

# Πρόβλεψη της Ανοσολογικής Απάντησης, της Ανοσολογικής Διαφυγής και της Παθογένειας του Ιού SARS-CoV-2, μέσω των Μοναδικών Πεπτιδικών Υπογραφών του ως προς το Ανθρώπινο Πρωτέωμα

Ευάγγελος Κοντοπόδης<sup>1,2,#,\*</sup>, Βασίλειος Πιέρρος<sup>1,#,\*</sup>,  
Δημήτριος Ι. Στραβοπόδης<sup>2,\*</sup> και Γεώργιος Θ. Τσάγκαρης<sup>1,@,\*</sup>

<sup>1</sup>Μονάδα Πρωτεωμικής, Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), Αθήνα 11527, Ελλάδα

<sup>2</sup>Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών (ΣΘΕ), Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ), Αθήνα 15701, Ελλάδα

#Ισότιμη Συμμετοχή

@Υπεύθυνος Επικοινωνίας ([gthtsangaris@bioacademy.gr](mailto:gthtsangaris@bioacademy.gr), ΓΘΤ)

\*Παράρτημα

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα Ελάχιστου Μήκους Μοναδικά Πεπτίδια (CrUPs) αποτελούν μία ξεχωριστή και θεμελιώδους σημασίας ομάδα πεπτιδίων ενός πρωτεώματος. Η ταυτοποίηση των CrUPs σε έναν οργανισμό (π.χ. ιό ή βακτήριο) (αλλά και μεταλλαγμένη πρωτεΐνη) έναντι ενός διακριτού πρωτεώματος διαφορετικού οργανισμού (ή φυσικού-τύπου πρωτεΐνης) είναι μία εντελώς νέα προσέγγιση, η οποία θα μπορούσε να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση της δράσης μολυσματικών μικρο-οργανισμών (π.χ. ιών), την συσχέτιση νέων φαρμακολογικών στόχων με καινοτόμες θεραπείες και, βέβαια, τον σχεδιασμό νέων εμβολίων. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πολλά διαφορετικά είδη ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι ανθρωπο-ζωο-νόσοι, ο στρατηγικός σχεδιασμός εμβολίων για παθογόνους ιούς και βακτήρια, και η ταυτοποίηση νέων αντιγονικών περιοχών - επίτοπων ικανών για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αντισωμάτων. Η καινοτόμος αυτή δυναμική στρατηγική εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στον εντοπισμό των CrUPs του SARS-CoV-2 κορώνα(ο)ϊού έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος (C/H-CrUPs). Σε αυτές τις μελέτες, αναλύσαμε όλα τα CrUPs των κρίσιμων παραλλαγών του SARS-CoV-2 έναντι του πρωτεώματος του οργανισμού-ξενιστή, που στην περίπτωσή μας είναι ο *Homo sapiens* (Human). Είναι εντυπωσιακό, ότι αυτή η προσέγγιση οδήγησε σε σημαντικά ευρήματα που φαίνεται να σχετίζονται μηχανιστικά με την ικανότητα διαφυγής του ιού από το ανοσοποιητικό σύστημα, καθώς και με τη μεταδοτική δύναμη και υψηλή παθογένεια της παραλλαγής Delta, σε αντίθεση με άλλες παραλλαγές, κρίσιμες διαπιστώσεις που έχουν επιβεβαιωθεί και από τα έως σήμερα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν στην πορεία της νόσου. Περαιτέρω, χρησιμοποιήσαμε αυτήν την προσέγγιση στην ανάλυση της παραλλαγής Omicron του SARS-CoV-2 και των υπο-παραλλαγών της BA.1 και BA.2. Ανάλυση των C/H-CrUPs, στην ιδιαίτερος μεταλλαγμένη πρωτεΐνη ακίδα (Spike) των υπο-παραλλαγών της Omicron, αποκάλυψε ότι οι εν λόγω μεταλλάξεις δημιουργούν νέα πολυ-μεταλλαγμένα C/H-CrUPs, μέσω των οποίων ο ιός μπορεί πιθανότατα να διαφύγει από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ αυτά τα εξειδικευμένα πολυ-μεταλλαγμένα C/H-CrUPs δύνανται

ταυτόχρονα να διευκολύνουν την αποτελεσματικότερη σύνδεση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα του ACE2, και την πλέον παραγωγική σύντηξη του ιού με το κύτταρο-στόχο/ξενιστή, αυξάνοντας έτσι τη μεταδοτικότητα και μολυσματικότητα του SARS-CoV-2 ιού. Το πιο σημαντικό όμως εύρημα είναι ότι, σε αντίθεση με την παραλλαγή Delta, στις υπο-παραλλαγές της Omicron, το πεπτίδιο NF9 διατηρείται άθικτο. Δεδομένου, ότι το πεπτίδιο NF9 έχει γνωστή ανοσο-διεγερτική δράση, το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι οι παραλλαγές της Omicron BA.1 και BA.2, αν και παρουσιάζουν αυξημένη μεταδοτικότητα, εμφανίζουν μειωμένη παθογένεια, σε σύγκριση με τη Delta, εφόσον το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί γρήγορα να ανταποκριθεί στον ιό.

Η πανδημία του SARS-CoV-2 έχει απαιτήσει τον εντοπισμό περιοχών πεπτιδικής αλληλουχίας στο ιικό πρωτέωμα που είναι σε θέση να χρησιμεύουν ως αντιγονικές θέσεις - επίτοποι και στόχοι θεραπείας. Σε πρόσφατες σχετικές μελέτες μας έχουμε ορίσει ως Μοναδικά Πεπτίδια (Unique Peptides: UPs) τα πεπτίδια που η αλληλουχία αμινοξέων τους εμφανίζεται μόνο σε μία πρωτεΐνη σε ένα δεδομένο πρωτέωμα. Επίσης, έχουμε εισάγει τον όρο Ελάχιστου Μήκους Μοναδικά Πεπτίδια (Core Unique Peptides: CrUPs), που αναφέρεται στα πεπτίδια με ελάχιστο μήκος αλληλουχίας αμινοξέων που εμφανίζονται μόνο σε μία πρωτεΐνη μέσα σε ένα δεδομένο πρωτέωμα, αποτελώντας έτσι μία μοναδική υπογραφή για την ταυτοποίηση μίας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Συνεπώς, κάθε πεπτίδιο οποιουδήποτε μεγέθους που περιέχει ένα CrUP θεωρείται ως UP. Τα έως σήμερα αποτελέσματά μας σχετικά με την ανάλυση των CrUPs σε διαφορετικά είδη και οργανισμούς υποδηλώνουν ότι τα CrUPs αποτελούν μία νέα, διακριτή και σημαντική ομάδα πεπτιδίων μέσα σε ένα συγκεκριμένο πρωτέωμα, με εξειδικευμένες ιδιότητες και λειτουργίες. Ως εκ τούτου, έχουμε πρόσφατα προτείνει και εισάγει το νέο όρο “Uniquome” («Μοναδιαίω{ο}μα»), ο οποίος ορίζεται ως το σύνολο των UPs και CrUPs που ανιχνεύονται σε ένα πρωτέωμα, και χρησιμεύουν ως η μοναδική μοριακή - πεπτιδική υπογραφή για την ταυτοποίησή του. Ως εκ τούτου, για να χαρτογραφήσουμε συστηματικά τον πλήρη πεπτιδικό χάρτη των UPs και CrUPs ενός πρωτεώματος αναπτύξαμε μία καινοτόμο και προηγμένη αλγοριθμικά βιοπληροφορική πλατφόρμα, για την επεξεργασία και ανάλυση μεγάλου όγκου και περιπλοκότητας δεδομένων (big-data analysis). Το νέο αυτό εργαλείο - εφαρμογή έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς από τη δια-ιδρυματική (IIBEAA - ΕΚΠΑ) ομάδα μας, για την *in silico* ανάλυση του Uniquome όλων των

οργανισμών - μοντέλων της σύγχρονης μοριακής - αναπτυξιακής βιολογίας, με το *Homo sapiens* (Human) να αποκαλύπτει επί των 20.430 πλήρως ταυτοποιημένων πρωτεϊνών του την ύπαρξη 7.263.888 CrUPs, τα οποία αποτελούν και την πρώτη έκδοση του ανθρώπινου (h) Uniquome (hUniquome) (manuscript in preparation, 2022).

Με βάση τα παραπάνω, στις μελέτες που παρουσιάζονται, εφαρμόσθηκε μία νέα προσέγγιση για τη διαλεύκανση του μηχανισμού των αλληλεπιδράσεων ιού-ξενιστή, χαρτογραφώντας όχι τα CrUPs του ιού αυτού καθ' εαυτού, αλλά τα CrUPs του ιού που είναι μοναδικά έναντι ολόκληρου του πρωτεώματος του ξενιστή, δηλαδή εκείνα τα CrUPs του ιού τα οποία δεν υπάρχουν στο πρωτέωμα του ξενιστή. Με δεδομένο ότι ο ξενιστής του ιού SARS-CoV-2 είναι ο *Homo sapiens* (Human), αναλύσαμε το SARS-CoV-2 πρωτέωμα για την ταυτοποίηση των CrUPs αυτού έναντι όλου του ανθρώπινου πρωτεώματος, με τη νέα αυτή κατηγορία πεπτιδίων να ονομάζεται πλέον C/H-CrUPs (Covid vs Human-Core Unique Peptides).

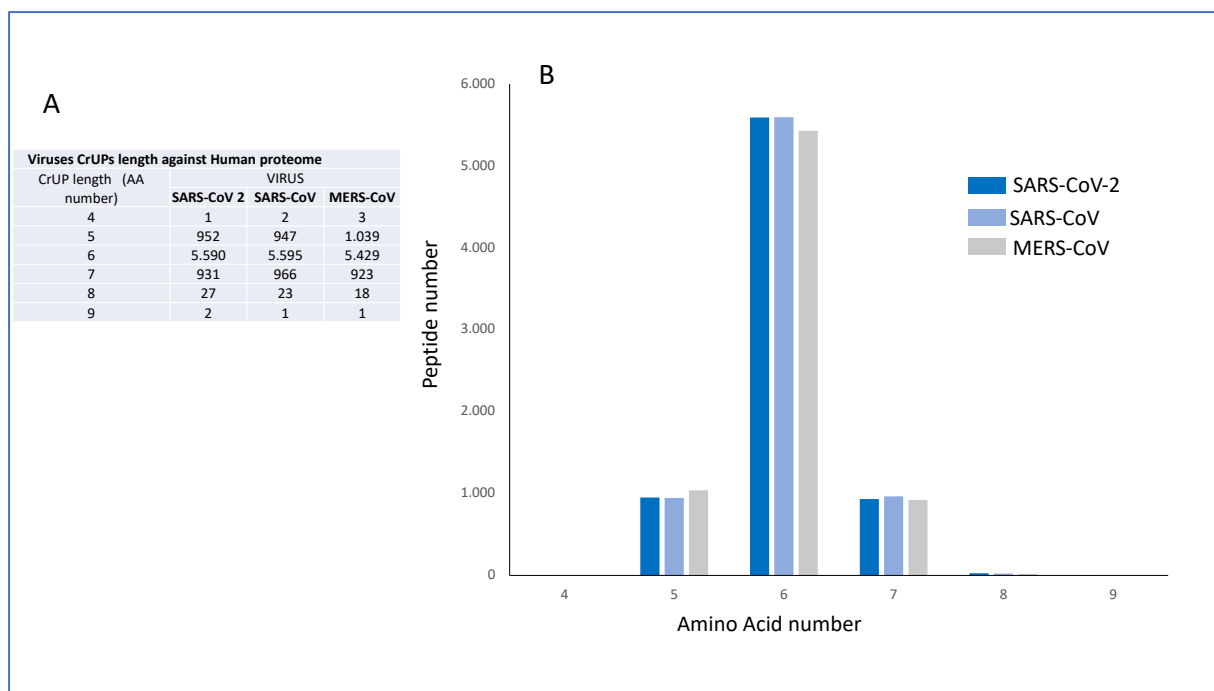
Η πρωτεωμική δομή και οργάνωση του ιού SARS-CoV-2 περιλαμβάνει 16 πρωτεΐνες, και έτσι για την ταυτοποίηση των C/H-CrUPs του ιού έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος κατασκευάσθηκαν *in silico* 16 υβριδικά πρωτεώματα, τα οποία περιείχαν τις 20.430 ταυτοποιημένες ανθρώπινες πρωτεΐνες συν 1 εκ των πρωτεϊνών του ιού (δηλαδή συνολικά 20.431 πρωτεΐνες), κάθε φορά. Στην συνέχεια, η εφαρμογή ανέλυσε βιοπληροφορικά τα 16 αυτά υβριδικά πρωτεώματα, με σκοπό την ταυτοποίηση των μοναδικών πεπτιδίων της κάθε πρωτεΐνης του ιού έναντι όλων των ανθρώπινων πρωτεϊνών.

Διαπιστώθηκε, με έκπληξη, ότι ο SARS-CoV-2 περιλαμβάνει 7.503 C/H-CrUPs, με την πρωτεΐνη ακίδα SPIKE\_SARS2 (PODTC2) να ανιχνεύεται ως η πρωτεΐνη με την υψηλότερη πυκνότητα C/H-CrUP (**Πίνακας 1**).

**Πίνακας 1. Χαρτογράφηση των C/H-CrUPs του ιού SARS-CoV-2**

Entry ID	Entry name	Protein name	Length (AA number)	C/H-CrUPs (number)	Density C/H-CrUPs
P0DTD1	R1AB_SARS2	Replicase polyprotein lab	7096	5334	75%
P0DTC1	R1A_SARS2	Replicase polyprotein la	4405	3294	75%
<b>P0DTC2</b>	<b>SPIKE_SARS2</b>	<b>Spike glycoprotein</b>	<b>1273</b>	<b>987</b>	<b>78%</b>
P0DTC9	NCAP_SARS2	Nucleoprotein	419	308	74%
P0DTC3	AP3A_SARS2	ORF3a protein	275	210	76%
P0DTC5	VME1_SARS2	Membrane protein	222	171	77%
P0DTC7	NS7A_SARS2	ORF7a protein	121	90	74%
P0DTC8	NS8_SARS2	ORF8 protein	121	82	68%
P0DTD2	ORF9B_SARS2	ORF9b protein	97	69	71%
P0DTD3	ORF9C_SARS2	Putative ORF9c protein	73	50	68%
P0DTC4	VEMP_SARS2	Envelope small membrane protein	75	48	64%
P0DTC6	NS6_SARS2	ORF6 protein	61	44	72%
P0DTG0	ORF3D_SARS2	Putative ORF3d protein	57	40	70%
P0DTD8	NS7B_SARS2	ORF7b protein	43	29	67%
P0DTG1	ORF3C_SARS2	ORF3c protein	41	23	56%
P0DTF1	ORF3B_SARS2	Putative ORF3b protein	22	15	68%

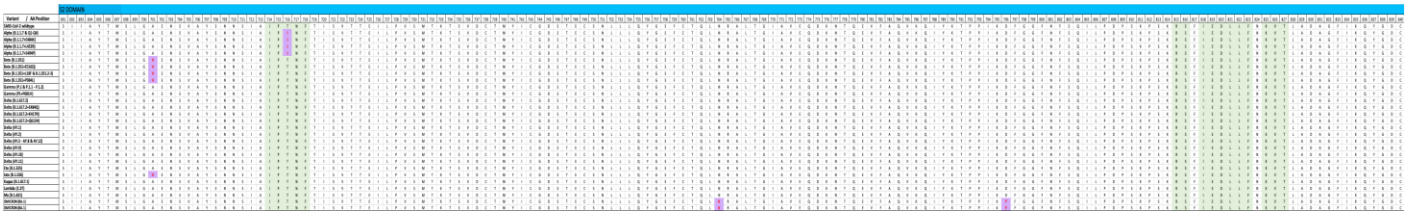
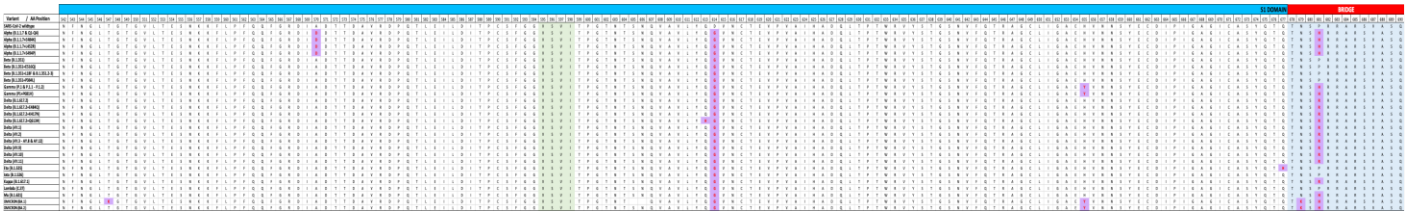
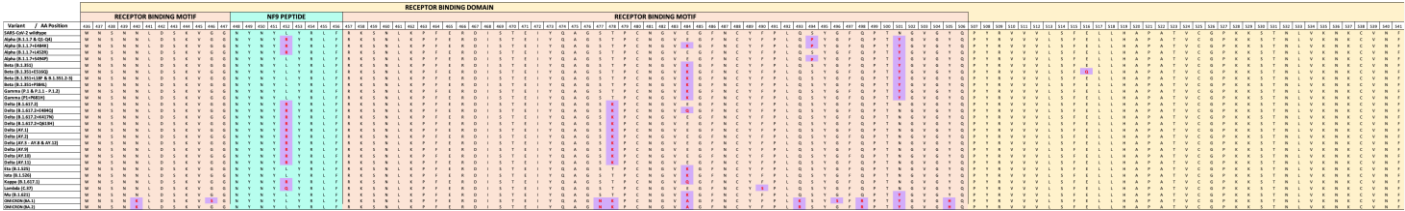
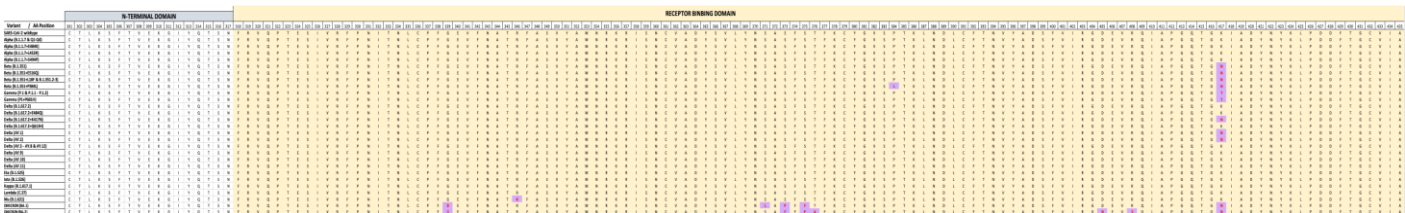
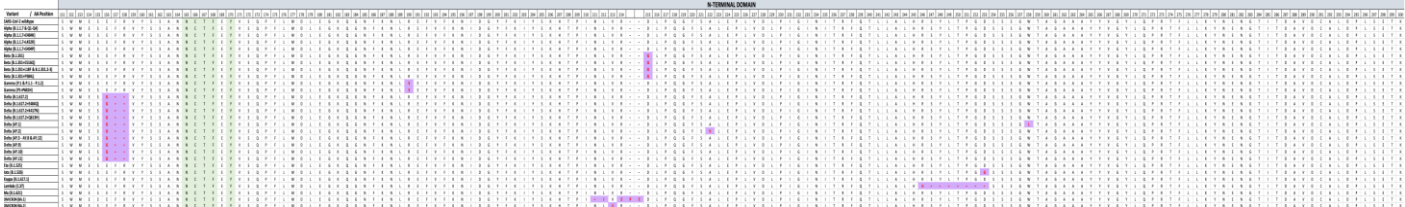
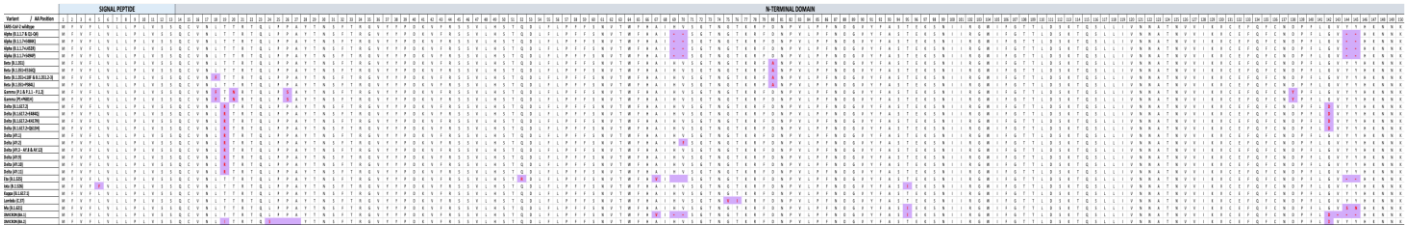
Επεξεργασία και ανάλυση των C/H-CrUPs κατέδειξε το φάσμα μήκους αυτών από 4 έως 9 αμινοξέα, με μεγαλύτερα πεπτίδια να αδυνατούν να ανιχνευθούν στο -έναντι του ανθρώπου- (μοναδιαίο) πρωτέωμα του SARS-CoV-2. Συγκριτική μελέτη του C/H-CrUP χάρτη των μελών της ομάδας των β-κοροναϊών, η οποία περιλαμβάνει τους ιούς SARS-CoV-2, SARS-CoV και MERS-CoV, επιβεβαίωσε τις ισχυρές ομοιότητες μεταξύ αυτών στο επίπεδο της δομής και αρχιτεκτονικής κατασκευής των CrUPs έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος (**Εικόνα 1**), με την πρωτεΐνη ακίδα (Spike) να εμφανίζει τη μεγαλύτερη C/H-CrUP πυκνότητα και στους τρεις τύπους ιών.



**Εικόνα 1.** Κατανομή μήκους αμινοξέων των C/H-CrUPs στους ιούς της ομάδας των β-κορωνα(ο)ϊών (SARS-CoV-2, SARS-CoV και MERS-CoV). (A) Ταυτοποίηση, καταγραφή και ομαδοποίηση των πεπτιδίων ανάλογα με το μήκος των αμινοξέων τους. (B) Γραφική παρουσίαση του φάσματος μήκους αμινοξέων των C/H-CrUPs στην ομάδα των β-κορωνα(ο)ϊών.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω ευρήματα, η μελέτη επικεντρώθηκε περαιτέρω στην ανάλυση των C/H-CrUPs επί της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 (SPIKE\_SARS2, P0DTC2). Μέχρι στιγμής, έχουν χαρτογραφηθεί και χαρακτηριστεί διεξοδικά 10 κύριες παραλλαγές με προσαρμοστικές μεταλλάξεις και ταυτόχρονη μεγάλη εξάπλωση στους ανθρώπινους πληθυσμούς, που ονομάζονται από Άλφα (Alpha) έως Όμικρον (Omicron), αντίστοιχα. Για τη μηχανιστική διερεύνηση της συσχέτισης του προφίλ των μεταλλάξεων και της χωροδότησης των C/H-CrUPs στην Spike πρωτεΐνη (ακίδα) του SARS-CoV-2, οι υπο-παραλλαγές μαζί με τη φυσικού-τύπου Spike πρωτεΐνη (ακίδα) ευθυγραμμίστηκαν κατάλληλα, στοιχήθηκαν και συγκρίθηκαν ενδεδεχώς (**Εικόνα 2**).







**Εικόνα 2.** Ευθυγράμμιση της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 των 26 κύριων υπο-παραλλαγών, μαζί με την Spike αλληλουχία φυσικού-τύπου. Τα μωβ τετράγωνα επισημαίνουν τις σημειακές δέσεις των μεταλλάξεων στις υπο-παραλλαγές, ενώ το πράσινο χρώμα υποδηλώνει τα καθολικά συντηρημένα (ταυτόσημα) πεπτίδια των πρωτεϊνών “Spike”. Το κίτρινο χρώμα επισημαίνει τον τομέα δέσμευσης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) επί του ειδικού της υποδοχέα ACE2 στα κύτταρα-στόχους, ενώ το ροζ χρώμα υποδεικνύει το μοτίβο δέσμευσης στον υποδοχέα. Το κυανό χρώμα χαρακτηρίζει το πεπτίδιο NF9, ενώ το ανοιχτό-μπλε χρώμα επισημαίνει τη γέφυρα μεταξύ των τομέων S1 και S2. Τα κόκκινα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία υδρολυτικής διάσπασης - σχάσης επί της Spike πρωτεΐνης (ακίδα). Με διαφορετικά χρώματα στην επάνω πλευρά της ευθυγράμμισης σημειώνονται οι διαφορετικοί τομείς της Spike πρωτεΐνης (ακίδα).

Στην εν λόγω πολλαπλή ευθυγράμμιση - στοίχιση αμινοξικής αλληλουχίας τοποθετήθηκαν όλες οι μεταλλάξεις που έχουν ανακοινωθεί ανά υπο-παραλλαγή και διαπιστώθηκε ότι η πλειονότητά τους συγκεντρώνεται στον τομέα S1 της Spike πρωτεΐνης (ακίδα), με δύο κρίσιμες μεταλλάξεις να ανιχνεύονται στην περιοχή γέφυρας S1-S2, και ειδικότερα στο αμινοξικό κατάλοιπο 681, που βρίσκεται κοντά στην πρώτη δέση διάσπασης της πρωτεΐνης από την πρωτεάση Φουρίνη (Furin), μεταξύ του 685<sup>ου</sup> και του 686<sup>ου</sup> αμινοξέος (**Εικόνα 3**).

Variant / AA Position	S1 DOMAIN																														BRIDGE										S2 DOMAIN																				S3 DOMAIN																			
	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830																		
SARS-CoV-2 wildtype	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Alpha (B.1.1.7+G1-04)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Alpha (B.1.1.7+H484K)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Alpha (B.1.1.7+H452R)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Alpha (B.1.1.7+H494P)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Beta (B.1.351)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Beta (B.1.351+E516Q)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Beta (B.1.351+L18F & B.1.351-2-3)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Beta (B.1.351+H984I)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Gamma (P.1 & P.1.1 - P.1.2)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Gamma (P.1+P681H)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Delta (B.1.617.2)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (B.1.617.2+E484Q)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (B.1.617.2+K417N)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (B.1.617.2+Q613H)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.1)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.2)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.3-AY.8 & AY.12)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.9)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.10)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Delta (AY.11)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Eta (B.1.525)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Iota (B.1.526)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Kappa (B.1.617.1)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																			
Lambda (C.37)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	P	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
Mu (B.1.621)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																		
OMICRON (BA.1)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	K	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																	
OMICRON (BA.2)	I	C	A	S	Y	Q	T	Q	T	N	S	K	H	R	R	A	R	S	V	A	S	Q	S	I	I	A	Y	T	M	S	L	G	A	E	N	S	V	A	Y	S	N	N	S	K	P	S	K	R	S	F	I	E	D	L	L	F	N	K	V	T	L	A	D																	

**Εικόνα 3.** Ευθυγράμμιση (πολλαπλή στοίχιση) αμινοξικής αλληλουχίας της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 γύρω από την περιοχή της γέφυρας (κόκκινο χρώμα), μεταξύ των τμημάτων -τομέων S1 και S2. Το κόκκινο βέλος υποδεικνύει τη δέση διάσπασης (R685↓S) από την πρωτεάση Φουρίνη. Το μωβ χρώμα επισημαίνει τις σημειακές μεταλλάξεις γύρω από αυτήν τη δέση, ενώ το κόκκινο περίγραμμα υποδηλώνει τις παραλλαγές Delta και Kappa που φέρουν τη μετάλλαξη P681R.

Είναι αξιοσημείωτο, ότι όλες οι μεταλλάξεις που εξετάζονται εδώ αποδεικνύεται να δημιουργούν νέα CrUPs, έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος, σε σύγκριση με τη φυσικού-τύπου Spike πρωτεΐνη (ακίδα), υποδεικνύοντας, ως εκ τούτου, ότι τα στελέχη του μεταλλαγμένου ιού εμφανίζουν νέες μοριακές ιδιότητες, και απαιτούν νέα διαγνωστική και θεραπευτική αντιμετώπιση. Αυτό αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα, δεδομένου ότι αυτά τα νέα C/H-CrUPs δεν ανιχνεύονται στο ανθρώπινο πρωτέωμα, αλλά παρατηρούνται αποκλειστικά και μόνο στα πρωτέωμα των παραλλαγών (και υπο-παραλλαγών) του ιού, δικαιολογώντας έτσι τη μεγάλη προσοχή που έχουν λάβει πρόσφατα οι παραλλαγές Alpha, Delta, Kappa, Lambda και Omicron του SARS-CoV-2 ιού, σε παγκόσμιο επίπεδο. Ο **Πίνακας 2** παραθέτει όλα τα νεο-σχηματιζόμενα C/H-CrUPs από τις (μέχρι στιγμής) αναφερθείσες μεταλλάξεις στις παραλλαγές Alpha, Delta, Kappa και Lambda του SARS-CoV-2 κορωνα(ο)ϊού. Αυτές οι παραλλαγές και οι υπο-παραλλαγές τους περιλαμβάνουν 25 μεταλλάξεις, οι οποίες παράγουν 44 νέα CrUPs, έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος. Αυτά τα νέα C/H-CrUPs είναι δυνατό να οδηγήσουν στον σχηματισμό καινούργιων εγγενώς διαταραγμένων περιοχών (Intrinsically Disordered Regions: IDRs), καθώς και νέων μικρών



γραμμικών μοτίβων (Short Linear Motifs: SLiMs) στις μεταλλαγμένες Spike πρωτεΐνες του SARS-CoV-2.

Ο μοριακός μηχανισμός της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) έχει αποδειχθεί ότι παίζει κρίσιμο ρόλο: (α) στην επιλογή των ειδών του ξενιστή, (β) στη σύνδεση του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα ACE2, (γ) στη σύντηξη ιού-κυττάρου και (δ) στην επιμόλυνση των ανθρώπινων πνευμονικών κυττάρων-στόχων από τον ιό. Η Spike πρωτεΐνη (ακίδα) περιέχει τρεις θέσεις πρωτεολυτικής διάσπασης - σχάσης: τις θέσεις R685↓S και R815↓S που χρησιμεύουν ως άμεσοι στόχοι της πρωτεάσης Φουρίνη (Furin), και τη θέση T696↓M που μπορεί να αναγνωριστεί από την πρωτεάση TMPRSS2. Η ανάλυση των νεο-σχηματιζόμενων, επαγόμενων από μετάλλαξη, C/H-CrUPs επί της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) αποκαλύπτει ότι νέα πεπτίδια, λόγω των μεταλλάξεων, δημιουργούνται αποκλειστικά και μόνο γύρω από την κρίσιμη θέση διάσπασης R685↓S των δύο παθογόνων μεταλλάξεων P681H και P681R (**Πίνακας 3** και **Εικόνα 4**).

Διαπιστώνεται, με ιδιαίτερο πραγματικά ενδιαφέρον, ότι μόνο η κρίσιμη μετάλλαξη P681R, στις παραλλαγές Delta και Kappa, μπορεί και δημιουργεί ένα νέο C/H-CrUP, το οποίο περιέχει και τη θέση διάσπασης R685↓S, στην οποίαν δρα πρωτεολυτικά η Φουρίνη. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η αντικατάσταση της Προλίνης (P) με Αργινίνη (R), στην αμινοξική θέση 681, προκαλεί την απώλεια της μοναδικότητας της αλληλουχίας αμινοξέων που χαρακτηρίζει το φυσικού-τύπου C/H-CrUP "PRRARS↓V", ενώ μέσω σημαντικής σταθεροποίησης της θέσης R685↓S διευκολύνεται η διαδικασία υδρολυτικής διάσπασης - σχάσης (στοχευμένης πρωτεόλυσης) της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) από την πρωτεάση Φουρίνη, και επακόλουθα επάγεται η ταχεία, επιτυχής και αποτελεσματική είσοδος του ιού στο κύτταρο-ξενιστή.

**Πίνακας 2. Νεο-σχηματιζόμενα C/H-CrUPs της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 στις (υπο-)παραλλαγές Alpha, Delta, Kappa και Lambda**

Mutation position	Mutation type	Variant	New C/H-CrUPs (first AA position)	New C/H-CrUPs (AA sequence)
19	T19R	Delta_P0DTC2	-	-
70	V70F	Delta_P0DTC2	69 70	HFSGTN FSGTNG
75 - 76	G75V&T76I	Lambda_P0DTC2	71 75	SGTNVI VIKRFD
222	A222V	Delta_P0DTC2	218	QGF <del>S</del> V <del>L</del>
258	W258L	Delta_P0DTC2	-	-
417	K417N	Delta_P0DTC2	413 414	GQTGN <del>I</del> QTGN <del>I</del> A
452	L452R	Delta_P0DTC2	449	YNYR <del>Y</del>
		Kappa_P0DTC2		
452	L452Q	Alpha_P0DTC2	448	NYNY <del>Q</del>
		Lambda_P0DTC2	449	YNY <del>Q</del> Y
478	T478K	Delta_P0DTC2	474	QAGSK <del>P</del>
			478	K <del>P</del> CNG
484	E484Q	Kappa_P0DTC2	481	NGV <del>Q</del> G
			483	V <del>Q</del> GFN
			484	Q <del>G</del> FNC
	E484K	Alpha_P0DTC2	484	K <del>G</del> FNC
490	F490S	Lambda_P0DTC2	487	NCY <del>S</del> P
494	S494P	Alpha_P0DTC2	-	-
			498	QPT <del>Y</del>
501	N501Y	Alpha_P0DTC2	499	PT <del>Y</del> G
			500	T <del>Y</del> GV
			501	Y <del>G</del> VG
570	A570D	Alpha_P0DTC2	568	DI <del>D</del> DTT
614	D614G	Delta_P0DTC2	609	AVLY <del>Q</del> G
		Kappa_P0DTC2		
		Alpha_P0DTC2		
		Lambda_P0DTC2		
		Delta_P0DTC2		
614	D614G	Kappa_P0DTC2	610	VLY <del>Q</del> GV
		Alpha_P0DTC2		
		Lambda_P0DTC2		
		Delta_P0DTC2		
681	P681R	Delta_P0DTC2	680	SRR <del>R</del> ARS
	P681H	Alpha_P0DTC2	677	QTNS <del>H</del>

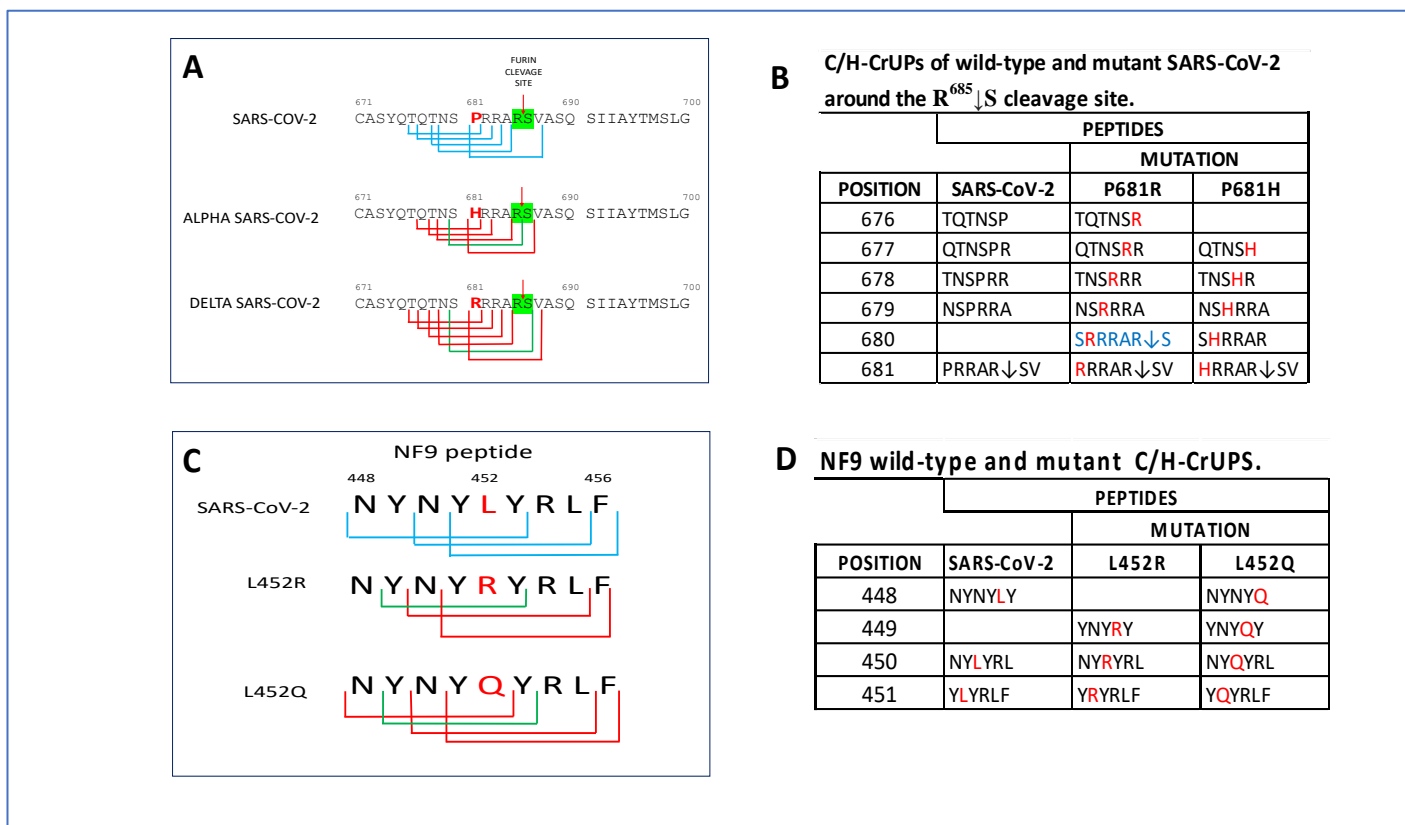
			678	TNSHR
			680	SHRRAR
716	T716I	Alpha_P0DTC2	714	IPINF
859	T859N	Lambda_P0DTC2	855	FNGLNV
			857	GLNVLP
			946	GKLQN
950	D950N	Delta_P0DTC2	947	KLQNVV
			948	LQNVVN
			949	QNVVNQ
982	S982A	Alpha_P0DTC2	978	NDILAR
			1067	YVPAH
1071	Q1071H	Kappa_P0DTC2	1069	PAHEKN
			1071	HEKNF
			1113	QIITTH
			1115	ITTHN
1118	D1118H	Alpha_P0DTC2	1116	TTHNT
			1117	THNTF
			1118	HNTFV

**Πίνακας 3. Νεο-σχηματιζόμενα C/H-CrUPs, γύρω από τις θέσεις διάσπασης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2**

Cleavage site	Mutation	Variant	New C/H-CrUPs (first AA position)	New C/H-CrUPs
R <sup>685</sup> ↓S	P681R	Delta & Kappa	680	SRRRAR↓S
			677	QTNSH
	P681H	Alpha & Gamma	678	TNSHR
			680	SHRRAR
T <sup>696</sup> ↓M	A701V	Beta	None	
R <sup>815</sup> ↓S	None		None	

Ταυτοποίηση των νέων C/H-CrUPs που δημιουργούνται από τις μεταλλάξεις της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2. Πρώτη στήλη: Η θέση πρωτεολυτικής διάσπασης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του SARS-CoV-2. Το σύμβολο «↓» υποδηλώνει την ακριβή θέση διάσπασης. Δεύτερη στήλη: Η μετάλλαξη που εντοπίζεται γύρω από τη θέση διάσπασης. Τρίτη στήλη: Οι παραλλαγές του ιού στις οποίες εμφανίζεται η μετάλλαξη. Τέταρτη στήλη: Η θέση στην αλληλουχία της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του SARS-CoV-2, στην οποία εμφανίζεται το πρώτο αμινοξύ του εκάστοτε C/H-CrUP. Πέμπτη στήλη: Η ακολουθία του κάθε νέου C/H-CrUP. Το σύμβολο «↓» υποδεικνύει τη θέση διάσπασης εντός πεπτιδίου.

Επιπλέον, λόγω των μεταλλαγμένων νεο-σχηματιζόμενων C/H-CrUPs, μπορούν και παράγονται νέα μικρά γραμμικά μοτίβα (Small Linear Motifs: SLiMs) στις παραλλαγές του ιού, όπως τα “SRRR”, “RRR”, “RRRAR” και “RRRARS”, τα οποία φαίνεται να λειτουργούν ως νέοι στόχοι πρωτεολυτικών ενζύμων διαφορετικών από τη Φουρίνη, επιτρέποντας έτσι αφενός την ισχυρότερη δέσμευση του μεταλλαγμένου ιού στον υποδοχέα ACE2 του ξενιστή, και αφετέρου την ταχύτερη είσοδο του ιού στο κύτταρο, η οποία οδηγεί σε μία συγκριτικά πιο γενικευμένη μόλυνση, καθώς και στη μαζική παραγωγή μεταλλαγμένου ιού. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα νέα SLiMs που περιέχονται στα νεο-δημιουργηθέντα C/H-CrUPs από τη μετάλλαξη P681R, στην παραλλαγή SARS-CoV-2 Delta, θα μπορούσαν επιπλέον να καθιστούν την Spike πρωτεΐνη (ακίδα) αντιγονικά αδύναμη ή ελαττωματική (ή ακόμη και ανεπαρκή), με αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητάς της να λειτουργεί ως στόχος (θεραπευτικών) αντισωμάτων, προωθώντας έτσι την ανοσολογική διαφυγή του ιού.



**Εικόνα 4.** Νέα C/H-CrUPs γύρω από τη θέση διάσπασης R685↓S και το πεπτίδιο NF9 της Spike πρωτεΐνης (SPIKE\_SARS2, P0DTC2). (A) Παρουσίαση της αλληλουχίας των αμινοξέων της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) μεταξύ των θέσεων 671 και 700, στο φυσικό-τύπο και στις παραλλαγές Alpha και Delta του ιού SARS-CoV-2. Σε κάθε παραλλαγή, επισημαίνονται τα αναγνωρισμένα C/H-CrUPs. Οι μπλε γραμμές υποδεικνύουν τα C/H-CrUPs που προέρχονται από την πρωτεΐνη φυσικού-τύπου γύρω από τη θέση πρωτεολυτικής διάσπασης R685↓S. Οι κόκκινες γραμμές υποδηλώνουν τα C/H-CrUPs που παράγονται από τις μεταλλάξεις P681H και P681R. Οι πράσινες γραμμές υποδεικνύουν τα νεο-σηματισθέντα C/H-CrUPs που δημιουργούνται από τις μεταλλάξεις P681H και P681R στις παραλλαγές Alpha και Delta, αντίστοιχα. (B) Παρουσιάζεται το σύνολο των C/H-CrUPs που δημιουργούνται γύρω από τη θέση διάσπασης R685↓S στη μορφή της φυσικού-τύπου και της μεταλλαγμένης Spike πρωτεΐνης (ακίδα). (Γ) Παρουσίαση της αλληλουχίας αμινοξέων του πεπτιδίου NF9 μεταξύ των θέσεων 448 και 456 στην Spike πρωτεΐνη (ακίδα) φυσικού-τύπου, καθώς και στις μεταλλάξεις L452R και L452Q. Οι μπλε γραμμές υποδεικνύουν τα C/H-CrUPs που ανήκουν στο πεπτίδιο NF9. Οι κόκκινες γραμμές υποδηλώνουν τα C/H-CrUPs που παράγονται από τις μεταλλάξεις L452R και L452Q. Οι πράσινες γραμμές υποδεικνύουν τα νεο-σηματιζόμενα C/H-CrUPs από τις μεταλλάξεις L452R και L452Q. (Δ) Παρουσιάζεται το σύνολο των C/H-CrUPs που βρίσκονται στο πεπτίδιο NF9 στην Spike πρωτεΐνη (ακίδα) του ιού φυσικού-τύπου, καθώς και στις μεταλλαγμένες πρωτεϊνικές μορφές αυτού.

Μία ιδιαίτερα σημαντική περιοχή στο Receptor-Binding Motif (RBM) της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) είναι το πεπτίδιο “NYNYLYRLF” (από τη θέση 448 έως τη θέση 456) (Εικόνα 2). Αυτό το πεπτίδιο είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς



εμφανίζεται εμπλουτισμένο με Τυροσίνη (Y), περιέχει δύο θέσεις επαφής (Y449 και Y453) με τον υποδοχέα ACE2 και είναι γνωστό ως πεπτίδιο NF9. Επιπλέον, το πεπτίδιο αυτό φαίνεται να επηρεάζει την αναγνώριση του αντιγόνου, καθώς είναι ένας ανοσο-κυρίαρχος επίτοπος των HLA\*24:02 που αναγνωρίζεται από τα CD8<sup>+</sup> T-κύτταρα, με τη διέγερσή του να αυξάνει την παραγωγή κυτ(ταρ)οκίνων, όπως των IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  και IL2. Μελέτη των C/H-CrUPs που σχετίζονται με το πεπτίδιο NF9 έδειξε την ύπαρξη τριών (3) C/H-CrUPs (**Εικόνα 4Γ** και **Δ**).

Ανάλυση μεταλλάξεων αποκάλυψε ότι στο πεπτίδιο NF9 η μετάλλαξη L452R εμφανίζεται στις παραλλαγές Alpha, Delta και Kappa, ενώ η μετάλλαξη L452Q παρατηρείται στην παραλλαγή Lambda (**Εικόνα 2**). Αυτές οι μεταλλάξεις ανιχνεύονται στο αμινοξύ που βρίσκεται στη θέση 5, ακριβώς στη μέση του πεπτιδίου, δημιουργώντας τρία (3) και τέσσερα (4) νέα C/H CrUPs, αντίστοιχα (**Εικόνα 4Δ**). Οι εν λόγω μεταλλάξεις προκαλούν δραματική επίδραση στη μοναδικότητα των CrUPs του NF9. Είναι εντυπωσιακό, ότι το C/H-CrUP μήκους 6 αμινοξέων “NYNYLY” χάνει τη μοναδικότητά του έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος, ενώ μόνο από τη μετάλλαξη L452Q δημιουργείται ένα νέο CrUP με μήκος 5 αμινοξέων (**Εικόνα 4Γ** και **Δ**). Η απώλεια της μοναδικότητας του συγκεκριμένου CrUP, το οποίο εντοπίζεται στην αρχή του πεπτιδίου NF9, φαίνεται να είναι απολύτως κρίσιμη, καθώς οδηγεί στην καταστροφή της αντιγονικής ικανότητας του πεπτιδίου NF9, αποφεύγοντας, ως εκ τούτου, την προκαλούμενη από το HLA-A24 ανοσία, και επάγοντας έτσι την ανοσολογική διαφυγή του ιού. Είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον, ότι η μετάλλαξη L452R (και άρα τα νέα C/H-CrUPs που δημιουργούνται από αυτήν) αυξάνουν τη μολυσματικότητα του SARS-CoV-2, ενώ ταυτόχρονα ενισχύουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αυτής της περιοχής επί της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) με τον υποδοχέα ACE2, σταθεροποιώντας έτσι την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου-στόχου.

Τα μέχρι πρότινος επιδημιολογικά δεδομένα έδειχναν ότι η κυρίαρχη και πλέον παθογόνος παραλλαγή του SARS-CoV-2 είναι η παραλλαγή Delta. Υπό το πρίσμα των προαναφερθέντων ευρημάτων μας, η ενισχυμένη παθογένεια της

παραλλαγής Delta φαίνεται να είναι το αποτέλεσμα της ταυτόχρονης και συσσωρευτικής παρουσίας δύο κρίσιμων μεταλλάξεων, των L452R και P681R, στην εν λόγω παραλλαγή. Η μετάλλαξη L452R, μέσω της απώλειας της μοναδικότητας του πεπτιδίου NF9, προκαλεί ανοσολογική διαφυγή του ιού και ισχυρή σύνδεσή του με τον κυτταρικό υποδοχέα του, ενώ ταυτόχρονα η μετάλλαξη P681R φαίνεται να διευκολύνει τη διαδικασία διάσπασης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) από διαφορετικές πρωτεάσες, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του ιού στα κύτταρα του ξενιστή, προκαλώντας ταυτόχρονα γενικευμένη μόλυνση, και σε δεύτερο επίπεδο επάγοντας τη μαζική απελευθέρωση του ιού. Επομένως, η παραλλαγή Delta κερδίζει ένα σημαντικό πλεονέκτημα διαφυγής από το ανοσοποιητικό σύστημα, εμφανίζοντας αυξημένη μολυσματικότητα ως αποτέλεσμα της εισόδου του ιού στο κύτταρο-ξενιστή, καθώς και αύξηση του σχηματισμού του ιού και μαζική απελευθέρωσή του στον εξω-κυτταρικό χώρο.

Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκε η παραλλαγή Omicron του SARS-CoV-2. Σε πρώτη φάση, στη Νότια Αφρική, ανιχνεύθηκε η υπο-παραλλαγή 1 (Omicron BA.1) και πολύ πρόσφατα χαρακτηρίστηκε η υπο-παραλλαγή 2 (Omicron BA.2). Η υπο-παραλλαγή 1 προσδιορίζεται από 30 σημειακές μεταλλάξεις, 3 μικρές ελλείψεις και 1 ένδεση, ενώ η υπο-παραλλαγή 2 τυποποιείται από 27 σημειακές μεταλλάξεις και 1 έλλειψη. Η δύο αυτές υπο-παραλλαγές φέρουν 21 κοινές μεταλλάξεις. Εξ' αυτών, 15 μεταλλάξεις τόσο της BA.1 όσο και της BA.2 υπο-παραλλαγής της Omicron ανευρίσκονται στην περιοχή δέσμευσης στον υποδοχέα RBD (Receptor-Binding Domain) (**Εικόνα 5**). Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε ότι στο RBM (Receptor-Binding Motif) περιλαμβάνονται οι 10 από τις 15 μεταλλάξεις της υπο-παραλλαγής BA.1 και οι 8 από τις 15 της αντίστοιχης BA.2. Επιπρόσθετα, διαπιστώνεται ότι στο πεπτίδιο NF9 και στις δύο υπο-παραλλαγές της Omicron δεν ανιχνεύεται καμία μετάλλαξη, ενώ η πλειοψηφία των μεταλλάξεων συσσωρεύεται από τη θέση 477 έως τη θέση 506, προς το τέλος της RBM περιοχής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναγνώριση του υψηλότερου αριθμού νεο-σχηματισθέντων C/H-CrUPs στην περιοχή RBD/RBM, σε σύγκριση με όλες τις προηγούμενες παραλλαγές του ιού, και κυρίως τις Alpha και Delta, οι οποίες



**Πίνακας 4. Καταγραφή των C/H-CrUPs που ανήκουν στις παραλλαγές Alpha, Delta και Omicron, επί της περιοχής RBD (Receptor-Binding Domain) της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 (Με κόκκινο χρώμα επισημαίνονται τα μεταλλαγμένα αμινοξέα)**

Alpha variant					Delta variant					Omicron variant															
C/H-CrUP	Position	Mutation	New C/H-CrUPs	Position	C/H-CrUP	Position	Mutation	New C/H-CrUPs	Position	C/H-CrUP	Position	Mutation	New C/H-CrUPs	Position	C/H-CrUP	Position	Mutation	New C/H-CrUPs	Position	C/H-CrUP	Position	Mutation	New C/H-CrUPs	Position	
GNVNYL	447		GNVNYR	447	PGQTGI	412		QGTGNI	413	NLCPPG	334		NLCPPD	334	WNSNN	436		WNSNKL	436	CYFPLQ	488		CYFPLK	488	
NVNYLY	448				GQTGKIA	413		QTGNIA	414	LCPPFG	335		LCPPFE	335	SNLDS	438		SNKLDL	438	YFPLQS	489		YFPLKS	489	
			YNYRY	449				QYGNIA	414	PFGEVF	337		PFDEV	337	NNLDSK	439		NKLDLKV	439	FPLQSY	490		FPLKSY	490	
NLYRL	450		NVRYRL	446	TGKIAD	415		TGNIAD	415	FGVFN	338		FDEVFN	338				KLDLKV	440	PLQSYG	491				
YLYRLF	451		YVYRLF	447	GKIADY	416		GNIADY	416	GEVFN	339		DEVFN	339	LDSKVG	441		DSKVG	441						
LYLRLR	452													DSKVG	442		DSKVG	442							
														DSKVG	444		DSKVG	444							
CNGVEG	480		CNGVKG	480	GNVNYL	447		GNVNYR	447	VLYNSA	367		VLYNLAP	367	KVGGNY	444		KVSGNY	444	Q493K	493		Q493K	493	
NGVEGF	481		NGVKGF	481	NVNYLY	448		YNYRY	449	LYNSAS	368		YNYLAP	369	VSGGNY	445		VSGGNY	445	G496S	496		G496S	496	
GVEGFN	482		GVKGFN	482				YNYRYL	450	YNSASF	369				KVSGNY	443		KVSGNY	443	C498R	498		C498R	498	
			KGFNC	484	NLYRL	450		NVRYRL	450	NSASFST	370				YVYRLF	451		YVYRLF	451	N501Y	501		N501Y	501	
					YLYRLF	451		YVYRLF	451	ASFTF	372		LAPFFT	371											
					LYLRLR	452				SFTFK	373		APFFT	372											
										STFKC	375		FFTK	374											
													FFTKC	375											
YFPLQS	489		YFPLQP	489	YQAGST	473		YQAGSK	473	PGQTGI	412		GQTGNI	413	CNGVEG	480		CNGVAG	480						
PLQSYG	490		PLQOPY	490	AGSTPC	475		QAGSKP	474	GQTGKIA	413		QTGNIA	414	NGVEGF	481		NGVAGF	481						
QSYGF	493		PLQYGF	491				AGSKPC	475				TGNIAD	415	GVEGFN	482		GVAGFN	482						
SYGFQ	494		QYGF	493	STPCN	477		GSKPCN	476				GNIADY	416				YAGFNC	483						
GFQPTN	496		PYGFQ	494				KPCNG	478																
FQPTNG	497																								
QPTNGV	498																								
PTNGVG	499		QPTY	498																					
TNGVG	500		PTYG	499																					
NGVG	500		TYG	500																					
NGVG	501		YVG	501																					

Είναι αξιοσημείωτο, ότι η περιοχή RBM περιέχει 11 από τα 12 σημεία επαφής της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) του ιού SARS-CoV-2 με τον κυτταρικό υποδοχέα ACE2. Μεταξύ αυτών, 7 σημεία επαφής παραμένουν άδικτα, ενώ εντοπίζονται 4 μεταλλάξεις στις θέσεις Q493K, Q498R, N501Y και Y505H, τόσο στην υπο-παραλλαγή BA.1 όσο και στην αντίστοιχη BA.2, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δεκαεπτά (17) νέων C/H-CrUPs. Από αυτές, η μετάλλαξη N501Y έχει δείξει να λειτουργεί ως ένας κύριος και καθοριστικός παράγοντας της αυξημένης μετάδοσης του ιού, λόγω της ισχυρότερης συγγένειας σύνδεσης της Spike πρωτεΐνης (ακίδα) με τον κυτταρικό υποδοχέα της ACE2. Τα ευρήματά μας υποδεικνύουν ότι η δέσμευση του ιού με τον υποδοχέα ACE2 επηρεάζεται σημαντικά από τα μεταλλαγμένα C/H-CrUPs, τα οποία πιθανότατα μπορούν και ενισχύουν την αλληλεπίδραση της Spike με την ACE2 πρωτεΐνη.

Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει, για πρώτη φορά, ότι:

- Τα Ελάχιστου Μήκους Μοναδικά Πέπτιδια (CrUPs) αποτελούν μία καινούργια, ξεχωριστή και δεμελιώδους σημασίας ομάδα πεπτιδίων ενός πρωτεώματος.
- Η ταυτοποίηση των CrUPs σε έναν οργανισμό έναντι ενός διακριτού πρωτεώματος διαφορετικού οργανισμού συνιστά μία εντελώς νέα προσέγγιση, η οποία θα μπορούσε να αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη για την κατανόηση της δράσης των μολυσματικών μικρο-οργανισμών (π.χ. ιών), τη συσχέτιση νέων φαρμακολογικών στόχων με καινοτόμες θεραπείες και, βέβαια, τον σχεδιασμό νέων εμβολίων. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε πολλά διαφορετικά είδη ασθενειών, όπως ο καρκίνος, οι ανθρωπο-ζωο-νόσοι, ο στρατηγικός σχεδιασμός εμβολίων για παθογόνους ιούς και βακτήρια, και η ταυτοποίηση νέων αντιγονικών περιοχών - επίτοπων ικανών για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών αντισωμάτων.
- Η καινοτόμος αυτή δυναμική στρατηγική μπορεί και εφαρμόζεται επιτυχώς στον εντοπισμό των CrUPs του SARS-CoV-2 κορωνα(ο)ϊού έναντι του ανθρώπινου πρωτεώματος (C/H-CrUPs), ενώ αναλύονται ενδελεχώς όλα τα CrUPs των κρίσιμων παραλλαγών του SARS-CoV-2 έναντι του πρωτεώματος του οργανισμού-ξενιστή, που στην περίπτωση μας είναι ο *Homo sapiens*.
- Αυτή η καινοτόμος προσέγγιση οδηγεί σε ιδιαίτερα σημαντικά ευρήματα που φαίνεται να σχετίζονται μηχανιστικά με την ικανότητα διαφυγής του ιού SARS-CoV-2 από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου, καθώς και με τη μεταδοτική δύναμη και υψηλή παθογένεια της παραλλαγής Delta, σε αντίθεση με άλλες παραλλαγές (κρίσιμες διαπιστώσεις που έχουν επιβεβαιωθεί και από τα έως σήμερα επιδημιολογικά δεδομένα που αφορούν στην πορεία της νόσου).
- Ανάλυση των C/H-CrUPs στην ιδιαίτερος μεταλλαγμένη Spike πρωτεΐνη (ακίδα) των υπο-παραλλαγών της Omicron αποκαλύπτει ότι οι εν λόγω μεταλλάξεις παράγουν νέα πολυ-μεταλλαγμένα C/H-CrUPs, μέσω των οποίων ο ιός μπορεί πιθανότατα να διαφύγει από τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, με τα εξειδικευμένα πολυ-μεταλλαγμένα C/H-CrUPs να δύνανται ταυτόχρονα να διευκολύνουν την αποτελεσματικότερη σύνδεση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα του ACE2, γεγονός που επάγει την πλέον παραγωγική σύντηξη του ιού με το κύτταρο-στόχο/ξενιστή, και την επακόλουθη αύξηση της μεταδοτικότητας και μολυσματικότητας του ιού SARS-CoV-2.
- Σε αντίθεση με την παραλλαγή Delta, στις υπο-παραλλαγές της Omicron, το πεπτίδιο NF9 διατηρείται άδικο. Δεδομένου, ότι το πεπτίδιο NF9 έχει γνωστή ανοσο-διεγερτική δράση, το εύρημα αυτό υποδηλώνει ότι οι υπο-παραλλαγές της Omicron, BA.1 και BA.2, αν και παρουσιάζουν αυξημένη μεταδοτικότητα, εμφανίζουν μειωμένη παθογένεια, σε σύγκριση με την αντίστοιχη της παραλλαγής Delta, εφόσον το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί γρήγορα και παραγωγικά να ανταποκρίνεται επιτυχώς στον ιό SARS-CoV-2.



## \*ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

- **\*Unique Peptide Signatures of SARS-CoV-2 Virus against Human Proteome Reveal Variants' Immune Escape and Infectiveness.**  
Pierros V, Kontopodis E, Stravopodis DJ, Tsangaris GT. **Heliyon** (Cell Press). 2022 Apr;8(4):e09222. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09222. Epub 2022 Apr 4. PMID: 35399374 (Free PMC article).
- **\*Prediction of SARS-CoV-2 Omicron Variant Immunogenicity, Immune Escape and Pathogenicity, through the Analysis of Spike Protein-Specific Core Unique Peptides.**  
Kontopodis E, Pierros V, Stravopodis DJ, Tsangaris GT. **Vaccines** (Basel) (MDPI). 2022 Feb 24;10(3):357. doi: 10.3390/vaccines10030357. PMID: 35334990 (Free PMC article).