνα 17).

Cross-reactivity of most common MIRA TCR - SARS-CoV-2 & Influenza A virus



Εικόνα 17: Απεικόνιση του φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας του πιο κοινού κλωνοτύπου του MIRA dataset μεταξύ των ιών SARS-CoV-2 και Influenza

Προκειμένου να αναγνωριστούν οι υπομονάδες των αντιγονικών πρωτεϊνών που αναγνωρίζονται από κοινού χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Jaliview και μετά από ευθυγράμμιση (alignment) των επιτόπων που αναγνωρίζονται στις αντίστοιχες αντιγονικές πρωτεΐνες από όπου προέρχονται ακολούθησε οπτικοποίηση των συγκεκριμένων περιοχών σε 3D στερεοδιαμορφώσεις των σχετικών περιοχών. Επιπρόσθετα, για την δημιουργία των 3D στερεοδιαμορφώσεων χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από την βάση δεδομένων Protein Data Bank (PDB). Για την οπτικοποίηση της Spike πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα κρυσταλλογραφίας από τα πειράματα με κωδικό 1AA7 στην PDB (απεικόνιση των αλυσίδων A και B), ενώ για την πρωτεΐνη M1 χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα κρυσταλλογραφίας με κωδικό 6X29 από την PDB (απεικόνιση της αλυσίδας A) Οι περιοχές που αφορούν τους επιτόπους που αναγνωρίζονται από τον κλωνότυπο σημαίνονται με κόκκινο στην Εικόνα 18.



Εικόνα 18: Απεικόνιση των στερεοδιαμόρφωσης των M1 (Influenza) και Spike (SARS-CoV-2) όπως και των επιτόπων που αναγνωρίζονται από κοινού από τον πιο κοινό κλώνο τύπο του MIRA dataset

Επιπρόσθετα, αξίζει να αναφερθεί ότι οι δημόσιες βάσεις δεδομένων TCR (McPAS, TCR3d και VDJdb) περιλαμβάνουν πληροφορία προερχόμενη από CD4⁺ και CD8⁺ T λεμφοκύτταρα και τα δεδομένα χαρακτηρίζονται από τάση προς συγκεκριμένα παθογόνα λόγω περισσότερων αποτελεσμάτων ως προς τα αντίστοιχα πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, οι προαναφερόμενες βάσεις αφορούν 16,162 μοναδικές CDR3 αλληλουχίες σχετιζόμενες με *M. Tuberculosis* (14,992 CD4⁺ και 1183 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα), 3,639 με τον ιό Influenza (155 CD4⁺ και 3479 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα), 2,663 με τον ιό CMV (2658 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα), 1,583 με τον ιό HIV (350 CD4⁺ και 1,514 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα) και 1,437 με τον ιό EBV (1,334 CD8⁺ T λεμφοκύτταρα). Ο συνολικός αριθμός μοναδικών CDR3 αλληλουχιών δεν συμπίπτει πάντα με τις CD4⁺ και CD8⁺ υποκατηγορίες καθώς κάποιες αλληλουχίες φαίνεται να προέρχονται και από τις 2 ομάδες T λεμφοκυττάρων. Ακόμη, αν και για κάποιες αλληλουχίες δεν υπήρχε πληροφορία σχετικά με τον τύπο T λεμφοκυττάρου στις βάσεις δεδομένων, ο διαχωρισμός τους αντικατοπτρίζει σημαντική πληροφορία για ανοσιακή απάντηση στα αντίστοιχα παθογόνα που προσεγγίζονται στην μελέτη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μοριακή Στόχευση περιοχών ενδιαφέροντος στα γονίδια ACE2 και TMPRSS2

Οι δοκιμασίες ανίχνευσης Anti-S και Anti-N IgG και IgA AntiSARS-CoV-2 αντισωμάτων ήταν αρνητικές για όλους τους συμμετέχοντες της μελέτης όπως φαίνεται στον Πίνακα 1. Επιπρόσθετα, οι προαναφερόμενες δοκιμασίες όπως Anti-S μέτρηση της κυτταρικής ανοσίας μετρήθηκε για την συμμετέχοντα #4 μετά την δεύτερη επαφή της με θετικό κρούσμα και ήταν αρνητικές (επίπεδα anti-S IgG αντισωμάτων: 5,4 U/mL, με κατώφλι θετικότητας 50 U/mL και επίπεδα IFN-g: 65,38 mIU/mL, με κατώφλι θετικότητας 100 mIU/mL). Οι συμμετέχοντες #1 και #2 εμβολιάστηκαν έναντι του SARS-CoV-2 με Ad26.COVS.2 (Janssen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium) και BNT162b2 (Biotech, Mainz, Germany) αντίστοιχα. Ενάμισι και τέσσερις μήνες έπειτα του εμβολιασμού αντίστοιχα μετρήθηκε η Anti-S χυμική και κυτταρική ανοσία με αποτελέσματα 5915 U/mL και 443,2 U/mL αντίστοιχα. Για την συμμετέχουσα #4 το αποτέλεσμα στόχευσης Anti-S χυμικής ανοσίας είναι 5,4 AU/mL, ενώ το αποτέλεσμα στόχευσης της κυτταρικής ανοσίας είναι 65,38 mIU/mL. Δεν ανιχνεύθηκε κάποια παθογόνος γενετική βλάβη στις περιοχές ενδιαφέροντος των γονιδίων ACE2 και TMPRSS2 όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.

No	ACE2				TMPRSS2		
	Exon 1	Exon 16	Exon 17	Exon 6	Exon 9	Exon 10	Exon 13
1	wt	wt	wt	wt	rs2298659-Heter, rs73230068-Heter	wt	wt
2	wt	wt	wt	rs12329760- Homo	rs2298659-Heter	wt	wt
3	wt	wt	wt	rs12329760-Heter	rs2298659-Heter, rs17854725-Heter	wt	wt
4	wt	wt	wt	wt	rs17854725-Homo	wt	wt

Πίνακας 3: Αποτελέσματα μοριακής στόχευσης με PCR-Sanger στις περιοχές ενδιαφέροντος των γονιδίων ACE2 και TMPRSS2.

Συντομογραφίες: Heter, ετεροζυγωτία; Homo, ομοζυγωτία; wt, αγρίου τύπου

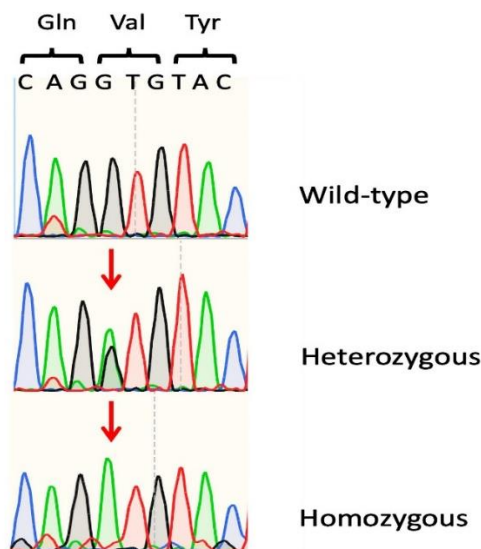
rs12329760: c.478G>A, p.Val160Met, allele frequency 0.244 (ExaC) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12329760>]

rs2298659: c.777C>T, p.Gly259=, allele frequency 0.259 (ExaC) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2298659>]

rs17854725: c.768T>C p.Ile256=, allele frequency 0.560 (ExaC) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs17854725>]

rs73230068: c.899+85C>G, allele frequency 0.035 (gnomAD-Genomes) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs73230068>]

Εντούτοις, ανιχνεύθηκε ο πολυμορφισμός rs12329760 σε ομοζυγωτία στην συμμετέχοντα #2 και σε ετεροζυγωτία στον συμμετέχοντα #3 (Πίνακας 3) Στην Εικόνα 19 οπτικοποιούνται τα αντίστοιχα αποτελέσματα από τα χρωματογράφημα Sanger sequencing.



Εικόνα 19: Ανίχνευση του πολυμορφισμού rs12329760 (c.478G>A, p.Val160Met)

Επιπρόσθετα, ανιχνεύθηκε ο συνώνυμος πολυμορφισμός rs2298659 για τον οποίο οι συμμετέχοντες #1, #2 και #3 ήταν ετερόζυγοι και ο συνώνυμος πολυμορφισμός rs17854725 για τον οποίο ο συμμετέχοντας #3 ήταν ετερόζυγος και η συμμετέχοντας #4 ομόζυγη. Ανιχνεύθηκε και ένας ιντρονικός πολυμορφισμός με κωδικό rs73230068 για τον οποίο ο συμμετέχοντας #1 ήταν ετερόζυγος.

Αποτελέσματα προσέγγισης μηχανικής μάθησης

Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενη διαδικασία (20 φορές) διαχωρισμού των δειγμάτων σε ομάδες εκπαίδευσης και δοκιμής. Σε κάθε διαχωρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι 5 αλγόριθμοι Gaussian Naive Bayes (GaussianNB), Decision Trees (DT), K-Nearest Neighbours (KNN), Random Forests (RF) και Support Vector Machines (SVM) για εκπαίδευση και δοκιμή.

Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός των μετρήσεων απόδοσης για κάθε ομάδα δοκιμών. Οι καλύτερες επιδόσεις παρατηρήθηκαν στον αλγόριθμο SVM, με διάμεση επίδοση τουλάχιστον 0,75 σε όλες τις μετρικές. Πιο συγκεκριμένα, ο αλγόριθμος SVM εμφανίζει 0,856 median balanced accuracy, 0,896 precision, 0,962 sensitivity, 0,75 specificity και 0,9 negative predictive value (NPV).

Η αξιολόγηση της σημαντικότητας κάθε χαρακτηριστικού αξιολογήθηκε μέσω εφαρμογής 50 επαναλαμβανόμενων τυχαίων διαφοροποιήσεων στις τιμές των χαρακτηριστικών για όλους τους αλγόριθμους. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9 τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά είναι τα αντιγόνα ORF7b, nucleocapsid phosphoprotein, ORF1ab, ORF10, ORF3a καθώς και membrane glycoprotein σε μικρότερο βαθμό. Αφού επιλέχθηκαν μόνο τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά για κάθε αλγόριθμο, επαναλήφθηκε η διαδικασία εκπαίδευσης και αξιολόγησης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα ελαφρώς

βελτιωμένη απόδοση για τους αλγορίθμους GaussianNB, KNN και SVM, αλλά όχι για τους αλγορίθμους DT και RF, όπως αναμενόταν, λαμβάνοντας υπόψη την έμφυτη ικανότητά τους να βασίζονται εύκολα μόνο σε σημαντικά χαρακτηριστικά.

Αποτελέσματα περιγραφικής ανάλυσης κλωνοτύπων του MIRA dataset

Οι κλωνότυποι του MIRA dataset παρουσιάζουν ετερογένεια στην συχνότητα και την μέση κλωνική επέκταση όπως οπτικοποιείται στην Εικόνα 11. Σε ένα γενικό πλαίσιο κλωνότυποι με σχετικά υψηλά επίπεδα συχνότητας εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα κλωνικής επέκτασης και αντίστροφα.

Η ανάλυση ακολούθως αφορά εστίαση στους 6 πιο κοινούς κλωνοτύπους (συχνότητα μεγαλύτερη του 11%) του MIRA dataset. Πιο συγκεκριμένα πρόκειται για τους κλωνοτύπους CASSIRSSYEQYF+V19-01+J02-07 (CD8+ T λεμφοκύτταρα στο MIRA), CASSLAGAYEQYF+TCRBV05-01+TCRBJ02-07 (CD8+), CASSLSAPQETQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-05 (CD8+), CASSLSSPQETQYF+TCRBV27-01+ TCRBJ02-05 (CD8+), CASSDRGPNQPQHF+TCRBV27-01+TCRBJ01-05 (CD8+) και CASSDRGPTDTQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-03 (CD8+), που αφορούν συχνότητες 23%, 15,04%, 13,27%, 12,38%, 11,5% και 11,5% των συνολικών συμμετεχόντων στο δείγμα του MIRA dataset αντίστοιχα (επισημαίνονται στην Εικόνα 11 με βέλη).

Η διακύμανση των επιπέδων κλωνικής επέκτασης των δειγμάτων αναλύθηκε μεταξύ των 2 κλινικών ομάδων (COVID-19 Convalescent/ Healthy) για τους 6 πιο κοινούς κλωνοτύπους χωρίς να αποκαλύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά βάσει του τεστ Mann Whitney. Η στατιστική σημαντικότητα δεν ήταν δυνατό να μετρηθεί για για κάποιους κλωνοτύπους (N/A στην Εικόνα 12). Σε διαφορετικό δείγμα (πείραμα) για κάθε κλωνότυπο η τιμή κλωνικής επέκτασης υπολογίστηκε διαιρώντας τον αριθμό που ανιχνεύθηκε ο κλωνότυπος προς τον συνολικό αριθμό κλωνοτύπων που ανιχνεύθηκαν. Επίσης, υπολογίστηκε η διακύμανση των κλινικών ομάδων στο υποσύνολο που αφορά κάθε κλωνότυπο (εκ των 6 πιο συχνών) σε σχέση με το συνολικό δείγμα του MIRA dataset εφαρμόζοντας Fisher's exact test. Στατιστικά σημαντική διαφορά εντοπίστηκε στην περίπτωση του 1^{ου} και του 4^{ου} πιο κοινού κλωνοτύπου. Συγκεκριμένα ο 1^{ος} πιο κοινός κλωνότυπος (CASSIRSSYEQYF+V19-01+J02-07) ανιχνεύθηκε σε ένα υποσύνολο του πληθυσμού όπου η πλειοψηφία χαρακτηρίζεται ως healthy, κλινική ομάδα με την οποία παρατηρείται στατιστικά σημαντική συσχέτιση (p -value = 0.0019). Ο 4^{ος} πιο κοινός κλωνότυπος (CASSLSSPQETQYF+V27-01+J02-05) ανιχνεύθηκε μόνο στην COVID-19-Convalescent κλινική ομάδα του MIRA dataset (στατιστικά σημαντική συσχέτιση, p -value = 0.038).

Επιπρόσθετα, για τους 6 πιο κοινούς κλωνότυπους του MIRA dataset αναγνωρίστηκαν τα αντιγόνα που στοχεύονται. Πιο συγκεκριμένα, ο CASSIRSSYEQYF+TCRBV19-01+TCRBJ02-07 αλληλοεπιδρά με surface glycoprotein και ORF1ab, ο CASSLAGAYEQYF+TCRBV05-01+TCRBJ02-07 με nucleocapsid phosphoprotein, ο CASSLSAPQETQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-05 με ORF1ab και envelope, ενώ ο CASSLSSPQETQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-05, ο CASSDRGPNQPQHF+TCRBV27-01+TCRBJ01-05 και ο CASSDRGPTDTQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-03 αναγνωρίζουν ORF1ab.

Αποτελέσματα διερεύνησης τους φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας των κλωνοτύπων του MIRA dataset

Χρησιμοποιήθηκαν οι δημόσιες βάσεις δεδομένων McPAS, TCR3d και VDJdb προκειμένου να ελεγχθεί αν οι κλωνότυποι του MIRA dataset εμπλέκονται στην ανοσιακή απάντηση έναντι και άλλων παθογόνων (πέραν του SARS-CoV-2) ή νόσων. Ο πιο κοινός κλωνότυπος του MIRA dataset (CASSIRSSYEQYF+TCRBV19-01+TCRBJ02-07) ανιχνεύθηκε να αλληλοεπιδρά με αντιγόνα των ιών Influenza και Epstein-Barr Virus (EBV). Η συσχέτιση του συγκεκριμένου κλωνοτύπου με την ανοσιακή απάντηση στον ιό Influenza έχει αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτη(91).

Σχετικά με την ανοσιακή απάντηση του πιο κοινού κλωνοτύπου έναντι των ιών SARS-CoV-2 και Influenza ανιχνεύθηκαν οι επίτοποι που αναγνωρίζονται στις 2 περιπτώσεις. Στην περίπτωση του SARS-CoV-2 όλοι οι επίτοποι που αναγνωρίζονται εκτός από έναν αποτελούν τμήματα της S πρωτεΐνης. Οι συγκεκριμένες περιοχές οπτικοποιούνται στην Εικόνα 18 με κόκκινο στην 3D δομή της πρωτεΐνης στο χώρο. Αντίστοιχα για την περίπτωση του ιού Influenza η επιτοπική αναγνώριση αφορά την πρωτεΐνη M1. Στην Εικόνα 18 οπτικοποιείται και η περιοχή της M1 που αλληλοεπιδρά με τον συγκεκριμένο κλωνότυπο. Οι υπόλοιποι 5 εκ των 6 πιο κοινών κλωνοτύπων (CASSLAGAYEQYF+TCRBV05-01+TCRBJ02-07, CASSLSAPQETQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-05, CASSLSSPQETQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-05, CASSDRGPNQPQHF+TCRBV27-01+TCRBJ01-05 και CASSDRGPTDTQYF+TCRBV27-01+TCRBJ02-03) δεν βρέθηκαν να αναγνωρίζουν αντιγόνα σχετιζόμενα με άλλα παθογόνα ή νόσους στις βάσεις δεδομένων McPAS, TCR3d και VDJdb.

Προκειμένου να διερευνηθεί πιθανή ύπαρξη διασταυρούμενης δραστηριότητας των κλωνοτύπων του MIRA dataset ανάμεσα σε SARS-CoV-2 και άλλα παθογόνα ή νόσους πραγματοποιήθηκε σχετικός έλεγχος σε μεγαλύτερη κλίμακα. Πιο συγκεκριμένα όλοι οι κλωνότυποι του MIRA dataset ελέγχθηκαν για την καταγραφή τους σε άλλες βάσεις δεδομένων (McPAS, TCR3d και VDJdb) και για την πιθανή αναγνώριση αντιγόνων σε άλλα παθογόνα και νόσους. Για αυτό το επίπεδο ανάλυσης χρησιμοποιήθηκαν οι CDR3 αλληλουχίες όλων των κλωνοτύπων του MIRA dataset και αναζητήθηκαν

στις άλλες δημόσιες βάσεις δεδομένων. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης ανάλυσης φαίνονται στην Εικόνα 14. Σε ένα γενικό πλαίσιο υπάρχουν CDR3 αλληλουχίες που αναγνωρίζουν επιτόπους από διαφορετικά αντιγόνα. Έτσι στην Εικόνα 14 ο συνολικός αριθμός CDR3 αλληλουχιών που συμμετέχουν στις εκάστοτε συνδέσεις που οπτικοποιούνται δεν αντικατοπτρίζει τον συνολικό αριθμό των μοναδικών CDR3 αλληλουχιών.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 14, η διερεύνηση πιθανής διασταυρούμενης δραστηριότητας αντικατοπτρίζει πληθώρα CDR3 αλληλουχιών που αναγνωρίζουν από τη μία επιτόπους που προέρχονται από τον ιό SARS-CoV-2 και από την άλλη σχετίζονται από την άλλη με την ανοσιακή απάντηση σε άλλα παθογόνα ή νόσους. Θα μπορούσαμε να ομαδοποιήσουμε τα επίπεδα διασταυρούμενης δραστηριότητας σε 3 διακριτές κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει το βακτήριο *M. tuberculosis* και ιούς όπως Influenza, Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barr (EBV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Hepatitis C Virus (HCV), Yellow Fever Virus (YFV), Dengue Virus (DENV) και Human T-lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1).

Από τις 2.136 CDR3 αλληλουχίες που είναι κοινές μεταξύ του MIRA dataset και των βάσεων δεδομένων McPAS, TCR3d και VDJdb (συνδέσεις πιθανής διασταυρούμενης δραστηριότητας στην Εικόνα 14) 1792 (83,9%) έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν επιτόπους προερχόμενους από τον SARS-CoV-2 και πλαισιώνουν την πρώτη κατηγορία.

Η δεύτερη κατηγορία αφορά κακοήθειες όπως Melanoma, Breast Cancer και Neoantigens. Περίπου 9,9% (211 από τις 2.136) των CDR3 αλληλουχιών (συνδέσεις πιθανής διασταυρούμενης δραστηριότητας στην Εικόνα 14) που είναι κοινές μεταξύ του MIRA dataset και των άλλων τριών δημόσιων βάσεων δεδομένων αφορούν την δεύτερη κατηγορία.

Η τρίτη κατηγορία αφορά παράγοντες που σχετίζονται με αυτό-ανοσία όπως Celiac Disease, Inflammatory Bowel Disease (IBD), Diabetes Type 1, Psoriatic Arthritis, Allergy και Toxic Epidermal Necrolysis. Η συγκεκριμένη κατηγορία αφορά το 6,2% (133 από τις 2.136) των CDR3 αλληλουχιών που είναι κοινές μεταξύ MIRA dataset και των άλλων δημόσιων βάσεων δεδομένων (συνδέσεις πιθανής διασταυρούμενης δραστηριότητας στην Εικόνα 14).

Τα υψηλότερα επίπεδα διασταυρούμενης δραστηριότητας ανιχνεύθηκαν ανάμεσα στον SARS-CoV-2 και το βακτήριο *M. tuberculosis* με 747 CDR3 αλληλουχίες να είναι ικανές να αναγνωρίσουν επιτόπους και στα δύο παθογόνα. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες αφορούν TCRs προερχόμενους κυρίως από CD8⁺ T λεμφοκύτταρα στην περίπτωση του MIRA dataset. Εντούτοις, στις άλλες δημόσιες βάσεις (McPAS, TCR3d και VDJdb) 680 από τις 747 CDR3 αλληλουχίες είναι καταγραμμένες να προέρχονται από CD4⁺ T λεμφοκύτταρα και 67 από CD8⁺ T λεμφοκύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, 271 μοναδικές CDR3 αλληλουχίες (240 από CD4⁺ και 31 από CD8⁺ T λεμφοκύτταρα) που αλληλοεπιδρούν με το αντιγόνο ORF1ab και 127 (113 από CD4⁺ και 14 από CD8⁺ T

λεμφοκύτταρα) που αλληλοεπιδρούν με το αντιγόνο surface glycoprotein φαίνεται να εμπλέκονται και στην ανοσιακή απάντηση έναντι *M. tuberculosis*.

Ο ιός Influenza εμφανίζει τον δεύτερο μεγαλύτερο αριθμό επιπέδων διασταυρούμενης δραστηριότητας (498 από τις 2.136 CDR3 αλληλουχίες). Παρατηρήθηκε ότι η πλειοψηφία των αλληλουχιών προέρχεται από CD8+ T λεμφοκύτταρα (478 από τις 498) σύμφωνα με τις δημόσιες βάσεις δεδομένων TCR σε αντίθεση με *M. tuberculosis*. Συγκεκριμένα, 144 μοναδικές CDR3 αλληλουχίες (1 προερχόμενη από CD4+ και 143 προερχόμενες από CD8+ T λεμφοκύτταρα) που αναγνωρίζουν αντιγόνα του ιού Influenza επίσης αναγνωρίζουν surface glycoprotein και 123 (5 προερχόμενες από CD4+ και 118 από CD8+ T λεμφοκύτταρα) αναγνωρίζουν ORF1ab.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 2 ετών ο αντίκτυπος της COVID-19 ήταν καταστροφικός τόσο για τομέα της υγείας όπως και για την κοινωνικο-οικονομική ζωή(92,93). Η παγκόσμια επιστημονική κοινότητα και φαρμακοβιομηχανία έχουν επικεντρωθεί στην διερεύνηση της βιολογίας του SARS-CoV-2, τις κλινικές εκδηλώσεις του όπως και στην έρευνα για θεραπευτικές προσεγγίσεις και εμβόλια έναντι της COVID-19. Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον εμφανίζει η ετερογένεια που εμφανίζεται σε επίπεδο ευαισθησία και σοβαρότητας της νόσου.

Έχει παρατηρηθεί ότι κάποια άτομα μολονότι εκτέθηκαν στον SARS-CoV-2 χωρίς μέτρα προστασίας δεν ανέπτυξαν συμπτωατική νόσο. Η πλειοψηφία τέτοιων περιπτώσεων αφορά λοίμωξη από τον ιό και ασυμπτωματική νόσο χωρίς να γίνεται αντιληπτή θετικότητα με αποτέλεσμα να είναι σε θέση να μεταδίδουν τον ιό έχοντας κοινωνικές συναναστροφές. Τέτοιες περιπτώσεις επιβεβαιώνονται από ανίχνευση anti-SARS-CoV-2 αντισωμάτων στο περιφερικό αίμα(7). Επιπρόσθετα κάποιες περιπτώσεις σαν αυτές που αφορούν τους συμμετέχοντες της μελέτης φαίνεται να μην μολύνθηκαν από τον ιό και οι ανοσοδοκιμασίες που πραγματοποιήθηκαν υποδηλώνουν την μη ύπαρξη παρελθοντικής νόσου από COVID-19. Τα συγκεκριμένα άτομα δεν εμφάνισαν ποτέ κάποιο θετικό μοριακό PCR έλεγχο ή έλεγχο ταχεία ανίχνευσης αντιγόνου (rapid test) του SARS-CoV-2 και επίσης σε δείγμα περιφερικό αίματος δεν ανιχνεύθηκαν αντισώματα κατά του ιού αν και εκτέθηκαν σε αυτόν για μεγάλο διάστημα χωρίς προστατευτικά μέτρα. Εντούτοις δύο από τους συμμετέχοντες ανέπτυξαν ανοσιακή απάντηση έναντι του ιού έπειτα εμβολιασμού. Έτσι προέκυψε η υπόθεση ότι ίσως οι συγκεκριμένοι συμμετέχοντες μπορούν να έχουν προστατευτικό πλεονέκτημα από τον ιό λόγω κάποιας βλάβης στους μηχανισμούς που αφορούν την είσοδό του στα κύτταρά τους. Έτσι, αναλύθηκαν γενετικά με μεθοδολογία PCR-αλληλούχιση κατά Sanger κρίσιμες για την είσοδο του ιού περιοχές (hot-spot regions) των γονιδίων *ACE2* και *TMPRSS2*, όμως δεν ανιχνεύθηκαν γενετικές βλάβες. Ενδιαφέρον εμφανίζει το γεγονός ότι ανιχνεύθηκε σε δύο συμμετέχοντες ο λειτουργικός πολυμορφισμός rs12329760 (c.478G>A, p.Val160Met) που χωροθετείται στο εξόνιο 6 του γονιδίου *TMPRSS2*.

Όπως προαναφέρθηκε ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός χαρακτηρίζεται ως επιβλαβής από τα βιοπληροφορικά εργαλεία PolyPhen-2 (“damaging”) και SIFT (“deleterious”) μέσα από σχετικές μελέτες οδηγώντας σε εξασθένιση της σταθερότητας της πρωτεΐνης(3,28). Σε σχετικές μελέτες για τον συγκεκριμένο παρανοηματικό (missense) πολυμορφισμό υποστηρίζεται ότι υφίσταται στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ευαισθησία στην COVID-19 και πιο ήπια νόσο, ιδίως για περιπτώσεις που αφορούν ομοζυγωτία(3,28,29). Στην συγκεκριμένη μελέτη ο πολυμορφισμός δεν ανιχνεύθηκε σε

όλους τους συμμετέχοντες, επομένως δεν φαίνεται να αποτελεί την «βλάβη-κλειδί» για την εξήγηση του φαινοτύπου των «άτρωτων» συμμετεχόντων στη μελέτη.

Επιπρόσθετα, κατά τη διάρκεια του περασμένου έτους παρατηρήθηκε μετατόπιση του ερευνητικού ενδιαφέροντος προς την διερεύνηση της ανοσιακής απάντησης των T λεμφοκυττάρων σε σχέση με την πρόγνωση και σοβαρότητα της COVID-19. Συνεργασία ανάμεσα στον ακαδημαϊκό χώρο και την βιομηχανία οδήγησε στην δημοσίευση ανοσολογικού τύπου βάσεων δεδομένων προερχόμενων από δείγματα χιλιάδων συμμετεχόντων όπως η βάση ImmunoACCESS[®](94). Πιο συγκεκριμένα, το MIRA dataset που αποτελεί μέρος της προαναφερόμενης βάσης παρέχει πληροφορία αλληλούχισης από χιλιάδες TCR κλωνοτύπους που μπορούν να αναγνωρίσουν ειδικά επιτόπους του SARS-CoV-2.

Χρησιμοποιήθηκε νέο μοντέλο μηχανικής μάθησης το οποίο αναπτύχθηκε για της ανάγκες της παρούσας μελέτης η προσέγγιση του οποίου αφορά ανάλυση του προφίλ των TCR και επισήμανση των αντιγόνων που στοχεύονται κατά την ανοσιακή απάντηση έναντι παθογόνων. Παρατηρήθηκε ότι η ανοσιακή απάντηση συγκεκριμένων αντιγόνων όπως nucleocapsid phosphoprotein είναι ικανή να διαχωρίσει άτομα που ήρθαν σε επαφή με τον ιό σε σχέση με υγιείς δότες, ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον είχε το γεγονός ότι η πρωτεΐνη surface glycoprotein (S) μέσω της ανοσιακής της απάντησης δεν ήταν ικανή να διαχωρίσει τις δύο ομάδες. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι μόρια TCR που αναγνωρίζουν επιτόπους από ORF1ab και την S πρωτεΐνη εμφανίζουν όμοια επίπεδα κλωνικής επέκτασης ανάμεσα στις 2 ομάδες (COVID-19-Convallescent και Healthy). Το συγκεκριμένο φαινόμενο θα μπορούσε να σχετίζεται με νόσηση που δεν ανιχνεύθηκε ή με κάποια πιθανή εκδήλωση διασταυρούμενης δραστηριότητας ανάμεσα στον SARS-CoV-2 και κάποιο άλλο παθογόνο. Προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο αυτή η υπόθεση χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από άλλες δημόσιες βάσεις TCR και οι κλωνοτύποι που στοχεύουν αντιγόνα του SARS-CoV-2 μελετήθηκαν περεταίρω ώστε να διαλευκανθεί αν αναγνωρίζουν αντιγόνα προερχόμενα από άλλα παθογόνα.

Η ανάλυση βασίστηκε στην προσέγγιση της CDR3 αλληλουχίας της β αλυσού που αφορά τα υψηλότερα επίπεδα ποικιλομορφίας του TCR και σχετίζεται άμεσα με την αντιγονική αναγνώριση. Συγκεκριμένα, αλληλουχίες CDR3 της β αλυσού από το MIRA dataset αναζητήθηκαν στις δημόσιες βάσεις TCR McPAS, TCR3d και VDJdb. Τα αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη πιθανού φαινομένου διασταυρούμενης δραστηριότητας ανάμεσα σε αντιγόνα του SARS-CoV-2 και αντιγόνα σχετιζόμενα με άλλα παθογόνα ή νόσους που μπορούν να καταταχτούν σε 3 κατηγορίες:

- α) *M. tuberculosis*, και ιοί όπως Influenza, CMV, EBV και HIV
- β) κακοήθειες
- γ) αυτοάνοσα νοσήματα

Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η πλειοψηφία των CDR3 αλληλουχιών που στοχεύουν αντιγόνα της α κατηγορίας προέρχονται από TCR CD8⁺ T λεμφοκυττάρων σύμφωνα με τις βάσεις McPAS, TCR3d

και VDJdb με το βακτήριο *M. tuberculosis* να αποτελεί την εξαίρεση. Το εμβόλιο Bacille Calmette-Guérin (BCG) έναντι *M. tuberculosis* αναφέρεται στη βιβλιογραφία να σχετίζεται με την ανοσιακή απάντηση CD4⁺ T λεμφοκυττάρων(95). Σε αντίθεση με την κατηγορία α οι CDR3 αλληλουχίες που αφορούν τις κατηγορίες β και γ σχετίζονται κυρίως με CD4⁺ T λεμφοκύτταρα.

Το βακτήριο *M. tuberculosis* φάνηκε να εμφανίζει τα υψηλότερα επίπεδα διασταυρούμενης δραστηριότητας με τον SARS-CoV-2. Σε χώρες όπου εφαρμόζεται εμβολιασμός με το σκεύασμα BCG έχουν καταγραφεί χαμηλότερα επίπεδα από θετικά κρούσματα COVID-19 όπως και μικρότερος αριθμός θανάτων από τη νόσο(96–98). Μελέτη σχετικά με το συγκεκριμένο εμβόλιο υποστηρίζει ότι παρατηρείται 10,4% μείωση στη θνητότητα της COVID-19 για κάθε 10% αύξηση εμβολιαστικής κάλυψης με BCG(99).

Ο ιός Influenza εμφανίζει τον δεύτερο μεγαλύτερο αριθμό CDR3 αλληλουχιών που πιθανά αφορούν το φαινόμενο διασταυρούμενης δραστηριότητας σε σχέση με τον SARS-CoV-2. Η συγκεκριμένη παρατήρηση θα μπορούσε να οφείλεται στο εποχιακό εμβόλιο της γρίπης ή και στο γεγονός ότι πρόκειται για ένα ιό στον οποίο εκτίθεται μεγάλο μέρος του πληθυσμού κάθε χρόνο. Ο ρόλος της προστατευτικής ανοσίας που επάγεται από το πολυδύναμο εμβόλιο της γρίπης έναντι της COVID-19 έχει αναλυθεί στο παρελθόν(100–102). Αν και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση κάποιες βασικές θεωρίες που εξηγούν το συγκεκριμένο φαινόμενο είναι οι εξής. Η πρώτη θεωρία βασίζεται στην μοριακή μίμηση που οδηγεί σε κλωνική ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό λεμφοκυττάρων(103). Ανάλογα με τα HLA γονίδια (MHC στον άνθρωπο) ενός ατόμου συγκεκριμένοι επίτοποι δύναται να αναγνωριστούν και να πυροδοτήσουν ανοσιακή απάντηση. Μια άλλη θεωρία σχετίζεται με το εμβόλιο της γρίπης το οποίο θα μπορούσε να δρα σαν μη ειδικό διεγερτικό την ανοσιακής απάντησης έναντι της COVID-19(104).

Με ενδιαφέρον παρατηρήθηκε ότι υπάρχουν CD4⁺ and CD8⁺ T λεμφοκύτταρα που έχουν κοινή CDR3 αλληλουχία στην β άλυσσο του TCR. Αντίστοιχο φαινόμενο παρατηρήθηκε και όταν συγκρίθηκαν οι CDR3 αλληλουχίες του MIRA dataset με αλληλουχίες από άλλες δημόσιες βάσεις δεδομένων (McPAS, TCR3d και VDJdb). Υπάρχουν TCRs που προέρχονται από CD8⁺ T λεμφοκύτταρα στο MIRA dataset οι οποίοι μοιράζονται την ίδια CDR3 αλληλουχία με TCRs που προέρχονται από CD4⁺ T λεμφοκύτταρα στις άλλες βάσεις δεδομένων. Εντούτοις, το συγκεκριμένο φαινόμενο δεν έχει διαλευκανθεί ακόμη και στην βιβλιογραφία δεν βρέθηκε κάποια μελέτη που να το εξηγεί.

Συμπερασματικά, η μοριακή προσέγγιση που πραγματοποιήθηκε ώστε να εξηγηθεί το ενδιαφέρον φαινόμενο εμφάνισης ατόμων που δεν μολύνθηκαν από τον SARS-CoV-2 αν και εκτέθηκαν στον ιό χωρίς μέτρα προφύλαξης δεν διαλεύκανε το αίτιο της συγκεκριμένης κατάστασης. Σύμφωνα με την μελέτη που πραγματοποιήθηκε τέτοιες περιπτώσεις δεν σχετίζονται άμεσα με κάποια γενετική βλάβη στις κομβικές για την είσοδο του ιού σε κύτταρα ξενιστή περιοχές των ACE2 και TMPRSS2. Η βιο-

πληροφορική προσέγγιση του φαινομένου διασταυρούμενης δραστικότητας οδήγησε σε ενδιαφέρουσες παρατηρήσεις αναδεικνύοντας συγκεκριμένες CDR3 αλληλουχίες που μπορούν να αναγνωρίζουν από κοινού αντιγόνα του SARS-CoV-2 και άλλων παθογόνων όπως ο ιός Influenza και το βακτήριο *M. tuberculosis*. Περαιτέρω διερεύνηση στοχεύοντας τα γονίδια HLA θα μπορούσε να δώσει σημαντική πληροφορία ισχυροποιώντας την υπόθεση ύπαρξης διασταυρούμενης δραστικότητας στους TCR που μοιράζονται τις συγκεκριμένες CDR3 αλληλουχίες. Τέλος, επόμενο στόχο σε συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης, αποτελεί η στόχευση των κλωνοτύπων του MIRA dataset που χαρακτηρίζονται από το φαινόμενο της διασταυρούμενης δραστικότητας (όπως ο πιο κοινός κλωνότυπος CASSIRSSYEQYF+V19-01+J02-07) στο γενετικό υλικό δειγμάτων από τους τέσσερις συμμετέχοντες της παρούσας μελέτης προκειμένου να ελεγχθεί αν υφίστανται στο ρεπερτόριό τους και κατ' επέκταση αν αποτελούν το αίτιο πίσω από τον ενδιαφέρων φαινότυπό τους.

ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. Vol. 382, *New England Journal of Medicine*. 2020. p. 727–33.
2. Brant AC, Tian W, Majerciak V, Yang W, Zheng ZM. SARS-CoV-2: from its discovery to genome structure, transcription, and replication. *Cell Biosci* [Internet]. 2021;11(1):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00643-z>
3. Vargas-Alarcón G, Posadas-Sánchez R, Ramírez-Bello J. Variability in genes related to SARS-CoV-2 entry into host cells (ACE2, TMPRSS2, TMPRSS11A, ELANE, and CTSL) and its potential use in association studies. *Life Sci* [Internet]. 2020;260(June):118313. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118313>
4. Whelan J, Editors MWM, Walker JM. *Mitochondria IN Series Editor*. 2015. 1–23 p.
5. Jackson CB, Farzan M, Chen B, Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. Vol. 23, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022. p. 3–20.
6. Habas K, Nganwuchu C, Shahzad F, Gopalan R, Haque M, Rahman S, et al. Resolution of coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2020;18(12):1201–11. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1797487>
7. Boyton RJ, Altmann DM. The immunology of asymptomatic SARS-CoV-2 infection: what are the key questions? *Nat Rev Immunol*. 2021;21(12):762–8.
8. Horowitz JE, Kosmicki JA, Damask A, Sharma D, Roberts GHL, Justice AE, et al. Genome-wide analysis provides genetic evidence that ACE2 influences COVID-19 risk and yields risk scores associated with severe disease. *Nat Genet*. 2022;54(4):382–92.
9. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, Amin OE, Chandran A, Shaw E, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature*. 2021.
10. JHCRC. John Hopkins Coronavirus Resource Center. Johns Hopkins University & Medicine. [Internet]. [cited 2022 May 31]. Available from: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>
11. Wang W, McKinnie SMK, Farhan M, Paul M, McDonald T, McLean B, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Metabolizes and Partially Inactivates Pyr-Apelin-13 and Apelin-17: Physiological Effects in the Cardiovascular System. *Hypertension*. 2016;68(2):365–77.
12. Li M, Li L, Zhang Y, Wang X. An Investigation of the Expression of 2019 Novel Coronavirus Cell Receptor Gene ACE2 in a Wide Variety of Human Tissues. *Infect Dis Poverty* [Internet]. 2020;9(1)(45):1–7. Available from: <https://doi.org/>
13. Krishnamurthy S, Lockey RF, Kolliputi N. Soluble ACE2 as a potential therapy for COVID-19. Vol. 320, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2021. p. C279–81.
14. Scialo F, Daniele A, Amato F, Pastore L, Matera MG, Cazzola M, et al. ACE2: The Major Cell Entry Receptor for SARS-CoV-2. *Lung* [Internet]. 2020;198(6):867–77. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00408-020-00408-4>
15. Shang J, Ye G, Shi K, Wan Y, Luo C, Aihara H, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature* [Internet]. 2020;581(7807):221–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
16. Liu Y, He H, Huang H. The role and significance of angiotensin-converting enzyme 2 peptides in the treatment of coronavirus disease 2019. *J Clin Lab Anal*. 2021;35(6):1–5.
17. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *J Virol*. 2014;88(2):1293–307.
18. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271–280.e8.
19. Glowacka I, Bertram S, Müller MA, Allen P, Soilleux E, Pfefferle S, et al. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for

- Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *J Virol*. 2011;85(9):4122–34.
20. Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, et al. TMPRSS2 Activates the Human Coronavirus 229E for Cathepsin-Independent Host Cell Entry and Is Expressed in Viral Target Cells in the Respiratory Epithelium. *J Virol*. 2013;87(11):6150–60.
 21. Abe M, Tahara M, Sakai K, Yamaguchi H, Kanou K, Shirato K, et al. TMPRSS2 Is an Activating Protease for Respiratory Parainfluenza Viruses. *J Virol*. 2013;87(21):11930–5.
 22. Gkogkou E, Barnasas G, Vougas K, Trougakos IP. Expression profiling meta-analysis of ACE2 and TMPRSS2, the putative anti-inflammatory receptor and priming protease of SARS-CoV-2 in human cells, and identification of putative modulators. *Redox Biol* [Internet]. 2020;36:101615. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101615>
 23. Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient Activation of the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein by the Transmembrane Protease TMPRSS2. *J Virol*. 2010;84(24):12658–64.
 24. Kawase M, Shirato K, van der Hoek L, Taguchi F, Matsuyama S. Simultaneous Treatment of Human Bronchial Epithelial Cells with Serine and Cysteine Protease Inhibitors Prevents Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Entry. *J Virol*. 2012;86(12):6537–45.
 25. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pohlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 Differentially and Only Proteolysis by TMPRSS2 Augments Entry Driven by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein. *J Virol*. 2014;88(2):1293–307.
 26. Buchrieser J, Dufloo J, Hubert M, Monel B, Planas D, Rajah MM, et al. Syncytia formation by SARS-CoV-2-infected cells. *EMBO J*. 2020;39(23).
 27. Singh HO, Choudhari R, Nema V, Khan AA. ACE2 and TMPRSS2 polymorphisms in various diseases with special reference to its impact on COVID-19 disease. *Microb Pathog* [Internet]. 2021;150(December 2020):104621. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104621>
 28. Paniri A, Hosseini MM, Akhavan-Niaki H. First comprehensive computational analysis of functional consequences of TMPRSS2 SNPs in susceptibility to SARS-CoV-2 among different populations. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2020;39(10):1–18. Available from: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1767690>
 29. Ishikawa T, Imada K. Adult T cell leukemia/lymphoma. *Lymphoid Neoplasms 3ed*. 2010;1384–99.
 30. Mariuzza RA, Agnihotri P, Orban J. The structural basis of T-cell receptor (TCR) activation: An enduring enigma. *J Biol Chem* [Internet]. 2020;295(4):914–25. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49904-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49904-2)
 31. Zareie P, Farenc C, La Gruta NL. MHC restriction: Where are we now? *Viral Immunol*. 2020;33(3):179–87.
 32. Théry C, Amigorena S. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(1):45–51.
 33. Ruterbusch M, Pruner KB, Shehata L, Pepper M. In Vivo CD4+ T Cell Differentiation and Function: Revisiting the Th1/Th2 Paradigm. *Annu Rev Immunol*. 2020;38:705–25.
 34. Reina-Campos M, Scharping NE, Goldrath AW. CD8+ T cell metabolism in infection and cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2021;21(11):718–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-021-00537-8>
 35. Shah K, Al-Haidari A, Sun J, Kazi JU. T cell receptor (TCR) signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1).
 36. Ebert A, Hill L, Busslinger M. Spatial Regulation of V-(D)J Recombination at Antigen Receptor Loci [Internet]. 1st ed. Vol. 128, *Advances in Immunology*. Elsevier Inc.; 2015. 93–121 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ai.2015.07.006>
 37. Immunogenetics I, Resources I. Nomenclature of the Human T Cell Receptor Genes HUMAN T CELL RECEPTOR LOCI TRA Locus A.10.1 Abbreviations and Useful Data. 2000;1–23.

Available from: <http://imgt>.

38. Nishihara T, Nagawa F, Imai T, Sakano H. RAG-heptamer interaction in the synaptic complex is a crucial biochemical checkpoint for the 12/23 recombination rule. *J Biol Chem* [Internet]. 2008;283(8):4877–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M709890200>
39. Sarac I, Hollenstein M. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase in the Synthesis and Modification of Nucleic Acids. *ChemBioChem*. 2019;20(7):860–71.
40. Pai JA, Satpathy AT. High-throughput and single-cell T cell receptor sequencing technologies. *Nat Methods* [Internet]. 2021;18(8):881–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-021-01201-8>
41. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM. The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. *EMBO J*. 1988;7(12):3745–55.
42. Cinelli M. Analysis of murine CDR3 β repertoires using machine learning techniques. 2018;(January).
43. Wu LC, Tuot DS, Lyons DS, Garcia C, Davis MM. Two-step binding mechanism for T-cell receptor recognition of peptide-MHC. *Nature*. 2002;418(6897):552–6.
44. Hennecke J. Structure of a covalently stabilized complex of a human alphabeta T-cell receptor, influenza HA peptide and MHC class II molecule, HLA-DR1. *EMBO J*. 2000;19(21):5611–24.
45. Reinherz EL, Tan K, Tang L, Kern P, Liu JH, Xiong Y, et al. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* (80-). 1999;286(5446):1913–21.
46. Ding YH, Smith KJ, Garboczi DN, Utz U, Biddison WE, Wiley DC. Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA- A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity*. 1998;8(4):403–11.
47. Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J, et al. Deconstructing the peptide-MHC specificity of t cell recognition. *Cell*. 2014;157(5):1073–87.
48. Cukalac T, Kan WT, Dash P, Guan J, Quinn KM, Gras S, et al. Paired TCR $\alpha\beta$ analysis of virus-specific CD8⁺ T cells exposes diversity in a previously defined “Narrow” repertoire. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(9):804–14.
49. Newell EW, Ely LK, Kruse AC, Reay PA, Rodriguez SN, Lin AE, et al. Structural Basis of Specificity and Cross-Reactivity in T Cell Receptors Specific for Cytochrome c –I-E k . *J Immunol*. 2011;186(10):5823–32.
50. Regner M. Cross-reactivity in T-cell antigen recognition. *Immunol Cell Biol*. 2001;79(2):91–100.
51. Mazza C, Auphan-Anezin N, Gregoire C, Guimezanes A, Kellenberger C, Roussel A, et al. How much can a T-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides? *EMBO J*. 2007;26(7):1972–83.
52. Colf LA, Bankovich AJ, Hanick NA, Bowerman NA, Jones LL, Kranz DMM, et al. How a Single T Cell Receptor Recognizes Both Self and Foreign MHC. *Cell*. 2007;129(1):135–46.
53. Nelson RW, Beisang D, Tubo NJ, Dileepan T, Wiesner DL, Nielsen K, et al. T Cell Receptor Cross-Reactivity between Similar Foreign and Self Peptides Influences Naive Cell Population Size and Autoimmunity. *Immunity*. 2015;42(1):95–107.
54. Hennecke J, Wiley DC. Structure of a complex of the human $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR) HA1.7, Influenza hemagglutinin peptide, and major histocompatibility complex class II molecule, HLA-DR4 (DRA*0101 and DRBI*0401): Insight into TCR cross-restriction and alloreactivity. *J Exp Med*. 2002;195(5):571–81.
55. Cole DK, Bulek AM, Dolton G, Schauenberg AJ, Szomolay B, Rittase W, et al. Hotspot autoimmune T cell receptor binding underlies pathogen and insulin peptide cross-reactivity. *J Clin Invest*. 2016;126(6):2191–204.
56. Welsh RM, Che JW, Brehm MA, Selin LK. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev*. 2010;235(1):244–66.
57. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. {T} cell responses: naive to memory and everything in between. *Adv Physiol Educ*. 2013;37(4):273–83.

58. Bangs SC, Baban D, Cattan HJ, Li CK-F, McMichael AJ, Xu X-N. Human {CD4+} memory {T} cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis. *J Immunol.* 2009;182(4):1962–71.
59. Selin LK, Varga SM, Wong IC, Welsh RM. Protective heterologous antiviral immunity and enhanced immunopathogenesis mediated by memory {T} cell populations. *J Exp Med.* 1998;188(9):1705–15.
60. Urbani S, Amadei B, Fiscaro P, Pilli M, Missale G, Bertoletti A, et al. Heterologous {T} cell immunity in severe hepatitis {C} virus infection. *J Exp Med.* 2005;201(5):675–80.
61. Sharma S, Thomas PG. The two faces of heterologous immunity: protection or immunopathology. *J Leukoc Biol.* 2014;95(3):405–16.
62. Minervina AA, Komech EA, Titov A, Bensouda Koraichi M, Rosati E, Mamedov IZ, et al. Longitudinal high-throughput {TCR} repertoire profiling reveals the dynamics of T-cell memory formation after mild {COVID-19} infection. *Elife.* 2021;10.
63. Hanna SJ, Codd AS, Gea-Mallorqui E, Scourfield DO, Richter FC, Ladell K, et al. {T} cell phenotypes in {COVID-19} - a living review. *Oxf Open Immunol.* 2020;2(1).
64. Shomuradova AS, Vagida MS, Sheetikov SA, Zornikova K V, Kiryukhin D, Titov A, et al. {SARS-CoV-2} Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human {T} Cell Receptors. *Immunity.* 2020;53(6):1245--1257.e5.
65. Chang C-M, Feng P-H, Wu T-H, Alachkar H, Lee K-Y, Chang W-C. Profiling of {T} Cell Repertoire in {SARS-CoV-2-Infected} {COVID-19} Patients Between Mild Disease and Pneumonia. *J Clin Immunol.* 2021;41(6):1131–45.
66. Li L, Chen Q, Han X, Shen M, Hu C, Chen S, et al. {T} Cell Immunity Evaluation and Immunodominant Epitope {T} Cell Receptor Identification of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Spike Glycoprotein in {COVID-19} Convalescent Patients. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:696662.
67. Wang P, Jin X, Zhou W, Luo M, Xu Z, Xu C, et al. Comprehensive analysis of {TCR} repertoire in {COVID-19} using single cell sequencing. *Genomics.* 2021;113(2):456–62.
68. Nolan S, Vignali M, Klinger M, Dines JN, Kaplan IM, Svejnoha E, et al. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCR β) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. *Res Sq [Internet].* 2020;1–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32793896> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC7418738>
69. Gittelman RM, Lavezzo E, Snyder TM, Zahid HJ, Elyanow R, Dalai S, et al. Diagnosis and tracking of past {SARS-CoV-2} infection in a large study of Vo'. Italy through T-cell Recept Seq medRxiv. 2020;9:2020.
70. Channappanavar R, Fett C, Zhao J, Meyerholz DK, Perlman S. Virus-specific memory {CD8} {T} cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. *J Virol.* 2014;88(19):11034–44.
71. Zhao J, Alshukairi AN, Baharoon SA, Ahmed WA, Bokhari AA, Nehdi AM, et al. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T-cell responses. *Sci Immunol.* 2017;2(14).
72. Thieme C, Anft M, Paniskaki K, Blázquez Navarro A, Doevelaar A, Seibert FS, et al. The {SARS-COV-2} {T-Cell} Immunity is Directed Against the Spike, Membrane, and Nucleocapsid Protein and Associated with {COVID} 19 Severity. 2020.
73. Gallais F, Velay A, Wendling MJ, Nazon C, Partisani M, Sibia J, et al. Intrafamilial exposure to {SARS-CoV-2} induces cellular immune response without seroconversion. medRxiv 2020.06. 21.20132449 [Preprint]. 22 June 2020.
74. Pinto D, Park YJ, Beltramello M, Walls AC, Tortorici MA, Bianchi S, et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody. *Nature [Internet].* 2020;583(7815):290–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2349-y>
75. Rydyznski Moderbacher C, Ramirez SI, Dan JM, Grifoni A, Hastie KM, Weiskopf D, et al.

- Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity. *Cell* [Internet]. 2020;183(4):996-1012.e19. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.038>
76. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, Strålin K, Gorin JB, Olsson A, et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. *Cell*. 2020;183(1):158-168.e14.
 77. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, Tham CYL, Hafezi M, Chia A, et al. {SARS-CoV-2-specific} {T} cell immunity in cases of {COVID-19} and {SARS}, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584(7821):457–62.
 78. Mateus J, Grifoni A, Tarke A, Sidney J, Ramirez SI, Dan JM, et al. Selective and cross-reactive {SARS-CoV-2} {T} cell epitopes in unexposed humans. *Science (80-)*. 2020;370(6512):89–94.
 79. Sette A, Crotty S. Pre-existing immunity to {SARS-CoV-2}: the knowns and unknowns. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(8):457–8.
 80. Braun J, Loyal L, Frentsch M, Wendisch D, Georg P, Kurth F, et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature* [Internet]. 2020;587(7833):270–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
 81. Macdonald WA, Chen Z, Gras S, Archbold JK, Tynan FE, Clements CS, et al. {T} cell allorecognition via molecular mimicry. *Immunity*. 2009;31(6):897–908.
 82. Wooldridge L, Ekeruche-Makinde J, van den Berg HA, Skowera A, Miles JJ, Tan MP, et al. A single autoimmune {T} cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J Biol Chem*. 2012;287(2):1168–77.
 83. Christen U, Edelmann KH, McGavern DB, Wolfe T, Coon B, Teague MK, et al. A viral epitope that mimics a self antigen can accelerate but not initiate autoimmune diabetes. *J Clin Invest*. 2004;114(9):1290–8.
 84. Speletas M, Kyritsi MA, Vontas A, Theodoridou A, Chrysanthidis T, Hatzianastasiou S, et al. Evaluation of Two Chemiluminescent and Three ELISA Immunoassays for the Detection of SARS-CoV-2 IgG Antibodies: Implications for Disease Diagnosis and Patients' Management. *Front Immunol*. 2020;11(December):1–9.
 85. Speletas M, Voulgaridi I, Sarrou S, Dadouli A, Mouchtouri VA, Nikoulis DJ, et al. Intensity and Dynamics of Anti-SARS-CoV-2 Immune Responses after BNT162b2 mRNA Vaccination: Implications for Public Health Vaccination Strategies. Vol. 10, *Vaccines*. 2022.
 86. Klinger M, Pepin F, Wilkins J, Asbury T, Wittkop T, Zheng J, et al. Multiplex identification of antigen-specific T cell receptors using a combination of immune assays and immune receptor sequencing. *PLoS One*. 2015;10(10):1–21.
 87. Tickotsky N, Sagiv T, Prilusky J, Shifrut E, Friedman N. McPAS-TCR: A manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences. *Bioinformatics*. 2017;33(18):2924–9.
 88. Gowthaman R, Pierce BG. TCR3d: The T cell receptor structural repertoire database. *Bioinformatics*. 2019;35(24):5323–5.
 89. Bagaev D V., Vroomans RMA, Samir J, Stervbo U, Rius C, Dolton G, et al. VDJdb in 2019: Database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D1057–62.
 90. Warr GW, Clem LW, Söderhäll K. The international imMunoGeneTics database IMGT. *Dev Comp Immunol*. 2003;27(1):1.
 91. Sant S, Grzelak L, Wang Z, Pizzolla A, Koutsakos M, Crowe J, et al. {Single-Cell} Approach to {Influenza-Specific} {CD8+} {T} Cell Receptor Repertoires Across Different Age Groups, Tissues, and Following Influenza Virus Infection. *Front Immunol*. 2018;9:1453.
 92. Kaye AD, Okeagu CN, Pham AD, Silva RA, Hurley JJ, Arron BL, et al. Economic impact of {COVID-19} pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives. *Best Pr Res Clin Anaesthesiol*. 2021;35(3):293–306.
 93. Nundy S, Ghosh A, Mesloub A, Albaqawy GA, Alnaim MM. Impact of {COVID-19}

- pandemic on socio-economic, energy-environment and transport sector globally and sustainable development goal (SDG). *J Clean Prod.* 2021;312:127705.
94. Nolan S, Vignali M, Klinger M, Dines JN, Kaplan IM, Svejnoha E, et al. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCR β) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2. *Res Sq.* 2020;
 95. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Rev.* 2015;264(1):74–87.
 96. Miller A, Reandelar MJ, Fasciglione K, Roumenova V, Li Y, Otazu GH. Correlation between universal BCG vaccination policy and reduced mortality for COVID-19. *bioRxiv.* 2020.
 97. Berg MK, Yu Q, Salvador CE, Melani I, Kitayama S. Mandated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination predicts flattened curves for the spread of COVID-19. *Sci Adv.* 2020;6(32):eabc1463.
 98. Charoenlap S, Piromsopa K, Charoenlap C. Potential role of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination in COVID-19 pandemic mortality: Epidemiological and Immunological aspects. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 2020;38(3):150–61.
 99. Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(30):17720–6.
 100. Jehi L, Ji X, Milinovich A, Erzurum S, Rubin BP, Gordon S, et al. Individualizing Risk Prediction for Positive Coronavirus Disease 2019 Testing: Results From 11,672 Patients. *Chest.* 2020;158(4):1364–75.
 101. Noale M, Trevisan C, Maggi S, Antonelli Incalzi R, Pedone C, Di Bari M, et al. The Association between Influenza and Pneumococcal Vaccinations and SARS-Cov-2 Infection: Data from the EPICOVID19 Web-Based Survey. *Vaccines (Basel).* 2020;8(3).
 102. Pawlowski C, Puranik A, Bandi H, Venkatakrishnan AJ, Agarwal V, Kennedy R, et al. Exploratory analysis of immunization records highlights decreased SARS-CoV-2 rates in individuals with recent non-COVID-19 vaccinations. *Sci Rep.* 2021;11(1):4741.
 103. Cohen IR. Antigenic mimicry, clonal selection and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2001;16(3):337–40.
 104. Eldanasory OA, Rabaan AA, Al-Tawfiq JA. Can influenza vaccine modify COVID-19 clinical course? *Travel Med Infect Dis.* 2020;37:101872.