

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ IN VITRO ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΤΗΣ ΟΜΑΔΑΣ EV-C

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7.500bp και περιβάλλεται από ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο. Οι εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ταξινομούνται σε τέσσερις ομάδες: EV-A, EV-B, EV-C και EV-D. Οι πολιοϊοί, το σημαντικότερο μέλος της ομάδας C, διακρίνονται σε τρεις ορότυπους (PV1, PV2, PV3) και είναι οι αιτιολογικοί παράγοντες της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Από το 1960 χρησιμοποιούνται δύο εμβόλια για την εξάλειψη της ασθένειας, αρχικά το IPV (inactivated polio vaccine) και κατόπιν το πιο αποτελεσματικό OPV (oral polio vaccine). Ωστόσο, το OPV εμφάνισε το μειονέκτημα της εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: Vaccine-associated paralytic poliomyelitis) και της κυκλοφορίας των εμβολιοπροερχόμενων πολιοϊών (VDPVs: Vaccine Derived Polioviruses) μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμών στο γένωμα των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών Sabin.

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη μεθόδων με σκοπό τη μελέτη του μηχανισμού παρασκευής *in vitro* ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊών και εντεροϊών της ομάδας EV-C.

Στο πρώτο μέρος της διατριβής σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε μια Multiplex-PCR για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών. Τα αποτελέσματα της τεχνικής αυτής σε πρότυπα αλλά και κλινικά στελέχη ανέδειξαν την τεχνική αυτή ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την γρήγορη και ακριβή ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών.

Στο δεύτερο μέρος της διατριβής, σχεδιάστηκε και αναπτύχθηκε μια τεχνική αλληλούχησης ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών χρησιμοποιώντας μόνο τέσσερις PCR αντιδράσεις. Η δυνατότητα αυτή παρέχεται μέσω της χρήσης ενός ειδικού εκκινήτη (DOP), μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε αρχικά μια προενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος.

Στο τρίτο μέρος της διατριβής σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε σε κλινικά δείγματα μια Multiplex-PCR για την ανίχνευση ανασυνδυασμών από τη VP1 έως και τη 3D γενωμική

περιοχή εμβολιοσυνδεόμενων πολιοϊών. Τα αποτελέσματα της Multiplex-PCR απέδειξαν την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί σπάνιους αλλά και κύριους τύπους ανασυνδυασμού με τη χρήση μόνο τεσσάρων Multiplex-PCR αντιδράσεων.

Στο τέταρτο μέρος της διατριβής σχεδιάστηκε μια ειδική Stem-Loop RT-PCR μέθοδος για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας των εντεροϊών μέσω ανίχνευσης του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε αρχικά στο πρότυπο στέλεχος Sabin 1, όπου ανιχνεύτηκε η αντιγραφική ενεργότητα του στελέχους σε υψηλό αλλά και χαμηλό ιικό τίτλο, αρκετά νωρίτερα από την εμφάνιση της χαρακτηριστικής εικόνας CPE, των ενεργών εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργεια. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την διάκριση μεταξύ αντιγραφικά ενεργών και ανενεργών πρότυπων στελεχών CAV που δεν εμφάνιζαν CPE σε κυτταροκαλλιέργειες.

Στο τελευταίο μέρος της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε η μελέτη των ανασυνδυασμών που προέκυψαν έπειτα από ταυτόχρονη μόλυνση κυττάρων Rd με πρότυπο στέλεχος Sabin 1 και CAV13. Παράλληλα, με τη χρήση ειδικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής σχεδιάστηκαν πιθανά μοντέλα της δευτεροταγούς δομής των RNA μορίων στις θέσεις ανασυνδυασμού. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής επαλήθευσαν την αυξημένη συχνότητα εμφάνισης ετεροτυπικών ανασυνδυασμών στην 2A ή 2B γενωμική περιοχή και εμφάνισαν μια ένδειξη που επιβεβαιώνει τη σύνδεση μεταξύ ανασυνδυασμού και δευτεροταγούς δομής του RNA μορίου.

STUDY OF THE IN VITRO PRODUCTION MECHANISM OF POLIOVIRUSES AND EV-C ENTEROVIRUSES RECOMBINANT STRAINS

ABSTRACT

Enteroviruses belong to Picornaviridae family. Their genome is composed of a positive sense single-strand RNA of 7.500bp in length and is surrounded by an icosahedral capsid. Enteroviruses that infect humans are classified into four species: EV-A, EV-B, EV-C and EV-D. Polioviruses, the most significant member of EV-C species, are the causal agents of paralytic poliomyelitis and exist as three distinct serotypes (PV1, PV2 and PV3). Since the 1960s, poliomyelitis has been effectively controlled by the use of two vaccines containing all three serotypes of PV, the inactivated poliovirus vaccine (IPV) and the live attenuated oral poliovirus vaccine (OPV). Despite the success of OPV in polio eradication program, it has shown a significant disadvantage: the emergence of vaccine associated paralytic poliomyelitis (VAPP) and the circulation of vaccine derived polioviruses (VDPVs). VAPP is a result of accumulated mutations and/or recombination events placed at the genome of attenuated vaccine Sabin strains.

The aim of the present thesis was to design and develop different methods in order to study the in vitro production mechanism of recombinant strains of polioviruses and EV-Cs.

During the first part of the thesis a Multiplex-PCR method was designed and developed in order to detect and characterize enteroviruses. The results of this method on prototype and clinical strains proved the ability of the method to stand as a useful tool for fast and accurate detection and characterization of enteroviruses.

At the second part of the thesis, a whole genome sequencing technique, using only four PCR reactions, was designed and developed, using a special primer (DOP), through which a preamplification of entire genome is performed.

During the third part of the thesis, a Multiplex-PCR reaction was designed in order to detect recombination events located from VP1 to 3D genomic region of vaccine derived polioviruses. The results of the Multiplex-PCR proved the ability of the method to detect and identify rare and common recombination types by using only four Multiplex-PCR reactions.

At the fourth part of the thesis a specific Stem-Loop RT-PCR method was designed to detect the replicative activity of enteroviruses through detection of the replicative negative

strand RNA strand. This method was originally applied on Sabin 1 prototype strain, where the replicative activity was correctly detected at high and low virus titres, quite early before the appearance of CPE. Moreover, this method was also used to distinguish between replicative active and inactive CAV prototype strains, that didn't yield CPE in cell cultures.

At the final part of the thesis, the study of recombination events derived from simultaneous Rd cell culture infection using Sabin 1 and CAV13 prototype strains was conducted. Probable secondary RNA structure models were also designed using specific bioinformatics software. The results of this study proved the increased incidence of heterotypic recombination events in 2A or 2B genomic regions and showed that a correlation between recombination sites and secondary RNA structure may be established.