

Οι Εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* του γένους *Enterovirus* και ταξινομούνται στην τάξη IV κατά Baltimore, καθώς το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Πρόκειται για μικρούς μη ελυτροφόρους ιούς, που διαθέτουν ένα εικοσαεδρικό πρωτεϊνικό καψίδιο που προστατεύει το γενετικό τους υλικό. Οι Εντεροϊοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο ανήκουν σε τέσσερις ομάδες: EV-A, EV-B, EV-C και EV-D και μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού. Εντοπίζονται σε κλινικά δείγματα, τρόφιμα και στο περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η μοριακή μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 που ανήκουν στις ομάδες C και B αντίστοιχα, καθώς και της επίπτωσης της θερμικής αδρανοποίησης στο ιικό γονιδίωμα και κατά συνέπεια στην ικανότητα των ιών αυτών να μολύνουν κύτταρα και να ολοκληρώνουν επιτυχώς τον κύκλο ζωής τους. Η επιλογή δύο διαφορετικών ιικών στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες του ίδιου γένους έγινε με σκοπό τη σύγκριση των αποτελεσμάτων και τον εντοπισμό ομοιοτήτων, αλλά και διαφορών όσον αφορά την αδρανοποίησή τους μέσω θέρμανσης.

Στο πρώτο στάδιο της διατριβής δημιουργήθηκαν κινητικές μελέτες για το κάθε στέλεχος στοχεύοντας 1<sup>ov</sup> το θετικό κλώνο για την ανίχνευση του γονιδιώματός τους, και κατά 2<sup>ov</sup> τον αρνητικό κλώνο για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας τους και κατά συνέπεια της ικανότητάς τους να μολύνουν επιτυχώς κυτταρικές σειρές. Για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου σχεδιάστηκε μία ειδική Stem-loop Reverse Transcription Real-Time PCR, η οποία παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση χάρη στη θερμοδυναμικά σταθερή δομή του εκκινητή που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT). Ο ειδικός stem-loop εκκινητής της RT σχεδιάστηκε ώστε να στοχεύει τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών, η οποία είναι μια σχετικά συντηρημένη περιοχή ανάμεσα στο γένος των Εντεροϊών και μέσω αυτής της μοριακής τεχνικής είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών. Η τεχνική αυτή επέτρεψε την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) των στελεχών Sabin 1 και Echo 12 και δημιουργήθηκαν κινητικές μελέτες για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας των δύο στελεχών σε 2 συγκεντρώσεις, μία υψηλή της τάξης των 10<sup>6</sup> CCID<sub>50</sub> και μία χαμηλή της τάξης των 10 CCID<sub>50</sub> σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Παράλληλα δημιουργήθηκαν και κινητικές μελέτες για την ανίχνευση του θετικού κλώνου μέσα στα κύτταρα σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Για την ανίχνευση του θετικού κλώνου, η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν Real-Time PCR με το

universal εκκινητικό ζεύγος ENV2/ENV1 που στοχεύει στην 5'UTR περιοχή του θετικού κλώνου των Εντεροϊών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν παρόμοιο πρότυπο ανίχνευσης για τον αρνητικό κλώνο και για τις δύο συγκεντρώσεις. Για τη συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> και για τα δύο στελέχη, ο αρνητικός κλώνος εντοπίστηκε 4 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ αντίστοιχα για τη χαμηλότερη συγκέντρωση ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως ένα αντιγραφικά ενεργό στέλεχος S1 ή E12 σε συγκέντρωση  $10^6$  CCID<sub>50</sub> μπορεί να ανιχνευθεί σε 4 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταρικής σειράς, ενώ σε συγκέντρωση  $10^1$  CCID<sub>50</sub> μέσα σε 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τα αποτελέσματα αυτά συγκριτικά με την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων σε κυτταρικές σειρές αποδεικνύουν ότι η τεχνική Stem-Loop Reverse Transcription Real-Time PCR εντοπίζει την αντιγραφική ενεργότητα των Εντεροϊών σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από ότι η κυτταροκαλλιέργεια. Όσον αφορά το θετικό κλώνο, αυτός ανιχνεύθηκε και για τα δύο στελέχη στην υψηλή συγκέντρωση 2 ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, ενώ για τη χαμηλή συγκέντρωση των στελεχών S1 και E12 εντοπίζεται 2 και 4 ώρες αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη αυτή διαφορά ανάμεσα στους δύο κλώνους οφείλεται στο γεγονός ότι ο θετικός κλώνος βρίσκεται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (30-50 φορές) από ότι ο αρνητικός μέσα στα κύτταρα.

Επιπλέον οι κινητικές μελέτες που αναπτύχθηκαν για τη χαμηλότερη συγκέντρωση  $10^1$  CCID<sub>50</sub> εφαρμόστηκαν και σε 15 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) τα οποία είχαν ήδη χαρακτηριστεί θετικά για την ύπαρξη Εντεροϊού. Αυτή η επιλογή έγινε καθώς στο ENY οι Εντεροϊοί βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Αποδείχτηκε πως μόνο σε 5 από το σύνολο των 15 κλινικών δειγμάτων ανιχνεύθηκαν αντιγραφικά ενεργοί Εντεροϊοί, ενώ σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκε το γονιδίωμα του θετικού κλώνου. Τα στελέχη τα οποία βρέθηκαν θετικά και για τους δύο κλώνους κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως 3/5 ταυτοποιήθηκαν ως ιός Echovirus 30, 1/5 ταυτοποιήθηκε ως ιός Coxsackievirus B3 και 1/5 ως ιός Coxsackievirus B5, αποδεικνύοντας πως μέσω της παρούσας μοριακής τεχνικής, είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των Εντεροϊών, αφού ο σχεδιασμός του ειδικού stem-loop εκκινητή της RT έγινε στοχεύοντας τμήμα της 5'UTR των Εντεροϊών.

Οι συγκεκριμένες κινητικές μελέτες μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως επιβεβαιωτική μέθοδος για την εξακρίβωση της επιτυχούς αδρανοποίησης διαφόρων στελεχών των Εντεροϊών, κερδίζοντας αρκετό χρόνο συγκριτικά με τις κυτταροκαλλιέργειες.

Ακόμη, βρίσκουν εφαρμογή σε στελέχη Εντεροϊών τα οποία δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε υπάρχουσες κυτταρικές σειρές, όπως για παράδειγμα ορισμένα στελέχη ιών Coxsackie A.

Στο επόμενο στάδιο, εντοπίστηκαν οι κατάλληλες θερμοκρασίες που απαιτούνται για την αδρανοποίηση των στελεχών S1 και E12 σε μία πολύ υψηλή ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>) και μία χαμηλή συγκέντρωση ( $10$  CCID<sub>50</sub>) χρησιμοποιώντας μοριακές τεχνικές παράλληλα με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών. Ακολούθησε διερεύνηση της επίπτωσης της θερμικής επεξεργασίας στο γονιδίωμα των ιών για πρόκληση ρήξεων, στοχεύοντας τις γενωμικές περιοχές (5'UTR, 3C, 3D και 3'UTR) όπου διαπιστώθηκε πως η πιο ευαίσθητη περιοχή στη θέρμανση είναι η 3'UTR, σε αντίθεση με την 5'UTR που εντοπίστηκε ως η πιο ανθεκτική. Ακολούθως, λόγω της σημασίας της περιοχής 5'UTR για την ανίχνευση των Εντεροϊών, η περιοχή αυτή μελετήθηκε πιο εκτεταμένα όσον αφορά το σημείο πρόκλησης θραύσης μετά από θέρμανση στη θερμοκρασία των 82°C, που προσδιορίστηκε ως η κατάλληλη θερμοκρασία για την πλήρη αδρανοποίηση των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν όταν η συγκέντρωσή τους ήταν ιδιαίτερα υψηλή ( $10^6$ CCID<sub>50</sub>). Έτσι, προσδιορίστηκε πως η ρήξη στη συγκεκριμένη περιοχή δημιουργείται κοντά στη θέση πρόσδεσης του universal εκκινητή UC53 (θέση 588-606nt) πάνω στην αλληλουχία της 5'UTR. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν ελέγχοντας επιπλέον την περιεκτικότητα σε GC των δύο αυτών περιοχών.

Επόμενος στόχος ήταν η ανάπτυξη μιας ευαίσθητης, ειδικής, ισοθερμικής μοριακής τεχνικής ανίχνευσης των Εντεροϊών της Real Time RT-LAMP ως εναλλακτικός τρόπος επιβεβαίωσης της θερμικής αδρανοποίησης στοχεύοντας την 5'UTR. Έτσι, αναπτύχθηκε η Real Time RT-LAMP, ώστε να παρέχει σε ένα στάδιο (αντίστροφης μεταγραφής και πολλαπλασιασμού του στόχου) σε ισοθερμικές συνθήκες την ενίσχυση του RNA στόχου εντός 60 min. Σε αυτή τη μέθοδο σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 6 εκκινητές σχεδιασμένοι να στοχεύουν την 5'UTR των Εντεροϊών. Στο μίγμα της αντίδρασης εμπεριέχεται η ειδική DNA πολυμεράση με ενεργότητα εκτόπισης κλώνου Bst 2.0 και η αντίστροφη μεταγραφάση WarmStartRTx. Περιέχεται επίσης και μία φθορίζουσα χρωστική η SYBR Green, ώστε να καθίσταται δυνατή η μέτρηση του φθορισμού σε πραγματικό χρόνο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, αποδείχτηκε ότι η Real Time RT-LAMP που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για τον έλεγχο της επιτυχίας της αδρανοποίησης όσον αφορά το ιικό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10^6$ CCID<sub>50</sub>, καθώς έδωσε τα ίδια αποτελέσματα με αυτά της απλής της Real Time RT-PCR. Αντίθετα, όσον αφορά το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης  $10$  CCID<sub>50</sub>, αποδείχτηκε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος δεν μπορεί να

εφαρμοστεί λόγω του ορίου της ευαισθησίας της καθώς μετά τη θερμική επεξεργασία ο ιικός τίτλος μειώνεται με αποτέλεσμα η συγκέντρωση του ιού να ελαττώνεται σημαντικά και να μην ανιχνεύεται. Συμπεραίνεται λοιπόν ότι για τις συγκεντρώσεις κάτω των 10 CCID<sub>50</sub> η συμβατική Real Time RT-PCR είναι καταλληλότερη για τη μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης. Ανάλογα ήταν και τα αποτελέσματα για το στέλεχος E12.

Συνοψίζοντας, προσδιορίστηκε ότι η θερμική αδρανοποίηση επηρεάζει την ακεραιότητα του γονιδιώματος των Εντεροϊών, καθώς οδηγεί στη δημιουργία ρήξεων σε πολλές περιοχές του γονιδιώματός του, με την 3'UTR να ανιχνεύεται ως η πλέον ευαίσθητη και η 5'UTR περιοχή ως η πλέον ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση. Αποδείχθηκε επίσης, ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση της ακεραιότητας του γονιδιώματος και της ιικής μολυσματικότητας και πως για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θερμικής αδρανοποίησης είναι απαραίτητος ένας πλήρης έλεγχος ο οποίος περιλαμβάνει 2-3 ανακαλλιέργειες του ιού σε ευαίσθητη κυτταρική σειρά σε συνδυασμό με την ανίχνευση ρήξεων τουλάχιστον στην 3'UTR και στην 5'UTR, και τέλος την ανίχνευση του θετικού αλλά κυρίως αρνητικού κλώνου των Εντεροϊών στην 5'UTR γενωμική περιοχή καθώς η ανίχνευση του θετικού κλώνου του RNA του γονιδιώματος των Εντεροϊών δεν αποτελεί ένδειξη ενός ενεργά αντιγραφικού ιού και κατά συνέπεια μολυσματικού ιού.