



ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ
DEMOCRITUS UNIVERSITY OF THRACE

ΔΗΜΟΚΡΙΤΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΡΑΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Τίτλος διδακτορικής διατριβής : Δημιουργία και χαρακτηρισμός μεταλλαγμένου υπογονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου με στόχο την χρήση ως υποψήφιο εμβόλιο

Dissertation title : Construction and characterization of a mutated West Nile virus subgenome for use as a vaccine candidate

Υποψήφιος διδάκτορας : Δημητρίου Μάριος

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Σταυρούλα Βελετζά, Καθηγήτρια Ιατρικής Βιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ

Πηνελόπη Μαυρομαρά, Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, ΔΠΘ

Ιωάννης Καρακασιλιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Ιατρικής Βιολογίας – Μοριακής Ιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ (επιβλέπων καθηγητής)

Περίληψη της μελέτης

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ένας νευροτρόπος ιός και μεταφέρεται μέσω των κουνουπιών. Ο συγκεκριμένος ιός αποτελεί απειλή για τον άνθρωπο σε πολλές περιοχές του πλανήτη, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει διαθέσιμο φάρμακο ενάντια στη ιική μόλυνση, ενώ κανένα προτεινόμενο σχήμα εμβολίου για τον άνθρωπο δεν έχει φτάσει τα τελικά στάδια των κλινικών δοκιμών. Στόχος αυτής της μελέτης είναι να κατασκευαστεί ένα υπογονιδιωματικό αυτοαντιγραφόμενο τμήμα του ιού (West Nile virus replicon) με μεταλλαγμένη την 3' αμετάφραστη περιοχή του, το οποίο θα μπορεί στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί ως υποψήφιο εμβόλιο. Τα στοιχεία αυτά καθιστούν την κατασκευή εξασθενημένη όσον αφορά την μολυσματικότητα των νευρικών κυττάρων, αλλά δεν επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό της εντός της κυτταροκαλλιέργειας. Ειδικότερα, από την κατασκευή θα λείπουν οι περιοχές του γονιδιώματος που αντιστοιχούν στις δομικές πρωτεΐνες του ιού. Επιπρόσθετα, θα διαγραφεί μέσω περαιτέρω χειρισμών κλωνοποίησης το στοιχείο SLII από την 3' αμετάφραστη περιοχή. Στη συνέχεια, το μεταλλαγμένο υπογονιδίωμα θα χρησιμοποιηθεί για τη διαμόλυνση κυττάρων Vero (Green Monkey cells) και την παραγωγή σταθερής κυτταρικής σειράς. Μετά από ανακαλλιέργεια για μεγάλο χρονικό διάστημα, θα συγκριθούν οι αλληλουχίες πριν και μετά την έναρξη της διαδικασίας μέσω αλληλούχησης επόμενης γενιάς (RNA seq), ώστε να εκτιμηθεί η γενετική σταθερότητα της κατασκευής. Τυχόν προσαρμοστικές μεταλλαγές θα αξιολογηθούν ως προς τον ρόλο τους στη διαδικασία προσαρμογής του ιικού υπογονιδιώματος. Τέλος, η μελέτη της διαφορικής έκφρασης με τη βοήθεια αλληλούχησης επόμενης γενιάς θα επιβεβαιωθεί για επιλεγμένα γονίδια, χρησιμοποιώντας τις μεθόδους PCR πραγματικού χρόνου και ανοσοσύστημα κατά Western.

Summary

West Nile virus is a neurotropic virus that is transmitted by mosquitoes. This virus poses a threat to humans in many parts of the world, including Greece. To date, no drug against viral infection is available and no proposed vaccine regimen for humans has reached the final stages of clinical trials. The aim of this study is to construct a subgenomic, self-replicating part of the virus (West Nile virus replicon) with a mutated 3' untranslated region, which can be used as a vaccine candidate in the future. These changes attenuate the construct in terms of infectivity of nerve cells, but do not affect its proliferation within the cell culture. Specifically, the construct will lack the genome regions corresponding to the structural proteins of the virus. In addition, further cloning manipulations will be conducted in order to delete the SLII element from the 3' untranslated region. The mutated subgenome will then be used to transfect Vero cells (Green Monkey cells) and produce a stable cell line. After culturing for a long period of time, the sequences before the beginning of transfection and after the culturing of the cells will be compared via next generation sequencing (RNA seq), so as to evaluate the genetic stability of the construct. Adaptive mutations will be evaluated for their role in the process of adaptation of the viral subgenome. Finally, the study of differential expression using next generation sequencing will be confirmed for selected genes by using real-time PCR and Western blotting.