

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



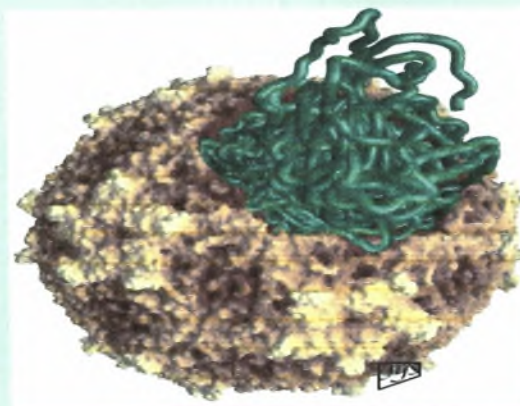
**«Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας»**

**«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»**

ΜΑΣΤΟΡΑΚΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΧΘΟ ΙΩΝ
ΜΕΣΩ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΕΝΩΜΙΚΩΝ
ΠΕΡΙΟΧΩΝ VP1, VP2 VP3 ΚΑΙ VP4**



ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 7000/1
Ημερ. Εισ.: 19-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
579.257 2
ΜΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087336

**Ανιχνευση Και Χαρακτηρισμος Echo Ιων Μεσω
Αλληλουχισης Των Γενωμικων Περιοχων VP1, VP2 VP3
Και VP4**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το περιβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στην κυκλοφορία των εντερικών ιών. Ένας μεγάλος αριθμός ιών που εγκλείονται στα κόπρανα μπορούν να ανιχνευτούν σε υδάτινες μάζες τέτοιοι είναι οι νοροϊοί , οι ρεοϊοί , οι αδενοϊοί . οι ροταϊοί και οι εντεροϊοί. Τα επεξεργασμένα αστικά λύματα με την απόρριψη τους τόσο σε ποτάμια και λίμνες όσο και στη θάλασσα και η χρησιμοποίησή τους σε άρδευση και λίπανση, όταν δεν έχει γίνει σωστά η επεξεργασία τους, μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία με τη διασπορά τους στο περιβάλλον και την είσοδο στην τροφική αλυσίδα. Έτσι είναι σπουδαίο να ελέγχουμε περιβαλλοντικά δείγματα γιατί αυτά μπορούν να μας δείξουν το μέγεθος και τη διάρκεια της κυκλοφορίας των εντεροϊών μέσα σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό. Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό της οικογένειας των Picornaviridae, ως προς την παθογένεια των μελών του στον άνθρωπο. Αποτελείται από τουλάχιστον 65 οροτύπους οι οποίοι ταξινομούνται σε πέντε υποομάδες. Το καψίδιο των εντεροϊών δεν περιβάλλεται από λιπιδικό έλυτρο και εσωκλείει ένα μόριο RNA θετικής πολικότητας. Στο 5' άκρο του γονιδιώματος είναι προσδεσμένη η VPg πρωτεΐνη. Το γένωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5'untranslated region-5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) και την 3'μη κωδική περιοχή (3'untranslated region-3'UTR). Η κωδική περιοχή του RNA (ORF) μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία περιέχει πληροφορίες για τις τέσσερις δομικές (VP1-VP4) και τις επτά λειτουργικές (2A-2C και 3A-3D) πρωτεΐνες του ιού.

Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών και χρησιμοποιείται επιτυχώς για να ανιχνεύσει ακόμη και αυτούς τους οροτύπους που δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη.

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση και ο χαρακτηρισμός εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα . Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση της καψιδιακής περιοχής και η επεξεργασία των αλληλουχιών με προγράμματα βιοπληροφορικής (BLAST, MEGA, SimPlot) για τη νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη της προαναφερθείσας περιοχής, με στόχο την διερεύνηση πιθανών ανασυνδυασμών και την επιδημιολογική μελέτη αυτών των στελεχών

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο για την ανάθεση αυτής της εργασίας και για της υπομονή του. Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στον καθηγητή Ζήση Μαμούρη και στον επίκουρο καθηγητή Κωνσταντίνο Σταθόπουλο που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή αυτής της ,μεταπτυχιακής εργασίας.

Ένα θερμό ευχαριστώ σε όλους τους συναδέλφους στο εργαστήριο για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα στο χώρο εργασίας και ιδιαίτερα στην Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την πολύ καλή συνεργασία και για τη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	3
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	3
1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	3
1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	6
1.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	7
1.2.2 ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	8
1.2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ.....	12
1.2.4 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ.....	13
1.2.5 Η 5' ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (5' UTR).....	14
1.2.6 Η 3' ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (3' UTR).....	15
1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	16
1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	20
1.4.1 ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ.....	20
1.4.2 ΞΕΔΙΠΛΩΜΑ ΤΩΝ ΙΩΝ.....	22
1.4.3 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ.....	23
1.4.4 ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΤΗΣ ΪΚΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ.....	25
1.4.5 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΪΚΟΥ mRNA.....	26
1.4.6 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ.....	28
1.5 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	30
1.5.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΓΕΝΕΣΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	30
1.5.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	30
1.5.3 Ο ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗ – ΠΟΛΙΟ – ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ.....	32
1.5.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	35
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	35
2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	35
2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA.....	35
2.3 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ.....	36
2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ - ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ.....	37
ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR).....	37
2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ.....	40
2.6 ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR.....	41
2.7 ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	41
2.7.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ – ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	43
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	43
3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕCHO ΙΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ RT-PCR ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕCHO ΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	43
3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ-ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ.....	45
3.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ ΣΕ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ.....	53

3.4 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΗΝ P1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ
ΠΕΡΙΟΧΗ 55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 58
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 58
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

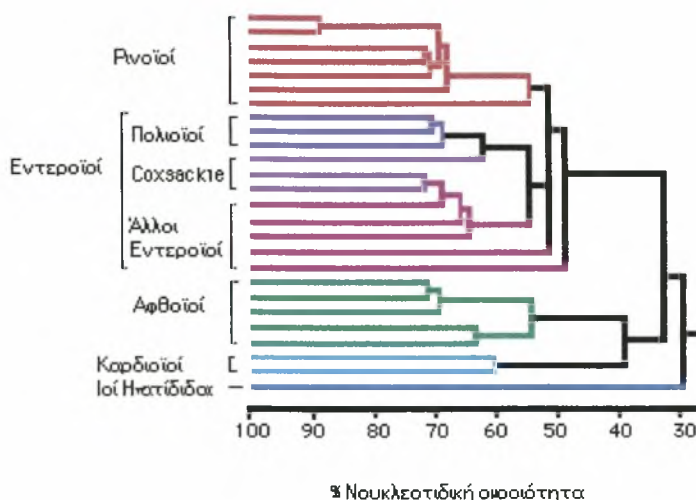
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η οικογένεια των Picorna ιών περιλαμβάνει 230 οροτύπους, οι οποίοι ομαδοποιούνται σε εννέα γένη ιών (Pringle, 1999). Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται τόσο στα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά όσο και στους ξενιστές και τα όργανα τα οποία προσβάλλουν καθώς και στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους. Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτές τις διαφοροποιήσεις, διακρίνονται τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus - ιοί του απλού κρυολογήματος), των ιών της Ηπατίτιδας Α (Hepatovirus), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των Παρεκοϊών (Parechovirus) και των Κομπουϊών (Kobuvirus), τα οποία παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια καθώς και τα τρία γένη των Ερμποϊών (Erbovirus), των Αφθοϊών (Aphthovirus) και των Τεσκοϊών (Teschovirus), τα οποία δεν παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Επίσης σε ξεχωριστή κατηγορία κατατάσσονται τα γένη των μη ταξινομημένων Picorna ιών και των περιβαλλοντικών δειγμάτων (King et al., 2000).

Αρχικά, το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερα είδη: το είδος των Πολιοϊών, των Cocksackie Α και Β ιών και το είδος των Echo ιών (Committee on the Enteroviruses, 1957), αυτό έγινε με βάση την παθογένειά των μελών του στον άνθρωπο και σε πειραματόζωα ζώα. Στη συνέχεια, αυτά τα είδη χωρίστηκαν επιπρόσθετα σε 64 αντιγονικά διακριτούς οροτύπους (Πολιοϊοί 1-3, Cocksackie Α ιοί 1-24, Cocksackie Β ιοί 1-6 και Echo ιοί 1-33) («Fields Virology», Melnick J.L., 1996). Οι Echo 22 και 23 ταξινομήθηκαν ως ένα νέο γένος, αυτό των Parecho ιών 1 και 2 αντίστοιχα και αυτό έγινε διότι σε αναλύσεις της πρωτοταγούς δομής που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε ότι αυτοί οι δυο ιοί έχουν χαρακτηριστικά που τους διαχωρίζουν από τους υπόλοιπους που εντάσσονται στο γένος των εντεροϊών. Οι διαφοροποιήσεις αυτές παρατηρούνται κυρίως στις καψιδιακές τους πρωτεΐνες . (Joki-Korpela and Hyypia, 2001).



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των Picornaviridae βασισμένο στη νουκλεοτιδική ομοιότητα των μελών των διαφορετικών γενών. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.vadscorner.com/outbreak.html

Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, η γενωμική ανάλυση διαδέχτηκε την οροταυτοποίηση, ως μέσο ανίχνευσης και ταξινόμησης των εντεροϊών. Το 1999, η αναταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την πρωτοταγή τους οργάνωση (νουκλεοτιδική και αμινοξική) έγινε αποδεκτή από την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των εντεροϊών χωρίζεται σήμερα σε 8 είδη (King et al., 2000). Από αυτά, τα πέντε (Poliovirus, και Human Enterovirus A – D) παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Βάσει αναλύσεων της πρωτοταγούς τους δομής και της VP1 περιοχής τους οι 65 ορότυποι, που αποτελούν το σύνολο των ανθρώπινων εντεροϊών, κατανέμονται στα είδη που προαναφέρθηκαν ως εξής. Το είδος A (HEVA) αποτελείται από τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και από τον εντεροϊό 71. Το είδος B (HEVB) περιλαμβάνει όλους τους Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33), τον Coxsackie A9 και τους Εντεροϊούς 69 και 73 (EV69, EV73) (Oberste et al., 2001). Το είδος C (HEVC) αποτελείται αποκλειστικά από Coxsackie A ιούς και συγκεκριμένα από τους A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24. Τέλος, το είδος D περιλαμβάνει τους πρόσφατα ταυτοποιημένους ιούς EV68 και EV70, ενώ το είδος των πολιοϊών περιλαμβάνει τους πολιοϊούς Polio 1-3.

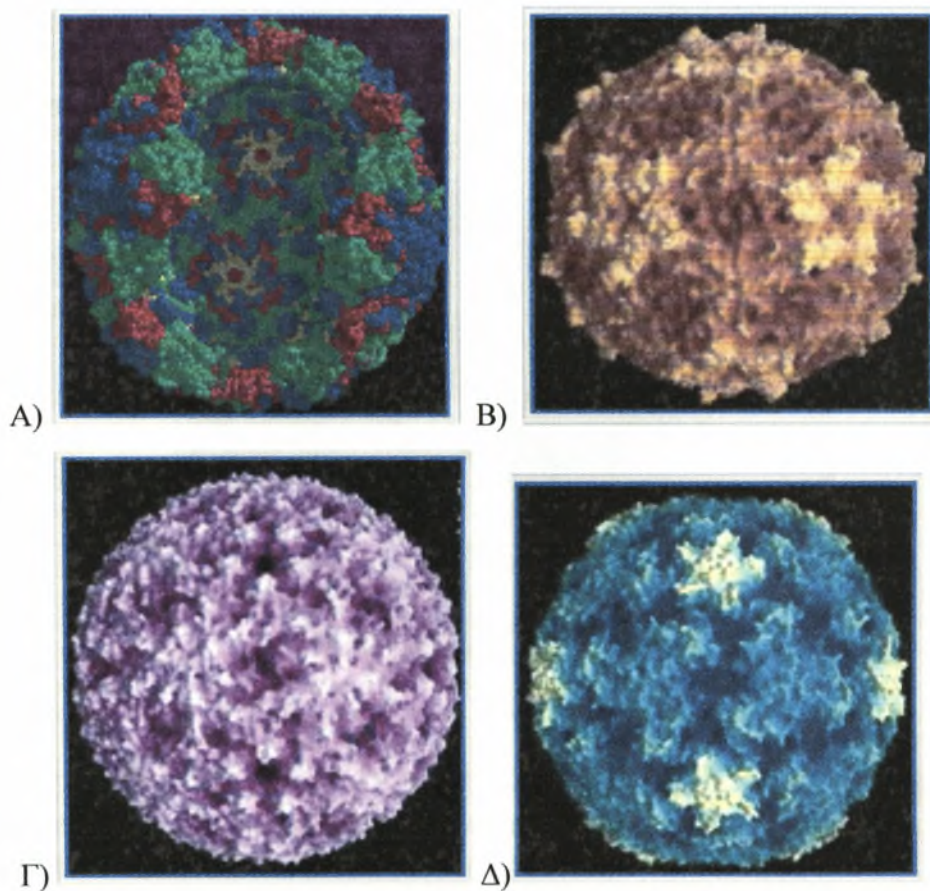
Γενικότερα η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς αναβαθμίζεται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων (Enterovirus 74-75 - Oberste et al., 2004a και Enterovirus 77-78 - Norder et al., 2003), ενώ ακόμη και σήμερα, υπάρχει ένας αριθμός στελεχών, τα οποία φέρουν τον τίτλο «μη ταυτοποιημένα».

ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ		
Ομάδα I	Εντεροϊούς A (HEVA)	CAV2 έως CAV8 CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 και EV 71
Ομάδα II	Εντεροϊούς B (HEVB)	CAV9, CBV1 έως CBV6 E1 έως E7, E9, E11 έως E21, E24 έως E27, E29 έως E33, EV69, EV73
Ομάδα III	Εντεροϊούς C (HEVC)	CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17 έως CAV22, CAV24
Ομάδα IV	Εντεροϊούς D (HEVD)	EV68 και EV70
Ομάδα V	Πολιοϊούς	PV 1-3

Πίνακας 1 Ταξινόμηση του γένους των εντεροϊών

1.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

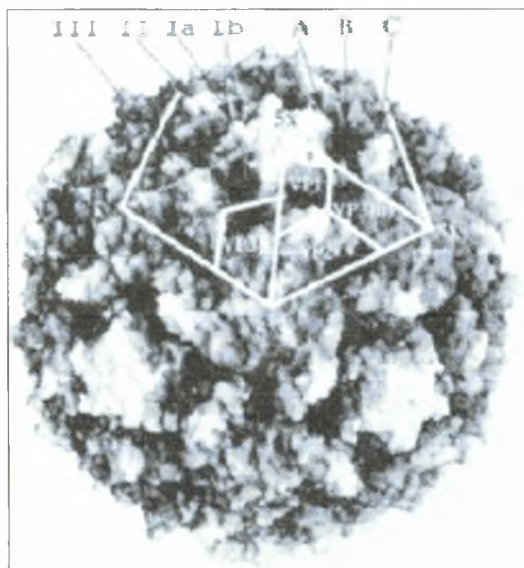
Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί είναι, RNA ιοί θετικής πολικότητας ιοί, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας (Rueckert, 1985). Οι Picorna ιοί έχουν ένα σχετικά μικρό γενετικό υλικό και επομένως μπορούν να μελετηθούν άμεσα σε μοριακό επίπεδο. Η δυνατότητα κρυσταλλοποίησης και η εφαρμογή της κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X οδήγησε στην μεγαλύτερη κατανόηση της δομής τους. Μέχρι στιγμής έχει ανακαλυφθεί μέσω κρυσταλλογραφίας με ακτίνες X η τρισδιάστατη δομή 5 οροτύπων εντεροϊών που προσβάλουν τον άνθρωπο (PV1, PV3, CBV3, CAV9, EV1,).



Εικόνα 2. Κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X διαφόρων Picorna ιών. Α) Ρινοϊός 16, Β) Mengovirus, Γ) Ιός FMDV (γένος Αφθοϊών), Δ) Μοριακή επιφάνεια του Ρινοϊού 14. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.virology.net/Big_Virology/BVRN/Apicorna.html

1.2.1 ΔΟΜΗ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η θεμελιώδης δομή του καψιδίου είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae. Το καψίδιο των εντεροϊών έχει διάμετρο 25 - 35nm και αποτελείται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών VP1- VP2- VP3-VP4 (Rueckert, 1985). Η βασική δομική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές, το οποίο αποτελείται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0. Κατά την συγκρότηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το ώριμο εικοσαεδρικό καψίδιο πενταμερούς συμμετρίας, το οποίο σταθεροποιείται, καθώς ταυτόχρονα πραγματοποιείται η πρωτεόλυση της VP0 (στις VP2 και VP4) και ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού στο νεοσχηματιζόμενο ιικό σωματίο. Ένα με δύο μόρια VP0 παραμένουν μη διασπασμένα σε κάθε καψίδιο με τη λειτουργική σημασία αυτής της λειτουργίας να παραμένει ακόμα άγνωστη.



Εικόνα 3. Το καψίδιο των Picorna ιών. Διακρίνεται η δομή πενταμερούς συμμετρίας και η τοπολογική συσχέτιση των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. Ανατύπωση από τη νιστοσελίδα http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Polio/PoliovirusPathogenesis.htm

Οι VP1, VP2 και VP3 εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου του ιού, ενώ η VP4 στην εσωτερική. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις δείχνουν, ότι στην επιφάνεια, η VP1 συγκεντρώνεται εξωτερικά σε μία περιοχή, η οποία περιβάλλει τον άξονα πενταμερούς συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 είναι τοποθετημένες η μία δίπλα στην άλλη σε μεγαλύτερη απόσταση από τον άξονα.

Η VP4 διαμορφώνει μία εκτεταμένη δομή, η οποία εντοπίζεται εσωτερικά κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες έχοντας το N-τελικό της άκρο κοντά στον πενταμερή άξονα και το C-τελικό, κοντά στον άξονα τριμερούς συμμετρίας. Τα πενταμερή σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων του N-τελικού και του C-τελικού άκρου των VP1, VP3 και VP4. Τα γειτονικά πενταμερή, συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3 πρωτεϊνών και πιστεύεται, ότι αυτή η χαλαρή σύνδεση διευκολύνει την αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Stanway, 1990).

1.2.2 ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

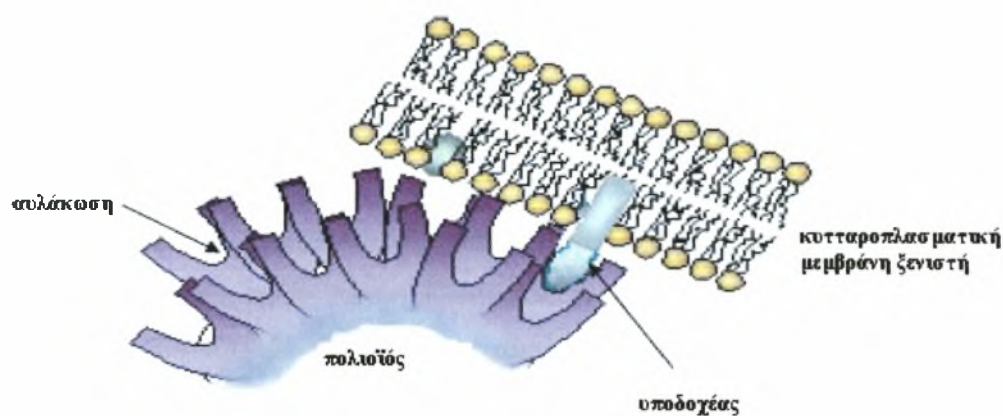
Οι καψιδικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται προς το 5' άκρο του γονιδιώματος των εντεροϊών και το μέγεθός τους ποικίλει στα διάφορα γένη των Picorna ιών. Η πρωτεΐνη VP1 αποτελείται από 209 έως 302 αμινοξέα, η VP2 από 218-272, η VP3 από 221-246, ενώ, τέλος, η VP4 είναι αρκετά μικρότερη, με μήκος που ποικίλλει αρκετά, από 68 έως 85 αμινοξέα (Palmenberg et al., 1989).



Εικόνα 4. Τρισδιάστατη απεικόνιση των πρωτεϊνών του καψιδίου VP1, VP2, VP3 και VP4. Διακρίνεται η μεγάλη συμμετοχή των β- φύλλων στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς οργάνωσης και των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών καθώς και η παρουσία μικρού ποσοστού α-ελίκων. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.swbic.org/.../envirusat/module6/module6.html

Η κατανόηση της δομής των πρωτεϊνών του καψιδίου και του ρόλου, τον οποίο παίζουν κατά τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών βελτιώθηκε σημαντικά μετά από τον καθορισμό της τρισδιάστατης οργάνωσης του πολιοϊού τύπου 1 (PV1) και του ρινοϊού 14 (HRV14) (Arnold and Rossmann, 1990, Rossmann et al., 1985). Φαίνεται, λοιπόν, ότι μεταξύ των εντεροϊών, και γενικότερα των Picorna ιών, οι πρωτεΐνες του καψιδίου παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες. Οι VP1, VP2 και VP3, είναι δομικά όμοιες και διαθέτουν οκτάκλωνη οργάνωση β-βαρελίου. Ο πυρήνας αυτής της δομής συγκροτείται από αντιπαράλληλα β-φύλλα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω θηλειών. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο των VP1 και VP3 δεν έχει καθορισμένη δομή, ενώ η VP4 φαίνεται να αποτελεί προέκταση του αμινοτερματικού άκρου της VP2.

Επίσης, παρατηρήθηκε, από τη μελέτη του HRV-14, η παρουσία μιας βαθιάς αυλάκωσης (canyon), η οποία σχηματίζεται από γειτονικά κατάλοιπα των VP1 και VP3 πρωτεϊνών και εντοπίζεται σε σταθερή ακτίνα, περιμετρικά του άξονα πενταπλής συμμετρίας (Rossmann et al., 1985) των εντεροϊών. Αυτό το εύρημα φαίνεται να σχετίζεται με την πρόσδεση των Picorna ιών στους κυτταρικούς υποδοχείς αλλά και με την αποφυγή της ανοσοαπόκρισης μέσω αντισωμάτων. Στο εσωτερικό της αυλάκωσης βρίσκονται πρωτεϊνικά τμήματα, τα οποία έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με συμπληρωματικές περιοχές των υποδοχέων των ξενιστικών κυττάρων. Η τοποθέτηση όμως αυτών των καταλοίπων σε μία περιοχή, η οποία, λόγω μεγέθους (πλάτος 1,5 nm και βάθος 1,2 nm), δεν είναι προσιτή στα ογκώδη αντισώματα του ανοσοποιητικού συστήματος, εξασφαλίζει την προστασία των ιών από τον ξενιστή αλλά και την προσκόλληση στους υποδοχείς του. Κάτω από την αυλάκωση εντοπίζεται μία εσοχή (hydrophobic pocket), ευθυγραμμισμένη με τα υδρόφοβα κατάλοιπα των πρωτεϊνών της επιφάνειας. Στους εντεροϊούς και ρινοϊούς, αυτή η κοιλότητα (cavity or pocket) περιέχεται στη VP1 πρωτεΐνη (Hendry et al., 1999, Rossmann et al., 1985) και σχετίζεται με την προσκόλληση στον υποδοχέα (Smith et al., 1986), ενώ ταυτόχρονα άλλες μελέτες (Filman et al., 1989) προτείνουν την συμμετοχή της στη ρύθμιση των δομικών αλλαγών του καψιδίου κατά την ελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή.



Εικόνα 5. Η χαρακτηριστική δομή αύλακας των εντεροϊών. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.ralsteachmicro.com/Picornavirus/HCOE_CAI...

Τα τμήματα αυτά συγκεντρώνονται σε πολυποικιλόμορφα τμήματα των θηλειών των καψιδικών πρωτεϊνών, προσδίδουν τον αντιγονικό χαρακτήρα των διαφόρων στελεχών εντεροϊών και παρέχουν έναν επιπρόσθετο προστατευτικό ρόλο στους εντεροϊούς, (αντιγονική ποικιλία), που είναι απαραίτητος για την αποφυγή της πρόσδεσης των αντισωμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος και για την προστασία των υψηλά συντηρημένων τμημάτων του καψιδίου, τα οποία είναι αναγκαία για την προσκόλληση των κυττάρων. Ορισμένες από τις αντιγονικές θέσεις των εντεροϊών είχαν ήδη μελετηθεί πριν από τη ανακάλυψη της τρισδιάστατης δομής των εντεροϊών, αφού ήταν ήδη γνωστό, ότι οι δομικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών οροτύπων, με διαφοροποιήσεις, οι οποίες συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες θέσεις, και κυρίως στις υδρόφιλες περιοχές των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών.

Μια επίσης ποικιλόμορφη περιοχή, με υδρόφοβο, ωστόσο, χαρακτήρα είχε εντοπισθεί στο αμινοτερματικό άκρο της VP1. Αναλύσεις έδειξαν, ότι αυτή η περιοχή μπορεί να αλληλεπιδρά με ενδοσωμικές μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του ιού (Fricks and Hogle, 1990). Σήμερα, η δομική ποικιλομορφία και η λειτουργική σημασία πολλών αντιγονικών θέσεων των εντεροϊών έχουν ήδη διαλευκανθεί (Stanway, 1990), ενώ ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποκαλύπτονται γι' αυτές, μέσω των τεχνικών του προσδιορισμού της πρωτοταγούς διάταξης και της πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής.

Ειδικά για τους Cocksackie A ιούς, η μελέτη των VP1 αλληλουχιών διαφορετικών μελών έχει δείξει, ότι στις προβλεπόμενες αντιγονικές περιοχές υπάρχει αξιοσημείωτη ποικιλία. Η στοίχιση, μάλιστα, των VP1 αλληλουχιών όλων των Cocksackie A προτύπων στελεχών υποδεικνύει, ότι δεν υπάρχουν χαρακτηριστικά που να επιτρέπουν την ταξινόμηση όλων των Cocksackie A σε μία κοινή αντιγονική ομάδα. Αυτό πιθανώς συμβαίνει εξαιτίας του ότι υπάρχει αξιοσημείωτη μοριακή απόκλιση μεταξύ των τριών τύπων Cocksackie A ιών (εκείνων των ειδών HEV-A, HEV-B και HEV-C), με αποτέλεσμα αυτή η ολική ετερογένεια πιθανώς να υπερκαλύπτει την ομοιότητα, που υπάρχει σε έναν μικρό αριθμό καταλοίπων υψίστης σημασίας. Αυτή η ποικιλία δεν παρατηρείται ούτε στην ομάδα των πολιοϊών ούτε στους εντεροϊούς του είδους B, τα οποία αποτελούνται από μέλη με μεγάλη συγγένεια (Hyypia and Stanway, 1993).

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά της στοίχισης των VP1 αλληλουχιών των Cocksackie A ιών εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτής, και στην οποία οι ιοί CAV9 παρουσιάζουν μία εμφανή προέκταση σε σχέση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς. Μέσα σε αυτή την προέκταση, εντοπίζεται ένα μοτίβο RGD (τριπεπτίδιο αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος), το οποίο πιστεύεται, ότι εμπλέκεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε μία μεγάλη ποικιλία συστημάτων (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Το συγκεκριμένο τμήμα είναι υδρόφιλο, βρίσκεται στην επιφάνεια του καψιδίου των CAV9 ιών και η λειτουργική του σημασία αφορά στην προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς (Hyypia and Stanway, 1993). Παρότι οι ακριβείς θέσεις αντιγονικών επιτόπων στους CAV ιούς δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πλήρως, οι πολιοϊοί έχουν μελετηθεί εκτεταμένα ως προς αυτές και έχουν προκύψει αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία μέσω της χρήσης νουκλεοτιδικών στοιχίσεων.

Συμπερασματικά, ο πρωταρχικός ρόλος των καψιδικών πρωτεϊνών έγκειται στο να προσδίδουν στους εντεροϊούς τις αντιγονικές αλλά και άλλες ιδιότητές τους, όπως π.χ. ιδιότητες, που αφορούν στον τρόπο προσκόλλησης στους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών (Stanway, 1990). Πιστεύεται, ότι η VP4, μέσω λειτουργικής τροποποίησης, που περιλαμβάνει σύνδεση με μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Chow et al., 1987) και δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κινάσες (Ratka et al., 1989), συμβάλλει στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή.

Επίσης πιστεύεται, ότι η VP4 παίζει λειτουργικό ρόλο και κατά τη συγκρότηση του καψιδίου των νεοσχηματισθέντων ιών (Chow et al., 1987). Τέλος, στην αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, πιστεύεται ότι συμμετέχει και η VP2, η οποία επίσης παρουσιάζει δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κυτταρικές κινάσες (Ratka et al., 1989).

1.2.3 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες των Picorna ιών κωδικοποιούνται από το 3' μισό του γονιδιώματός τους. Το αρχικό αποτέλεσμα της μετάφρασης παράγει μία πολυπρωτεΐνη, η οποία μέσω μιας αρχικής πρωτεολυτικής διάσπασης, που πραγματοποιείται μέσω της δράσης της 2A, χωρίζεται σε δύο τμήματα, εκείνα των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Η υπόλοιπη επεξεργασία της αρχικής πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται από την 3C.

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες συνολικά είναι επτά, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, αν και σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται ότι και κάποια πρόδρομα μόρια αυτών είναι λειτουργικά. Έτσι, έχειδειχθεί ότι στους πολιοϊούς η πρόδρομος πρωτεΐνη 3CD^{pro} συμμετέχει στην επεξεργασία των πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών του καψιδίου (Yrma-Wong et al., 1988a). Οι λειτουργικές πρωτεΐνες διαφόρων εντεροϊών είναι πιο συντηρημένες σε σχέση με τις δομικές πρωτεΐνες, γεγονός που εκφράζει, πιθανότατα, έλλειψη ανοσολογικής πίεσης και ανάγκη διατήρησης αμετάβλητων ορισμένων τμημάτων με σημαντική λειτουργία, όπως είναι τα ενεργά κέντρα των ενζύμων.

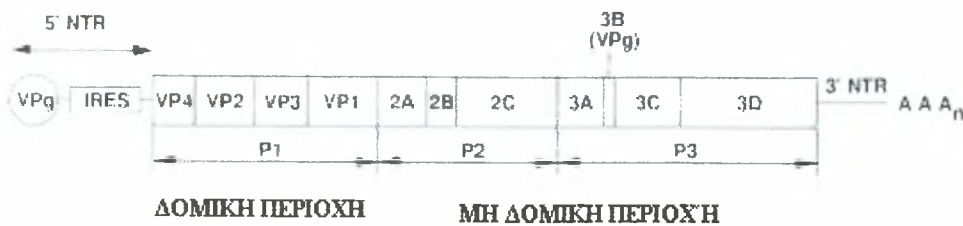
Ειδικότερα για τους Cocksackie A ιούς, όπως συμβαίνει και με τις δομικές τους πρωτεΐνες, η στοίχιση των αλληλουχιών των λειτουργικών περιοχών του γονιδιώματος δεν μπορεί να υποδείξει την μοριακή βάση του φαινοτύπου «CAV» κι αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει τόση ετερογένεια μέσα στην ίδια την ομάδα των Cocksackie A ιών, όση και μεταξύ των Cocksackie A ιών με άλλες ομάδες εντεροϊών. Αντίθετα, στους Cocksackie B ιούς, η ομολογία των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών του γονιδιώματος, που κωδικοποιεί για τις λειτουργικές πρωτεΐνες, είναι υψηλή (Stanway, 1990).

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA, σχετίζονται με διάφορες μεταβολές στον μεταβολικό κύκλο και στην μορφολογία του κυττάρου ξενιστή (Porter, 1993). Ανάμεσα σε αυτές περιλαμβάνονται η αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης, που εξαρτάται από το σύμπλοκο cap (cap-dependent translation), η διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και η αναστολή - αναδιαμόρφωση του κυστιδιακού συστήματος μεταφοράς (vesicular transport system). Οι παραπάνω αλλαγές εξυπηρετούν την δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την πραγματοποίηση του ιϊκού πολλαπλασιασμού

1.2.4 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Οι Picorna ιοί ανήκουν στους μικρότερους RNA ιούς θηλαστικών, που είναι μέχρι σήμερα γνωστοί. Το γονιδίωμα όλων των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7200 – 8500 νουκλεοτίδια, είναι μεταγραφικά ενεργό και κωδικοποιεί για όλες τις πρωτεΐνες των ιών. Στους εντεροϊούς, διακρίνονται, από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), στην οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF), μήκους περίπου 2100 κωδικονίων, από το οποίο κωδικοποιούνται όλες οι (δομικές και λειτουργικές) πρωτεΐνες των ιών και, τέλος, μία 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), η οποία καταλήγει σε μία πολυαδενυλιωμένη ουρά - περιοχή (poly-A tract).

Το ORF διαχωρίζεται επιπλέον στα γονιδιακά τμήματα 1A, 1B, 1C και 1D, τα οποία κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1 αντίστοιχα, ενώ ακολουθούν τα 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, που κωδικοποιούν για τις ομώνυμες λειτουργικές πρωτεΐνες (Stanway, 1990). Οι περισσότερες πληροφορίες, σχετικά με την οργάνωση και πιθανή λειτουργία του γονιδιώματος των εντεροϊών προέρχονται από μελέτες, οι οποίες έγιναν εφικτές μετά τον καθορισμό της πρωτοδιάταξης κάποιων μελών, με πρώτο το στέλεχος Mahoney του πολιοϊού τύπου I (Kitamura et al., 1981). Σήμερα, ολόκληρο το γονιδίωμα όλων των προτύπων ιών Εντεροϊών έχει προσδιοριστεί και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο, μέσω των διεθνών τραπεζών δεδομένων, ενώ επιπρόσθετα, διατίθεται η πλήρης ή μερική αλληλουχία πολλών κλινικών στελεχών.



Εικόνα 6. Το γονιδίωμα των εντεροϊών. Διακρίνονται από το 5' προς το 3' άκρο η 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), το δομικό (P1) και το λειτουργικό (P2) γονιδίωμα και η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR), με την πολυ-Α απόληξη.

1.2.5 Η 5' ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (5' UTR)

Η 5' αμετάφραστη περιοχή των Picorna ιών είναι ασυνήθιστα μεγάλη σε σχέση με αντίστοιχες περιοχές πολλών άλλων ιικών RNA γονιδιωμάτων, συνιστώντας το 8% – 12% της ολικής γενετικής πληροφορίας που περιέχουν. Μεταξύ στενά συγγενικών ιών, η 5' UTR αποτελεί, γενικά, το πιο ομόλογο τμήμα του γονιδιώματός τους και περιέχει ορισμένες ομάδες νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι μερικώς ή ακόμη και πλήρως συντηρημένα (Stanway et al., 1984) από είδος σε είδος. Οι συγκεκριμένες ομάδες νουκλεοτιδίων διαθέτουν, πιθανότατα, συγκεκριμένο και σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή των ιών. Μάλιστα συντηρημένες αλληλουχίες αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται σήμερα ως θέσεις υβριδοποίησης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την επίτευξη στόχων ανίχνευσης μεγάλου εύρους ιών αυτής της οικογένειας (Hyypia et al., 1989, Siafakas et al., 2000, Torgersen et al., 1989).

Στους στενά συγγενικούς εντεροϊούς και ρινοϊούς, η στοίχιση των 5' UTR αλληλουχιών τους δείχνει ένα ποσοστό ομολογίας της τάξης του 60% στα πρώτα 600 νουκλεοτίδια, ενώ, στη συνέχεια, παρατηρείται μία εισαγωγή 100 – 140 νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα των εντεροϊών. Αυτό αποτελεί και ένα από τα λίγα χαρακτηριστικά, που διαφοροποιούν τους εντεροϊούς από τους ρινοϊούς σε μοριακό επίπεδο, όμως η λειτουργική του σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη (Stanway, 1990). Αυτή η συντηρημένη εικόνα που παρουσιάζεται στις 5' UTR αλληλουχίες στενά συγγενικών ειδών υποδεικνύει την σημαντική τους λειτουργία ενώ πειράματα μεταλλαξογένεσης συστήνουν, ότι οι τροποποιήσεις, που μπορούν να πραγματοποιηθούν στις 5' UTR θέσεις χωρίς να επηρεαστούν, σε κάποιο βαθμό, τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των ιών, είναι λίγες (Kuge and Nomoto, 1987, Trono et al., 1988).

Σε όλους τους Picorna ιούς, η 5' UTR παρουσιάζει κάπως διαφορετική νουκλεοτιδική σύνθεση από το υπόλοιπο γένωμα (Stanway et al., 1984, Palmenberg, 1987). Συγκεκριμένα, παρατηρείται μία μειωμένη περιεκτικότητα σε κατάλοιπα αδερίνης (A) και αντιστοίχως μία αυξημένη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη (C). Το αυξημένο ποσοστό βάσεων G και C μπορεί να αντανakλά το γεγονός, ότι η δευτεροταγής οργάνωση παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα της 5' UTR. Στην περίπτωση των εντεροϊών και ρινοϊών, διάφορες εργασίες πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής με συστήματα ηλεκτρονικών υπολογιστών, έχουν παράγει ένα μοντέλο δευτεροταγούς διαμόρφωσης, το οποίο είναι εφαρμόσιμο σε όλα τα στελέχη που έχουν μελετηθεί, αλλά διαφέρει από το προβλεπόμενο μοντέλο αναδίπλωσης των καρδιοϊών και αφθοϊών (Pilipenko et al., 1989, Rivera et al., 1988, Skinner et al., 1989).

1.2.6 Η 3' ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ (3' UTR)

Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του γονιδιώματος των Picorna ιών έχει μήκος, που ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών μελών της οικογένειας (από 40 νουκλεοτίδια στους ρινοϊούς έως 126 νουκλεοτίδια στους καρδιοϊούς). Στους ρινοϊούς, η συγκεκριμένη περιοχή είναι πλούσια σε κατάλοιπα αδερίνης (A) και ουρακίλης (U), ενώ τα κατάλοιπα κυτοσίνης σπανίζουν, με αποτέλεσμα (λόγω του ότι η αδερίνη με την ουρακίλη σχηματίζουν διπλό δεσμό υδρογόνου) να μην προβλέπεται κάποια σταθερή δευτεροταγής δομή στην 3' UTR των ιών αυτών. Όσον αφορά στα λοιπά μέλη της οικογένειας των Picorna ιών, παρόμοιες, σταθερές δευτεροταγείς δομές είναι δυνατό να προβλεφθούν, ενώ η συντηρημένη παρουσία και η συμμεταβλητότητα, που παρουσιάζουν, συστήνει, ότι ίσως, αυτές οι περιοχές, διαθέτουν και κάποια λειτουργική σημασία (Auninen et al., 1989, Inoue et al., 1989).

Με βάση την οργάνωση της 3' UTR οι εντεροϊοί μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, εκείνη των πολιοϊών (η οποία περιλαμβάνει επιπρόσθετα τον εντεροϊό Coxsackie A21 και τους εντεροϊούς των βοοειδών) και εκείνη των Coxsackie B ιών (η οποία περιλαμβάνει επίσης τους εντεροϊούς των χοιροειδών, τον Coxsackie A9 και τους Echo ιούς 6 και 11).

Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων έγκειται στο γεγονός, ότι η ομάδα των Cocksackie B ιών παρουσιάζει, στην 3' UTR, μία πλήρη διάταξη θηλειάς (Stem Loop), η οποία απουσιάζει από την ομάδα των πολιοϊών (Auvinen et al., 1989). Αντίθετα, στους πολιοϊούς, παρουσιάζονται, στην περιοχή αυτή του γονιδιώματος, δύο θηλιές (X και Ψ), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής.

1.3 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η είσοδος ενός ιού σε έναν οργανισμό αρχίζει με την προσκόλληση του ιού σε έναν οι περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκονται διάφορες πρωτεΐνες της επιφάνειας του ιού και του κυττάρου-στόχου. Γνωστοί κυτταρικοί υποδοχείς των εντεροϊών που προσβάλουν τον άνθρωπο παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 2).

Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Foot-and-mouth disease virus	Heparan sulfate	Glycosaminoglycan	
Foot-and-mouth disease virus	$\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Encephalomyocarditis virus	Vcam-1	Ig-like	
Polioviruses 1-3	Pvr	Ig-like	
Coxsackievirus A13, A18, A21	Icam-1	Ig-like	
Coxsackievirus A21	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	Icam-1
Coxsackievirus B1-B6	Car	Ig-like	
Coxsackievirus B1, B3, B5	CD55	SCR-like (complement cascade)	$\alpha_v\beta_6$ -Integrin
Echoviruses 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin(Vla-2)	Integrin	β_2 -Microglobulin
Echoviruses 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	β_2 -Microglobulin
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Enterovirus 70	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	
Bovine enterovirus	Sialic acid	Carbohydrate	
Hepatitis A virus	HAVcr-1		
Major group rhinoviruses (91 serotypes)	Icam-1	Ig-like	
Minor group rhinoviruses (10 serotypes)	Low density lipoprotein receptor protein family	Signaling receptor	
Rhinoviruse 87	Sialic acid	Carbohydrate	

Ig, immunoglobulin; SCR, short consensus repeat

Πίνακας 2. Οι κυτταρικοί υποδοχείς των picorna-ιών. Ανατύπωση από Melnick, 1996.

Η φύση των υποδοχέων των picorna-ίων, παρέμενε αδιασάφηση έως το 1989, όταν οι υποδοχείς για τους πολιοϊούς και τους ρινοϊούς ταυτοποιήθηκαν (Greve et al., 1989, Mendelsohn et al., 1989, Staunton et al., 1989). Χρησιμοποιώντας βιοχημικά εργαλεία, βρέθηκε ότι οι υποδοχείς των πολιοϊών είναι πρωτεϊνικά μόρια. Η επεξεργασία κυττάρων καλλιέργειας με θρυψίνη εμπόδισε την είσοδο των πολιοϊών όχι όμως των Cocksackie B ιών.

Ο υποδοχέας PVR (Poliovirus Receptor) χρησιμοποιείται από όλους τους τύπους των πολιοϊών. Περιγράφηκε για πρώτη φορά με τη χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία εμπόδιζαν ειδικά την προσκόλληση και των τριών οροτύπων πολιοϊών, αλλά όχι αυτή των άλλων Picorna-ίων (Minor et al., 1984, Nobis et al., 1985). Με την επίτευξη της κλωνοποίησης του γονιδίου για τον PVR, η εύρεση της αλληλουχίας του γονιδίου, έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Mendelsohn et al., 1989). Ο PVR αποτελείται από ένα εξωτερικό τμήμα που περιέχει τρεις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική απόληξη. Η κυτταρική λειτουργία του PVR πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και τη συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους, όπως συμβαίνει και με άλλα μέλη της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών.

Ο υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας για τη μείζονα ομάδα των ανθρώπινων ρινοϊών (περίπου 91 ορότυποι), ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα και η αμινοξική αλληλουχία αποκάλυψε μια δομική πρωτεΐνη 95kDa, μέλος επίσης της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών που ονομάζεται ICAM-1 (Greve et al., 1989). Το μόριο ICAM-1 συμμετέχει σε κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων τύπων ιστών καθώς και σε ανοσολογικές λειτουργίες (Springer, 1990, White and Littman 1989). Οι μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξαν ότι ο ICAM-1 έχει μήκος περίπου 19 nm (Staunton et al., 1990) και αποτελείται από πέντε εξωκυττάρια τμήματα τύπου ανοσοσφαιρίνης (Greve et al., 1989, Staunton et al., 1990, Tomassini et al., 1989). Εκτός από τους ρινοϊούς αποτελεί υποδοχέα και για τους ιούς Cocksackie A13, A18 και A21 (Colonno et al., 1989).

Τα πειράματα για την ταυτοποίηση του κυτταρικού υποδοχέα της ομάδας των ιών Cocksackie B είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση και το χαρακτηρισμό μιας πρωτεΐνης περίπου 46 kDa από κύτταρα HeLa (Bergelson et al., 1997, Carson et al., 1997, Tomko et al., 1997) που είναι γνωστή ως CAR (Cocksackievirus and Adenovirus Recceptor) και αποτελείται από 365 αμινοξέα. Πρόκειται για μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών και περιέχει στο εξωκυττάριο τμήμα της μια αμινοτελική V-like και μια C2-like υπομονάδα. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης διαχωρίζεται από τη C2-like υπομονάδα με μια απλή διαμεμβρανική αλληλουχία. Έχει αναφερθεί ότι όταν το κυτταροπλασματικό και διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης απομακρύνθηκε (Wang and Bergelson 1999) η είσοδος των CBV σε κύτταρα Rd εξακολουθούσε να είναι εφικτή.

Επιπλέον οι ιοί Cocksackie B αλληλεπιδρούν με τον DAF/CD55 (Shafren et al., 1995). Οι αλληλεπιδράσεις των ιών Cocksackie B με τους CAR και DAF είναι αρκετά ετερογενείς ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου οροτύπου (Selinka et al., 2004). Στο παρελθόν είχε περιγραφεί άλλη μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας (nucleolin) στενά σχετιζόμενη με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (Hovanessian et al., 2000) ως μέσο πρόσδεσης του ιού στο κύτταρο. Το πρωτεϊνικό αυτό μόριο της κυτταρικής επιφάνειας παρουσιάζει υψηλότερη συνάφεια με το 125S Cocksackie B προ-ιόσωμα παρά με το μολυσματικό 160S ιόσωμα γεγονός που αποτελεί ένδειξη για τη μη συμμετοχή του στην έναρξη ενός παραγωγικού για τον ιό μολυσματικού κύκλου.

Οι υποδοχείς CAR και DAF εκφράζονται αμφότεροι στην ανθρώπινη καρδιά. Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης CAR απαντούν στους παρεμβαλλόμενους δίσκους (intercalated discs), περιοχές μέγιστης σημασίας για τη λειτουργική ακεραιότητα της καρδιάς. Σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση των ιών Cocksackie B με τις πρωτεΐνες CAR όπου αρχίζει το «ξεδίπλωμα» του ιοσώματος, η πρόσδεση στις πρωτεΐνες DAF δεν οδηγεί σε δομικές αλλαγές στο ιικό καψίδιο (Pasch et al., 1999, Shafren et al., 1995). Έτσι ο ρόλος του DAF φαίνεται να περιορίζεται σε αυτόν του συν-υποδοχέα, καθώς διευκολύνει την παρουσίαση των ιοσωμάτων στις πρωτεΐνες CAR.

Μονοκλωνικά αντισώματα που εμποδίζουν τη μόλυνση HeLa κυττάρων από echo ιό τύπου 1, χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών υποδοχέων από τα HeLa κύτταρα. Οι δύο υπομονάδες της ιντεγκρίνης VLA-2 (Very Late Antigen-2), $\beta 1$ (130kDa) και $\alpha 2$ (125kDa), βρέθηκε να είναι τα μόρια που συνδέονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα και εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Bergelson et al., 1992). Η κυτταρική λειτουργία αυτής της ιντεγκρίνης είναι η προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην ενδοκυτταρική επικοινωνία με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Hynes, 1987). Οι κανονικοί εξωκυττάριοι συνδέτες του VLA-2 είναι το κολλαγόνο και η λαμινίνη ενώ οι ενδοκυττάριοι συνδέτες είναι η ταλίνη, η βινκουλίνη και η α-ακτίνη (Elises et al., 1989). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο echo ιός τύπου 1 προσκολλάται στο τμήμα I (Inserted) εντός της υπομονάδας $\alpha 2$ (King et al., 1995) ενώ ο μηχανισμός πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα είναι διαφορετικός από αυτόν που χρησιμοποιεί ο υποδοχέας για την αλληλεπίδρασή του με μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Πολλοί εντεροϊοί προσδένονται στον παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης (decay-accelerating factor) (DAF, CD55), που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ενεργότητας του συμπληρώματος (Bergelson et al., 1994, Karnauchow et al., 1996, Shafren et al., 1997, Ward et al., 1998) Ο DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφοϊνοσιτόλης, που απαντά στη επιφάνεια της πλειοψηφίας των ορο-εκτιθέμενων κυττάρων και τα προστατεύει από τη λύση που προκαλεί το συμπλήρωμα, καθώς επιταχύνει την αποικοδόμηση των μετατροπασών του κλασσικού C3 και C5 μονοπατιού (Lublin and Atkinson 1989). Ο DAF αποτελείται από 4 μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Short Consensus Repeats-SCR) και από ένα τμήμα πλούσιο σε σερίνη και θρεονίνη, το οποίο συνδέεται με φωσφοϊνοσιτόλη (Lublin and Atkinson 1989).

1.4 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.4.1 ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ Η ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το καψίδιο των *ricotna*-ιών είναι συγκροτημένο από αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών σχηματίζοντας εικοσαεδρική συμμετρία. Μεταξύ των μελών της οικογένειας, οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι τοποθετημένες με παρόμοιο τρόπο, η αρχιτεκτονική της επιφάνειας όμως διαφέρει. Αυτή η διαφορά δεν σχετίζεται μόνο με τον ορότυπο, αλλά και με τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς. Έχει δειχθεί ότι οι αύλακες είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Belnap et al., 2000, He et al., 2001, He et al., 2003, Kolatkar et al., 1999, Xiao et al., 2001). Μεταλλαγές σε αμινοξέα της αύλακας των πολιοϊών και των ρινοϊών μπορεί να επηρεάσουν τη συγγένεια πρόσδεσης με τους υποδοχείς (Colston et al., 1994, Colston et al., 1995, Harber et al., 1995, Liao et al., 1997). Αρχικά υπήρχε η θεώρηση ότι οι αύλακες είναι στενές και βαθιές προκειμένου να αποφεύγεται η προσκόλληση ογκωδών αντισωμάτων στο εσωτερικό της (Rossmann et al., 1989). Με αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστευόταν ότι αμινοξέα βασικά για την πρόσδεση με τον υποδοχέα προφυλάσσονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Δομικές μελέτες ενός συμπλέγματος ρινοϊού-αντισώματος, έδειξαν ότι το αντίσωμα μπορεί να διεισδύσει στην αύλακα όπως ακριβώς και ο υποδοχέας ICAM-1 (Smith et al., 1996) προτείνοντας έτσι ότι οι αύλακες δεν παίζουν ρόλο στην αποφυγή της ανοσολογικής αντίδρασης εναντίον του ιού.

Η πρόσδεση των ιών σε διαλυτό μονομερή πρωτεϊνικό υποδοχέα *in vitro* προκαλεί μια αμετάκλητη δομική αλλαγή στο ιικό σωματίο η οποία εκδηλώνεται ως αλλαγή στα χαρακτηριστικά καθίζησης του ιού (από 160 S στο ώριμο ιόσωμα σε 135 S στο A-σωμάτιο) (Hoover-Litty and Greve, 1993). Παρόμοιες αλλαγές στο συντελεστή καθίζησης, έχουν παρατηρηθεί όταν ο ιός αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, και τέτοιοι μετασχηματισμοί θεωρείται ότι είναι βασικοί για την επιτυχή είσοδο του ιού και τη μόλυνση (Fenwick and Cooper, 1962).

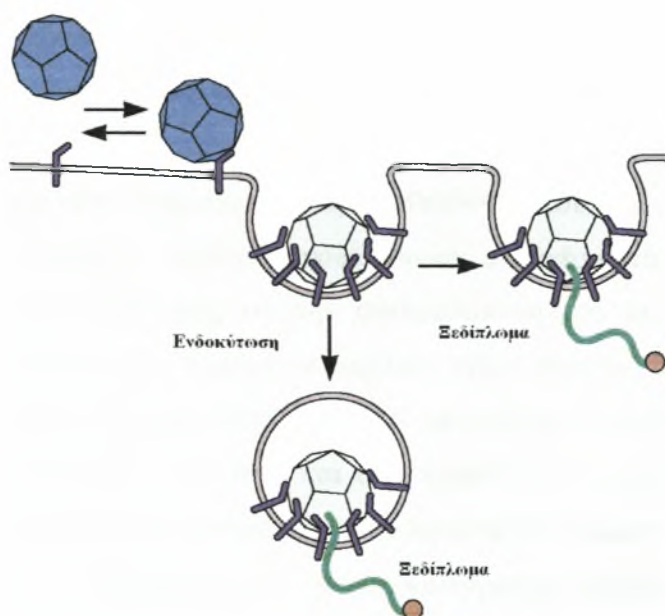
Οι δομικές ανακατατάξεις που οδηγούν σε αλλαγές στην καθίζηση περιλαμβάνουν απώλεια της VP4 και εξωτερίκευση του N άκρου της VP1, που υπό κανονικές συνθήκες εδράζει εσωτερικά στο καψίδιο περιβάλλοντας τις πενταμερείς κορυφές του ώριμου ιοσώματος. Το προεξέχον άκρο της VP1, το οποίο είναι υδρόφοβο, ενώνεται με τη μεμβράνη και σχηματίζει μια δίοδο μέσω της οποίας το γένωμα του ιού εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Guttman and Baltimore, 1990).

Μετά την πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να αποδομηθεί προκειμένου να απελευθερώσει το RNA το οποίο στη συνέχεια θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα ακολουθήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού. Για κάποιους *ricoina*-ιούς, η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Για άλλους *ricoina*-ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών προκειμένου να απελευθερωθεί το γένωμα του ιού.

Η αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον υποδοχέα τους, PVR, οδηγεί το καψίδιο σε δομικές αλλαγές. Σχηματίζονται τα *A σωμάτια* τα οποία περιέχουν το ιικό RNA, έχουν όμως χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, το N-τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, έρχεται στην επιφάνεια του *A σωματίου* (Fricks et al., 1990). Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και έτσι τα *A σωμάτια* έχουν αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιικό σωματίο. Έτσι σύμφωνα με μια υπόθεση εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο, η πρόσδεση στον υποδοχέα οδηγεί στις παραπάνω δομικές αλλαγές: το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο διαμέσου του οποίου το RNA ταξιδεύει προς το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 7). Τα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία *A σωμάτια* όταν προστεθούν σε λιπιδική διπλοστιβάδα, επάγουν τη δημιουργία ιοντικών καναλιών, ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση (Tosteson et al., 1997). Αν και πιστεύεται ότι το RNA των πολιοϊών διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, δεν είναι γνωστό αν αυτό συμβαίνει μέσω της πλασματικής ή της ενδοσωματικής μεμβράνης.

Φάρμακα όπως το bafilomycin A1, που εμποδίζουν την οξίνιση των ενδοσωμάτων μέσω αναστολής της μεταφοράς πρωτονίων στα κυστίδια, δεν ανέστειλαν τη μόλυνση με πολιοϊούς (Perez and Carrasco 1993).

Ιόσωμα 160S



Εικόνα 7. Το ιόσωμα προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα και υφίσταται τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούν την παραγωγή των Α σωμάτων τα οποία είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει τη VP4 καψιδική πρωτεΐνη. Το N-τελικό άκρο της VP1 έχει μεταφερθεί στην επιφάνεια και το ιικό RNA (καμπυλοειδής γραμμή), εξέρχεται από το σωματίο είτε από την πλασματική μεμβράνη, είτε διαμέσου των ενδοσωμάτων. Ανατύπωση από Belnap et al. 2000.

1.4.2 ΞΕΔΙΠΛΩΜΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Οι Picorna-ιοί, απαιτούν τη διαδικασία της ενδοκύτωσης προκειμένου να εισέλθουν στο κύτταρο γεγονός το οποίο έχει δείχθει τόσο μορφολογικά όσο και βιοχημικά. Η έναρξη για το ξεδίπλωμα του ιού γίνεται με την πτώση του pH στο ενδόσωμα. Όταν το pH είναι περίπου 6.5, το ιικό καψίδιο διαχωρίζεται στα πενταμερή, απελευθερώνοντας το ιικό RNA (van Vlijmen et al., 1998). Τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα προσφέρουν σταθερότητα στο καψίδιο. Καθώς το pKa της ιστιδίνης είναι 6.8, κοντά στο pH όπου ο ιός αποδομείται η προσθήκη πρωτονίων στις πλευρικές αλυσίδες της ιστιδίνης πιθανόν να προκαλεί ηλεκτροστατική απώθηση που οδηγεί σε αποδιοργάνωση του ιοσώματος (Curry et al., 1995). Πειράματα μεταλλαξιγένεσης κατά τα οποία ένα κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 142 της πρωτεΐνης VP3 αλλάχθηκε σε αργινίνη οδήγησαν σε καψίδια περισσότερο σταθερά σε χαμηλά pH ενισχύοντας τον πιθανό ρόλο της ιστιδίνης στην αποδιοργάνωση του ιικού καψιδίου (Ellard et al., 1999).

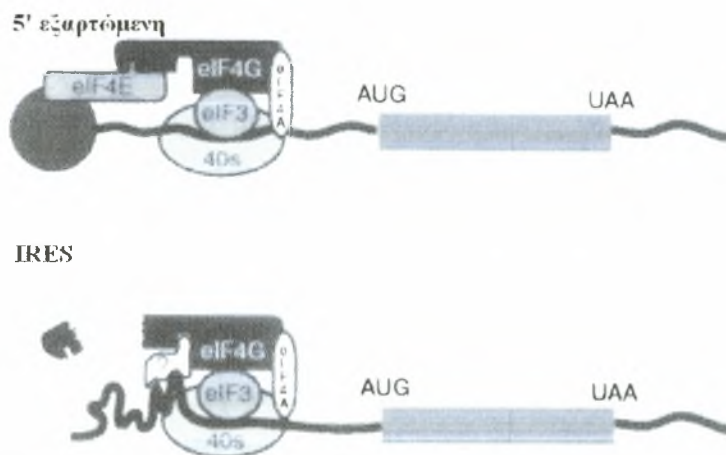
Η υδρόφοβη κοιλότητα (hydrophobic pocket) που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια κάθε πρωτομερούς, φαίνεται πως είναι βασικός ρυθμιστής των δομικών μεταβολών που επάγονται από τον υποδοχέα του ιού. Η εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου επιτρέπει στην κοιλότητα αυτή να περιέχει έως 60 λιπιδικά μόρια. Τα λιπίδια πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σταθερότητα του ιού, και ελέγχουν την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές αλλαγές κατά την προσκόλληση του σε κυτταρικούς υποδοχείς για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρικό περιβάλλον. Την παραπάνω υπόθεση ενισχύουν μελέτες κατά τις οποίες αντικά φάρμακα όπως το παρασκεύασμα WIN, εκτοπίζουν τα λιπίδια, προσδένονται σταθερά στην υδρόφοβη κοιλότητα, και έτσι εμποδίζουν τη μολυσματικότητα του ιού, καθώς η αλλοίωση της χωροδιάταξης του κατώτερου τμήματος της αύλακας, δεν επιτρέπει την προσκόλληση του ιού στους κυτταρικούς υποδοχείς (Lewis et al., 1998).

1.4.3 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Κατά την είσοδο του στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, το ιϊκό RNA συπεριφέρεται όπως τα mRNA του ξενιστή λόγω της θετικής πολικότητας. Μετά την είσοδο του γενωμικού RNA στο κυτταρόπλασμα, αυτό πρέπει να μεταφραστεί αφού δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και κανένα ιικό ένζυμο δεν μεταφέρεται στο κύτταρο. Το θετικής πολικότητας RNA γένωμα, δεν είναι μεθυλιωμένο και απουσιάζει η 5' καλύπτρα (cap). Το RNA του ιωσώματος είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη VPg, η οποία απομακρύνεται από το κυτταρικό ένζυμο, την VPg-Unlinkase κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο προκειμένου να αρχίσει η πρωτεϊνσύνθεση (Ambros et al., 1980).

Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενώματος των πολιοϊών, αποκάλυψε μια μη-μεταφραζόμενη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων που περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Kitamura et al., 1981, Racaniello and Baltimore, 1981) και τις αλληλουχίες IRES, που υποβοηθούν την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος με την προσκόλληση των ριβοσωμάτων σε αυτές.

Η έναρξη της μετάφρασης απαιτεί μια ομάδα κυτταρικών πρωτεϊνών έναρξης που θα την ενεργοποιήσουν. Σύμφωνα με ένα μοντέλο για το μηχανισμό πρόσδεσης στο ριβόσωμα, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στο IRES μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής με τον eIF3 ο οποίος έχει σχηματίσει σύμπλοκο με το C-τελικό τμήμα του eIF4G (Εικόνα 8).

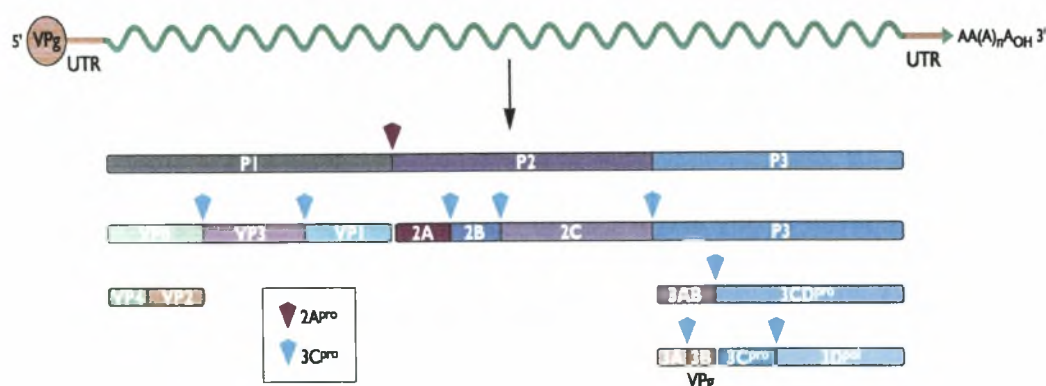


Εικόνα 8. Στην 5' εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα αλληλεπιδρά με το mRNA μέσω του eIF3, ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με τους eIF4G, eIF4A (ελικάση απαραίτητη για το ξεδίπλωμα δευτεροταγών δομών του RNA) και eIF4E (πρόσδεση στη δομή cap). Στην IRES εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, το σύμπλοκο eIF3-40S προσδένεται στο RNA μέσω της αλληλεπίδρασης του eIF4G με κυτταρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το IRES. Ανατύπωση από Melnick, 1996

Μια άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης και δημιουργεί σύμπλοκο με το IRES είναι αυτή που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein) και ρυθμίζει το splicing του πρόδρομου m-RNA (Hellen et al., 1993). Άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή απαραίτητες για την έναρξη της μετάφρασης είναι η Unr (Upstream of N-Ras) (Boussadia et al., 2003, Costa-Mattioli et al., 2004, Murray et al., 2001,) και η poly r (C) πρωτεΐνη PCBP (Poly r (C) Binding Protein). Η τελευταία έχει βρεθεί ότι προσδένεται στο stem-loop IV του IRES τύπου I καθώς και στη δομή cloverleaf (Blyn et al., 1996, Parsley et al., 1997).

1.4.4 ΠΡΩΤΕΟΛΥΣΗ ΤΗΣ ΪΚΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Από τη μετάφραση του γενετικού υλικού του ιού δημιουργείται η ιϊκή πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια θα υποστεί πρωτεόλυση ώστε να προκύψουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού και τη βιωσιμότητα του. Οι πρωτεΐνες των *picorna*-ιών συντίθενται από τη μετάφραση ενός επιμήκους ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του θετικής πολικότητας μονόκλωνου RNA, η οποία ακολουθείται από την πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης από τις ιϊκές πρωτεάσες (Εικόνα 14). Αυτή τη πρωτεολυτική διαδικασία μπορούμε να τη διαχωρίσουμε σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο έχουμε τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης στην περιοχή της P1 και στις περιοχές P2 και P3 όπου γίνεται με τη δράση της ιϊκής πρωτεάσης 2A^{pro}. Στο δεύτερο στάδιο έχουμε την πρωτεόλυση όλων των περιοχών από τις ιϊκές πρωτεάσες 3C^{pro} και 3CD^{pro}, παίρνοντας ως προϊόντα τις δομικές πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3 καθώς και όλες τις λειτουργικές πρωτεΐνες και τις ενδιάμεσες μορφές αυτών. Όλοι οι *picorna*-ιοί κωδικοποιούν την 3C^{pro} η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της 2C από την 3A πρωτεΐνη. Η 3C^{pro} των πολιοϊών αναγνωρίζει μόνο θέσεις όπου απαντά το διπεπτίδιο Gln-Gly, ενώ η 3C^{pro} των υπόλοιπων *picorna*-ιών, είναι δραστική σε άλλες θέσεις που περιλαμβάνουν Gln-Ser, Gln-Ile, Gln-Asn, Gln-Ala, Gln-Thr, και Gln-Val. (Melnick, 1996). Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει κυρίως τη διάσπαση της VP0 στις δομικές πρωτεΐνες VP4 και VP2. Τέλος κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης σε όλα τα στάδια παρατηρείται η σύνδεση του μυριστικού οξέος με το αμινοτελικό άκρο όλων των πολυπεπτιδίων. (Petersen et al., 1999, Sommergruber et al., 1994, Voss et al., 1995, Wimmer et al 1999, Agol et al., 1999).



Εικόνα 9. Πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης. Ανατύπωση από Agol et al., 1999.

1.4.5 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΪΚΟΥ mRNA

Η διαδικασία της αντιγραφής λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) του ξενιστή, όπου συμμετέχουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες καθώς και οι κυτταρικές πρωτεΐνες του ξενιστή. Το σημείο κατά το οποίο διαχωρίζεται το στάδιο της μετάφρασης από το στάδιο της αντιγραφής επιτυγχάνεται από τη δομή cloverleaf (88nt) που είναι στο 5'-ακρο καθώς και από τη δράση ιϊκών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι το 5' – cloverleaf είναι ο γενικός ρυθμιστής αυτών των διεργασιών (D.J. Barton et al 2001).

Στους εντεροϊούς το θετικής πολικότητας RNA γένωμα πολλαπλασιάζεται μέσω ενός ενδιάμεσου αρνητικής πολικότητας μορίου. Στη φάση του πολλαπλασιασμού τρεις μορφές RNA απαντούν στο κύτταρο: μονόκλωνο RNA, replicative intermediate (RI) και replicative form (RF). Το μονόκλωνο RNA απαντά ως η πιο άφθονη μορφή και είναι αποκλειστικά θετικής πολικότητας. Στην RI μορφή απαντούν συνδεδεμένες στο αντιγραφόμενο μόριο 6-8 αναπτυσσόμενες αλυσίδες αρνητικής πολικότητας. Η RF μορφή είναι μια δίκλωνη δομή που απαρτίζεται από ολόκληρο το ιϊκό RNA συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του αντίγραφο. Η αναπαραγωγή του ιϊκού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση του +RNA είναι 25 έως 65 φορές μεγαλύτερη από αυτή των -RNA (Giachetti and Semler, 1991, Novak et al., 1991).

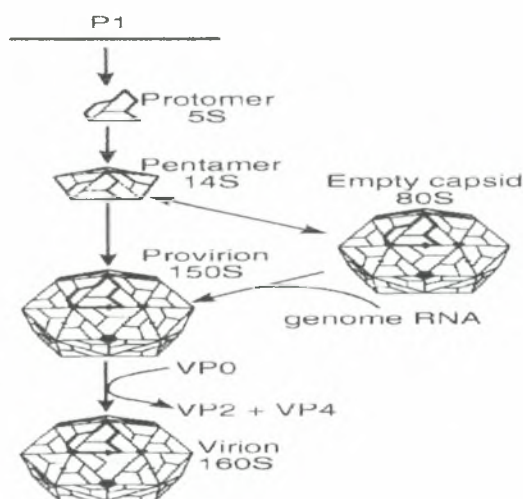
Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής του RNA, απαραίτητος είναι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου αντιγραφής αποτελούμενου από ιϊκές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B και οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2 καθώς και ιϊκό RNA, το οποίο περιέχει cis-acting στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA (Egger et al., 2000). Η δομή cloverleaf της 5'UTR παίζει σημαντικό ρόλο καθώς στο stem-loop D αυτής σχηματίζεται το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που απαρτίζεται από την ιϊκή πρωτεΐνη 3CD^{pro} καθώς και την κυτταρική πρωτεΐνη PCBP και απαιτείται για τη σύνθεση θετικής και αρνητικής πολικότητας αλυσίδων RNA.

Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 3AB, η οποία περιέχει υδρόφοβες περιοχές μέσω των οποίων έρχεται σε επαφή με κυτταροπλασματικές μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή (Townner et al., 1996). Η πρωτεΐνη 3AB στη συνέχεια ουριδιλιώνεται παρουσία UTPs, ιϊκού RNA, και Mg^{2+} και διαχωρίζεται με τη βοήθεια της 3CD προκειμένου να απελευθερώσει τη VPg-pUpU (Paul et al., 1998). Η πρόδρομη 3CD διαχωρίζεται στις $3C^{pro}$ και $3D^{pol}$, εκ των οποίων η τελευταία χρησιμοποιεί τη VPg-pUpU ως εκκινητικό μόριο που φαίνεται να προσδένεται στην poly(A) ουρά του 3'UTR του γενώματος του ιού στο 3' άκρο του για τη σύνθεση του -RNA και +RNA (Herold and Andino, 2000, Paul et al., 1998).

Ιοί οι οποίοι περιέχουν μεταλλαγή στην 3AB η οποία προκαλεί μείωση της υδροφοβικότητάς της, είναι ελαττωματικοί στην έναρξη της σύνθεσης του RNA, στην *in vitro* ουριδιλίωση της VPg και στην *in vivo* σύνθεση θετικής πολικότητας κλώνων RNA (Giachetti et al., 1990, Giachetti et al., 1992) (Εικόνα 10). Εκτός από την δομή cloverleaf και την poly(A) ουρά, μια άλλη δομή του RNA του ιού συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής και την δημιουργία του εκκινητικού μορίου. Η δομή αυτή βρίσκεται στην περιοχή της 2C του γενώματος, έχει μορφή θηλιάς και είναι γνωστή ως στοιχείο CRE (Goodfellow et al., 2000a).

Η διαδικασία αυτή παράγει το πρώτο μορφογενετικό ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, μια άωρη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή συναρμολογούνται για να δημιουργήσουν το πενταμερές 14S (Palmenberg, 1982). Τα πενταμερή είναι σημαντικά ενδιάμεσα στη μορφογένεση όλων των picorna-ίων (Boege et al., 1986, Rombaut et al., 1990). Με αυτή την αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι το γενετικό υλικό εσωκλείεται από 12 πενταμερή δημιουργώντας το πρόνιμο ιικό στέλεχος (provirion).

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει το πρωτεολυτικό ρήγμα της VP0 σε VP2 και VP4. Η πρωτεάση που επιτελεί αυτό το ρήγμα παραμένει άγνωστη. Πρόκειται για μια αυτοκαταλυτική διαδικασία, για την οποία έχει προταθεί ότι ένα συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης στη VP2 εμπλέκεται στην κατάλυση της αντίδρασης (Curry et al., 1997), ο μηχανισμός όμως παραμένει άγνωστος.



Εικόνα 11. Μορφογένεση των picorna-ίων. Ανατύπωση από Melnick, 1996

1.5 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Κατά την εξέλιξη τους οι εντεροϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα, λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξης τους. Αυτή η ποικιλομορφία οφείλεται σε δυο μηχανισμούς, τη μεταλλαξιγένεση και τον γενετικό ανασυνδυασμό (Domingo E. and Holland J.J. 1997).

1.5.1. ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των πολιοϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λαθών της ιϊκής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και στην απουσία μηχανισμού ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιϊκού γενώματος είναι εκείνες, που κωδικοποιούν για τις καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, και κυρίως τα τμήματα αυτών που εκτίθενται στην ιϊκή επιφάνεια. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1, περιέχει, όπως προαναφέρθηκε, τις κυριότερες αντιγονικές θέσεις και κατά συνέπεια δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των λεγόμενων «quasi-spesies» (σχεδόν είδος) δηλαδή μεγάλων πληθυσμών ιών που περιλαμβάνουν διαφορετικούς γονοτύπους. Κύριο χαρακτηριστικό ενός «quasi-species» αποτελεί το γεγονός, ότι τα μέλη που το αποτελούν, δεν διαθέτουν μία μοναδική αλλά μία κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrilin et al., 2000).

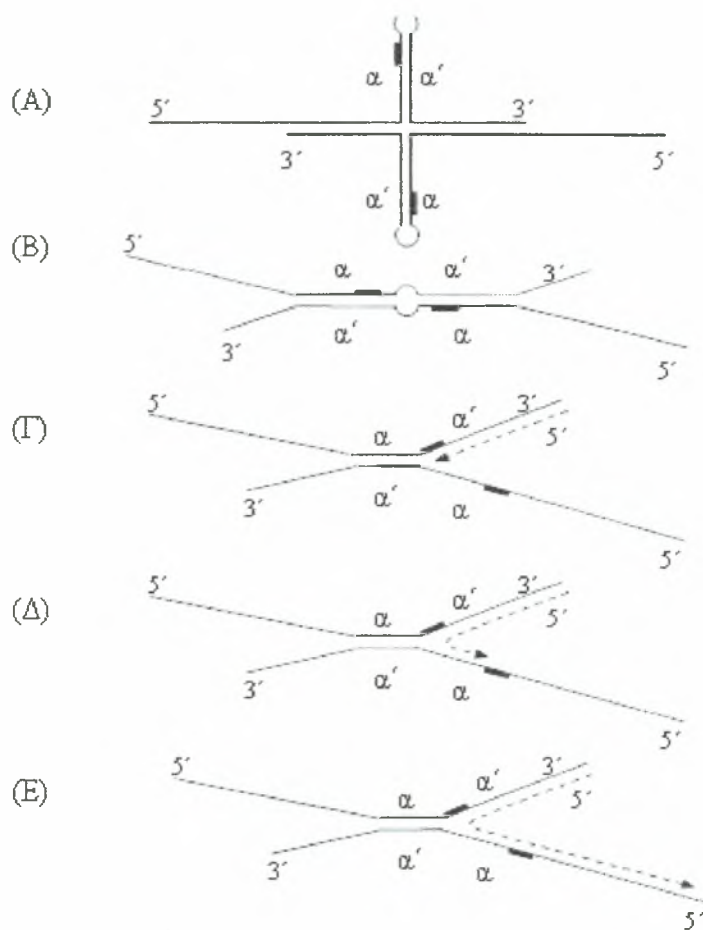
1.5.2 ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο γενετικός ανασυνδυασμός είναι το κυριότερο εργαλείο του εξελικτικού μηχανισμού των πολιοϊών και γενικά των εντεροϊών. Αν ο ανασυνδυασμός γίνεται μεταξύ στελεχών του ίδιου ορότυπου τότε αναφέρεται ως ενδο-τυπικός ανασυνδυασμός, ενώ αν συμβεί μεταξύ στελεχών διαφορετικού ορότυπου, ως δια-τυπικός ανασυνδυασμός (Mulders et al. 1999, Hovi et al. 2004)

Οι ανασυνδυασμοί κυρίως παρουσιάζονται στις περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών, και πιο συχνά στις κωδικές περιοχές 2C και 3D (Georgopoulou, A. and Markoulatos, P. 2001). Στις κωδικές περιοχές των δομικών περιοχών δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ ανασυνδυασμοί, παρά μόνο στο τέλος της πρωτεΐνης VP1, αν και είναι σπάνιοι. (Blomqvist et al 2003, Martin et al 2002).

Για τον γενετικό ανασυνδυασμό έχουν προταθεί δυο μηχανισμοί: 1) ο μηχανισμός σπασίματος – επανένωσης και 2) ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας ο πρώτος μηχανισμός είναι ένας μη αντιγραφικός μηχανισμός και σύμφωνα με αυτόν, τα μόρια του ιϊκού RNA κόβονται σε κάποιες θέσεις και τα εκτιθέμενα άκρα τους ενώνονται. Ο ευρύτερα αποδεκτός μηχανισμός για τον ανασυνδυασμό του RNA των πολιοϊών είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) από την 3D πολυμεράση κατά την διάρκεια της (-) σύνθεσης νέου RNA (Jarvis and Kirkegaard, 1992, Kirkegaard and Baltimore, 1986). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA (γι' αυτό αναφέρεται και ως ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου). Σύμφωνα με το μοντέλο των Romanova et al. (Romanova et al., 1986), η 3D πολυμεράση, κατά την σύνθεση του RNA, συναντά κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας, ως μήτρα, ένα εναλλακτικό ιϊκό RNA, παρόμοιας δευτεροταγούς δομής.

Έχει προταθεί, ότι το εμπόδιο, που συναντά η ιϊκή πολυμεράση, μπορεί να είναι μια δευτεροταγής δομή φουρκέτας, η οποία σχηματίζεται από την παρουσία αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα (Romanova et al., 1986). Το αποτέλεσμα είναι να μεταπηδά η 3D πολυμεράση από το ένα μόριο στο άλλο. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από την παρατήρηση, ότι ο ανασυνδυασμός προάγεται στα πλαίσια των μεικτών συμπλόκων αντιγραφής, τα οποία είναι πολύπλοκα συστήματα αντιγραφής με περισσότερα από ένα μόρια RNA (Egger and Bienz, 2002).



Εικόνα 12: Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που, χρησιμεύουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δυο αντίστοιχες επανάληψεις είναι οι α και α', ενώ οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις, όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. Ανατύπωση από Romanova et al., 1986.

1.5.3 Ο ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗ – ΠΟΛΙΟ – ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ

Σήμερα, εξαιτίας του γεγονότος, ότι η εξάλειψη των πολιοϊών φαίνεται εφικτή, ένα μεγάλο μέρος των επιστημονικών ερευνών έχει στραφεί προς τους εντεροϊούς. Οι πρώτες ενδείξεις ανασυνδυασμού στους ιούς αυτούς προέρχονται από μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν γύρω από την πλήρη αλληλουχία ενός μέλους του είδους HEV-C των εντεροϊών, του στελέχους Cocksackie A21, το οποίο παρουσίαζε, στο μη δομικό γονιδίωμα, μεγάλη ομολογία με τους πολιοϊούς (Hughes et al., 1989). Στη συγκεκριμένη μελέτη η πρωταρχική θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε μεταξύ των 2C και 3C γενετικών περιοχών, χωρίς, ωστόσο, να ακολουθήσει κάποια φυλογενετική ανάλυση του στελέχους, η οποία θα ήταν ικανή να

αποδεικνύει την υπόθεση αυτή. Κατά όμοιο τρόπο, υποστηρίχθηκε, ότι το πρότυπο στέλεχος Hill (Echo 9) είναι ανασυνδυασμένο στέλεχος των προτύπων στελεχών Metcalf (Echo 18) και Barty (Echo 9) (Andersson et al., 2002).

Μία πρώτη προσπάθεια εκτίμησης του ανασυνδυασμού σε ολόκληρο το γονιδίωμα των εντεροϊών πραγματοποιήθηκε το 1999 (Santti et al., 1999). Η ανάλυση όλων των διαθέσιμων, μέχρι τότε, αλληλουχιών (34 αλληλουχίες, οι οποίες αντιπροσώπευαν 24 οροτύπους εντεροϊών) απέδειξε, ότι έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός κατά την μακροεξελικτική ιστορία του γένους. Ως αποτέλεσμα αυτού του ανασυνδυασμού, τα μέλη των ειδών HEV-A και HEV-B των εντεροϊών διαθέτουν 5' μη κωδική περιοχή τύπου II, ενώ τα μέλη των ειδών HEV-C και HEV-D μοιράζονται παρόμοια 5' NTR, τύπου I, η οποία είναι διαφορετική από την προαναφερόμενη .

Τέλος, η πλήρης γενωμική ανάλυση όλων των προτύπων στελεχών του είδους HEV-B, η οποία παρουσιάστηκε πρόσφατα (Oberste et al., 2004c), παρέχει αρκετές αποδείξεις και παραδείγματα τυχαίου ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών μελών ενός συγκεκριμένου είδους εντεροϊών, ενώ ταυτόχρονα, παρουσιάζονται ποικίλα πρότυπα ανασυνδυασμού στα στελέχη που μελετήθηκαν. Έτσι, ενώ πολλά στελέχη περιείχαν πρόσφατα «ίχνη» ανασυνδυασμού στη μη καψιδική περιοχή του γονιδιώματός τους, αποτελώντας έτσι, ένα σημαντικό κομμάτι της «παγκόσμιας δεξαμενής ανταλλαγής γονιδίων» στους εντεροϊούς, άλλα έμεναν «απόντα» από την εξέλιξη των εντεροϊών, παρουσιάζοντας σπάνια ανασυνδυασμούς. Το πιο επικρατές παράδειγμα της τελευταίας «μη εξελιγμένης» ομάδας ιών υπήρξε το στέλεχος Bastianni (Echo 30), το οποίο παρουσιαζόταν φυλογενετικά απομακρυσμένο από τα λοιπά πρότυπα στελέχη. Πρόσφατα, ωστόσο, αποδείχθηκε, ότι η μη καψιδική περιοχή του συγκεκριμένου στελέχους έχει διαδοθεί τμηματικά, μέσω ανασυνδυασμού, σε πολλά άλλα πρότυπα στελέχη, τα οποία έχουν απομονωθεί πιο πρόσφατα (προς το τέλος της δεκαετίας του '90) (Lukashev et al., 2003a).

1.5.4 ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες, οι οποίες προτείνουν, ότι τα είδη των εντεροϊών υφίστανται ως ένα πεδίο από καψιδικά γονίδια και μία δεξαμενή από λειτουργικά γονίδια και 5' μη κωδικές περιοχές (Lukashev et al., 2003a, Oberste et al., 2004c, Santti et al., 1999). Αυτά τα τμήματα γενετικής πληροφορίας εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, ακόμη και σε μικροεξελικτικό επίπεδο, και ανασυνδυάζονται ελεύθερα, παρέχοντας, έτσι, τη δυνατότητα παραγωγής ποικιλιών μιας αρχικής δομής, με μη προβλέψιμες ιδιότητες..

Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο μοριακής επιδημιολογίας των εντεροϊών, το οποίο παρουσιάζει μία προσαρμοστικότητα με χαρακτήρα παγκοσμίου εμβέλειας, μιας και έχει πολλές φορές παρατηρηθεί, ότι υπότυποι ή γενότυποι εντεροϊών προκαλούν επιδημίες, εξαπλώνονται διεθνώς εντός μερικών χρόνων, κυκλοφορούν για κάποια επιπρόσθετα χρόνια και στη συνέχεια εξαφανίζονται, δίνοντας τη θέση τους σε νέες ποικιλίες. Κατά συνέπεια, μπορεί να υποστηριχθεί, ότι το γένος των εντεροϊών υφίσταται ως μία παγκόσμια δεξαμενή γενετικού υλικού, η οποία εξελίσσεται χρησιμοποιώντας ως μέσα τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς (Lukashev et al., 2005a).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες στελεχών εντεροϊών που είχαν απομονωθεί από αντίστοιχα περιβαλλοντικά δείγματα. Η αρχική απομόνωση και αναγνώριση των στελεχών έγινε μεταξύ 14/7/2006 και 18/9/2006. Για την απομόνωση και την καλλιέργεια των ιών χρησιμοποιήθηκαν Rd κύτταρα. Τα Rd κύτταρα αποτελούν ανθρώπινη κυτταρική σειρά ραβδομυοσاركώματος. Είναι κύτταρα προσκολλούμενα και έχουν ατρακτοειδή μορφή. Οι κυτταροκαλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν συντηρημένες στους -80°C .

2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Για την εκχύλιση του ιϊκού RNA, εφαρμόστηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Cases et al, 1995) με τις παρακάτω τροποποιήσεις: Αρχικά, για την λύση των κυττάρων επώσθησαν 100μl από κάθε μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια (μετά από την απόψυξή της) με 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^{\circ}\text{C}$) για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400 μl ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20°C). Μετά από ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό, τα δείγματα διατηρήθηκαν στον πάγο για 20 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις $14.000 \times g$ (σε θερμοκρασία 4°C). Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο διάλυμα και στο ίζημα προστέθηκαν 500 μl αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις $14.000 \times g$ για 10 λεπτά. Μετά την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, στο απομονωθέν RNA ακολούθησε επαναδιάλυση σε 100μl απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού, ελεύθερου νουκλεασών. Τα RNA των δειγμάτων φυλάχθηκαν στους -20°C .

Διαλύματα:

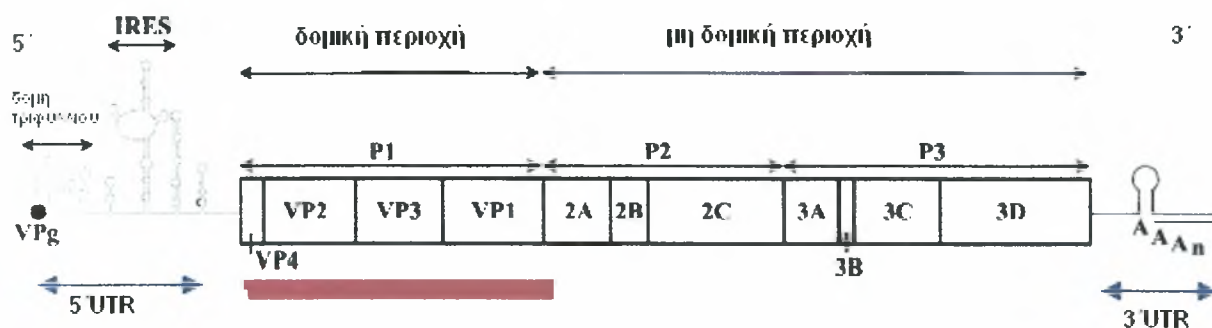
- Διάλυμα Θειοκυανούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol, 25 mM sodium citrate.

2.3 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3 μαζί με τις αλληλουχίες τους, το μήκος του προϊόντος και την περιοχή του ιϊκού γενώματος που ενισχύουν. Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων στην παρούσα εργασία έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Primer3, Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>) πάνω σε γνωστές αλληλουχιμένες περιοχές. Οι εκκινητές συντέθηκαν από την Metabion (Martinsried, Germany).

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Γενωμική Περιοχή	Βιβλιογραφία
72437	1-20	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	5'UTR	Mulders et al. (1999)
216616	545-565	Antisense	GGAACACGGACACCCAAAGTA	5'UTR	Blomqvist et al. (1999)
0340F	310	Sense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC	5'UTR	Lukashev et al., 2005
1200R	1196-1177	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	VP4	Lukashev et al., 2005
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	2C	Caro et al. (2001)
222	2895-2912	Antisense	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	Oberste et al. (2003)
292	2554-2570	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	VP1	Oberste et al. (2003)
ZL2550	2550-2570	Sense	AGACGGGGCATACATCACAG	VP1	Παρούσα εργασία
ZR3040	3040-3060	Antisense	TACCCCATTTTTCGCGAGAAGT	VP1	Παρούσα εργασία
AL897	897-1007	Sense	GGAAGTTTACCGAGCCAGTT	VP4	Παρούσα εργασία
AR3091	3071-3091	Antisense	TTGTTTCAGAGCGTTGTAGGC	VP1	Παρούσα εργασία
AL1632	1632-1652	Sense	GCACCCTTGGATTACACTGC	VP2	Παρούσα εργασία
AR2180	2160-2180	Antisense	CATTGCCTGTTTCCTGTTCG	VP3	Παρούσα εργασία
AL939	939-959	Sense	TGCCTGCTCTAAACTCACCA	VP4	Παρούσα εργασία
AR2751	2731-2751	Antisense	GCACCATCCTTCTTGCATTT	VP1	Παρούσα εργασία
BL870	870	Sense	CGACAGGATTTACACAGGA	VP4	Παρούσα εργασία
BR3231	3231	Antisense	GCTTTTCACATACGGGCTAA	VP1	Παρούσα εργασία
BL1369	1369	Sense	GAGGTTGTTCGAGCTTCTCT	VP2	Παρούσα εργασία
BR2580	2580	Antisense	GGGAACCACTTGTGAGGTGT	VP1	Παρούσα εργασία
CL995	995	Sense	CATCACTCTCGGCAACTCAA	VP2	Παρούσα εργασία
CR3152	3152	Antisense	CTTGCTGGTAATCGGGCTAA	VP1	Παρούσα εργασία
CL1659	1659	Sense	CATCAACCTACATCCCAATAACC	VP2	Παρούσα εργασία
CR2648	2648	Antisense	GAAGTTTTCCACTGACGATTCC	VP1	Παρούσα εργασία

Πίνακας 3: Παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους και η πολικότητά τους.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του γονιδιώματος που πολλαπλασιάστηκαν μέσω ειδικά επιλεγμένων εκκινητών

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ - ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR)

Για την σύνθεση cDNA από το προϊόν της εκχύλισης του RNA, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Αρχικά, 5μl από το RNA επώασθηκαν με 1μl τυχαίων εκκινητών (random primers) d(N)₉ (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), 1 μl 10 mM dNTPs και 5μl νερό ελεύθερο από νουκλεάσες στους 65 °C για 5 min. Εν συνεχεία τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως στον πάγο, σε καθένα απ' αυτά προστέθηκε μείγμα αποτελούμενο από: 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (first strand buffer), 2μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 0,5 μl αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV 200 u/μl (Promega Corporation Madison WI, USA) και 0,5 μl αναστολέα ριβονουκλεασών, RNase Inhibitor 20 u/μl (HT Biotechnology, UK). Τέλος, προστέθηκε απεσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό (Sigma Aldrich, St Louis MO) μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Ακολούθησε επώαση στους 25 °C για 12min, στους 42 °C για 50 min και στην συνέχεια στους 70 °C για 15 min.

Καθορισμένα τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) με την βοήθεια των εκκινητικών μορίων, που περιγράφηκαν παραπάνω. Το μείγμα συνίστατο από: 3μl από κάθε cDNA, 2μl εκκινητικών μορίων συγκέντρωσης 25pmol, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Taq reaction buffer), 4μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), MgCl₂ 2mM, 0.5 μl (2 Units) Taq DNA πολυμεράση (Herculase hotstart Stratagene) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf master Cycler. Προηγήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95°C για 2 λεπτά και στη συνέχεια, ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως παρουσιάζονται στον κατωτέρω πίνακα, ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών:

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
72437-21661	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 20sec } 40 κύκλοι
0340F-1200R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 60 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 40sec } 35 κύκλοι
ZL2550-ZR3040	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 56 °C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec } 35 κύκλοι
EUC2- EUG3a,EUG3b,EUG3c	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45°C για 1min Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1min } 40 κύκλοι
AL897-AR3091 BL870-BR3231 CL995-CR3152	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 2min 10sec } 10 κύκλοι Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 2min 20sec } 25 κύκλοι

BL1369-BR2580 CL1659-CR2648	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min	10 κύκλοι
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2min 10sec	25 κύκλοι
AL1632-AR2180	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec	10 κύκλοι
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40sec	20 κύκλοι
AL939-AR2751	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1min 50sec	10 κύκλοι
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 2min	30 κύκλοι
222-292	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 37°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec	10 κύκλοι
	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 37°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 40sec	30 κύκλοι

Πίνακας 4: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκανητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης για καθένα απ’ αυτά.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά.

2.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ

Η αгарόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές το οποίο αποτελείται από εναλλασσόμενα κατάλοιπα της D- και L- γαλακτόζης , τα οποία ενώνονται μέσω α -1,3 και β -1,4 γλυκοσιδικών δεσμών. Ο ρυθμός μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα της αгарόζης επηρεάζεται από:

- Το μοριακό μέγεθος του DNA, δηλαδή τα μεγαλύτερα κομμάτια DNA μετακινούνται πιο αργά ενώ τα μικρότερα γρηγορότερα.
- Την συγκέντρωση της αгарόζης
- Την στερεοδιαμόρφωση του DNA, το υπερελικωμένο κυκλικό, το κυκλικό και το γραμμικό DNA παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αгарόζης. Ο ρυθμός μετανάστευσης των τριών ειδών DNA εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση του πηκτώματος, από την ισχύ του ρεύματος που χρησιμοποιείται, από την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και από την πυκνότητα των υπερελικωμένων στροφών του DNA.
- Την παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου, το βρωμιούχο αιθίδιο προκαλεί ελάττωση της ικανότητας μετακίνησης του DNA κατά ένα ποσοστό 15%.
- Την τάση , η οποία χρησιμοποιείται.
- Το είδος της αгарόζης, [υπάρχουν δύο κύρια είδη αгарόζης, η κανονική (standard) και η χαμηλής τήξεως (low melting)]
- Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από τη σύνθεση και την ιοντική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης . Η απώλεια ιόντων προκαλεί ελαχιστοποίηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, με αποτέλεσμα τα τμήματα DNA να μεταναστεύουν ελάχιστα ή καθόλου.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR σε πήκτωμα αгарόζης (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml.

Από το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα αγαρόζης και αναλύθηκαν σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 120V. Για τον προσδιορισμό και την πιστοποίηση των διαφόρων ζωνών που αντιστοιχούν σε δίκλωνο DNA είναι απαραίτητη και η ταυτόχρονη φόρτωση κατάλληλου μάρτυρα μοριακού βάρους (DNA ladder). Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της RT-PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne).

2.6 ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT-PCR

Από τα προϊόντα της κάθε RT-PCR 40μl ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες στα προϊόντα της RT-PCR ζώνες στο πήκτωμα αγαρόζης κόπηκαν από το πήκτωμα και μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένα σωληνάρια Eppendorf των 1.5ml. Στη συνέχεια, έγινε καθαρισμός των προϊόντων της RT-PCR από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας το προϊόν QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), ακολουθώντας της οδηγίες του κατασκευαστή. Η εύρεση της αλληλουχίας και των δυο κλώνων του καθαρού πλέον DNA έγινε από την Macrogen Inc, (Seoul, Korea) χρησιμοποιώντας τα περιγραφέντα εκκινητικά μόρια

2.7 ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των περιβαλλοντικών στελεχών που προσδιορίστηκαν, μελετήθηκαν σε σχέση με την ομοιότητα και την πιθανή εξελικτική τους συσχέτιση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων στελεχών εντεροϊών. Συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε: α) εξελικτική μελέτη της VP1 περιοχής των περιβαλλοντικών στελεχών που προσδιορίστηκαν με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη και με όποια κλινικά στελέχη έχουν κατατεθεί στη γονιδιακή τράπεζα Genbank για την περιοχή αυτή και εμφανίζουν υψηλή ομοιότητα, β) Εξελικτική μελέτη των περιοχών VP4, VP2, VP3, VP1 των περιβαλλοντικών στελεχών που

προσδιορίστηκαν με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη, με πρότυπα στελέχη της ομάδας εντεροϊών B και με κλινικά στελέχη που έχουν κατατεθεί στο Genbank για ολόκληρη την P1 περιοχή.

2.7.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ – ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Η μελέτη και η επεξεργασία των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των προϊόντων έγινε με την χρησιμοποίηση προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Τα προγράμματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

-BLAST: Είναι πρόγραμμα σύγκρισης αγνώστων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών με μία πληθώρα γνωστών αλληλουχιών που είναι καταχωρημένες στις παγκόσμιες γονιδιακές τράπεζες δεδομένων (GenBank) και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο μέσα από τη διεύθυνση www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

-CLUSTALW: Αποτελεί πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης και σύγκρισης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και αμινοξέων. Το πρόγραμμα διατίθεται προς κοινή χρήση στο διαδίκτυο στη σελίδα: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (EMBL-EBI)

-CLUSTALX: Είναι πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης και σύγκρισης αλληλουχιών νουκλεοτιδίων και αμινοξέων και δημιουργεί αρχεία για την παραγωγή φυλογενετικών δέντρων.

-TreeView: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιείται για την δημιουργία και την μορφοποίηση των φυλογενετικών δέντρων.

-Primer3 Output: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων με βάση γνωστή νουκλεοτιδική αλληλουχία (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>).

-SimPlot: Είναι πρόγραμμα το οποίο μπορεί να παρουσιάσει γραφικά την σύγκριση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών βοηθώντας στην αναγνώριση ανασυνδυασμένων γονιδιωμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕCHO ΙΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ RT-PCR ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕCHO ΙΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΚΑΝ ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

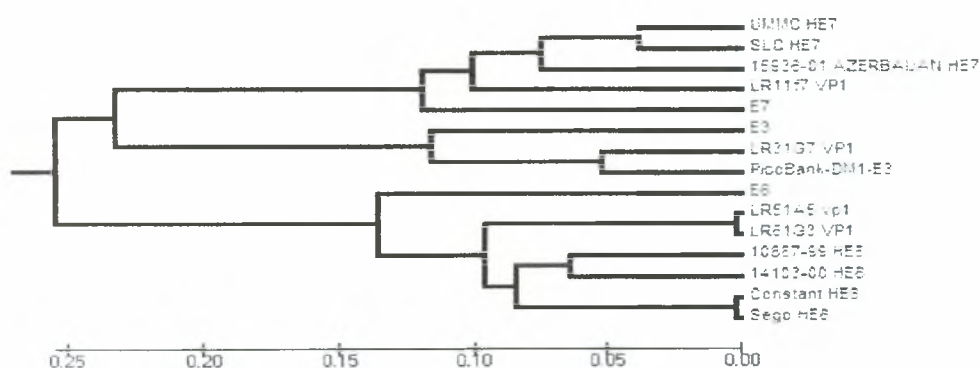
Από τη βιβλιογραφία που υπάρχει σε σχέση με το γένος των εντεροϊών υπάρχουν αρκετά πρωτόκολλα τα οποία χρησιμοποιούν εκκινητές (εκφυλισμένοι εκκινητές) οι οποίοι περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους νουκλεοτιδικές θέσεις όπου υπάρχουν μίγματα βάσεων. Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκαν δημοσιευμένα πρωτόκολλα RT-PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 72437-216616 , 0340F-1200R , EUG3a,EUG3b,EUG3c-EUC2 , 222-292 (πίνακας 5) για την ανίχνευση echo ιών στα 4 περιβαλλοντικά δείγματα τα οποία επεξεργάστηκαν.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία (5'-3')	Γενωμική Περιοχή	Βιβλιογραφία
72437	1-20	Sense	TTAAACAGCTCTGGGGTTG	5'UTR	Mulders et al. (1999)
216616	545-565	Antisense	GGAACACGGACACCCAAAGTA	5'UTR	Blomqvist et al. (1999)
0340F	310	Sense	TAGATCAGGCYGATGAGTCACCGC	5'UTR	Lukashev et al., 2005
1200R	1196-1177	Antisense	GGGAATTTCCACCACCACCC	VP4	Lukashev et al., 2005
EUG3a	2946-2965	Sense	TGGCAAACCTTCCWCCAACCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUG3b	2946-2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUG3c	2946-2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	VP1	Caro et al. (2001)
EUC2	4413-4433	Antisense	TTTGCAC'TTGAAGTGTATGTA	2C	Caro et al. (2001)
222	2895-2912	Antisense	CICCIGGIGGIAYRWACAT	VP1	Oberste et al. (2003)
292	2554-2570	Sense	MIGCIGYIGARACNGG	VP1	Oberste et al. (2003)

Πίνακας 5: Ονομασία, αλληλουχίες, πολικότητα και ακριβής θέση του γονιδιώματος, στην οποία στοχεύουν τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν..

Η ταυτοποίηση των ιών πραγματοποιήθηκε με αλληλούχιση της VP1 γενωμικής περιοχής. Σύμφωνα με την εργασία των Oberste et al., 1999b ομοιότητα αλληλουχίας προερχόμενης από το γονίδιο VP1 που ξεπερνά το 75% με πρότυπο στέλεχος αναφοράς καταχωρημένο στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank), υποδηλώνει ότι το υπό μελέτη στέλεχος ανήκει στον ομόλογο ορότυπο, αρκεί ο επόμενος κοντινός σε επίπεδο ομοιότητας αλληλουχίας ορότυπος να έχει ποσοστό ομοιότητας μικρότερο από 70%.

Στα 4 περιβαλλοντικά δείγματα, στα οποία ανιχνεύτηκαν εντεροϊοί, πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση η οποία έδειξε ότι τα δείγματα αυτά ανήκουν στους ορότυπους echo3, echo6 και echo 7 με ποσοστό ομοιότητας 78% , 79% και 76% με την αντίστοιχη περιοχή των προτύπων. Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο σύμφωνα με το οποίο τα στελέχη ταξινομούνται με στελέχη του ίδιου ορότυπου, τα οποία έχουν κατατεθεί, καθώς και με τα πρότυπα στελέχη echo3, echo6 και echo 7 (εικόνα 14) παρέχοντας έτσι μια εναλλακτική μέθοδο για την μοριακή τυποποίηση των echo ιών (Kotaridi et al. , 2005).



Εικόνα 14: Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από αλληλουχίες προτύπων στελεχών Echo ιών και στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο στο τμήμα του γονιδίου της VP1.

3.2 ΕΝΙΣΧΥΣΗ ΤΗΣ ΚΑΨΙΔΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΤΩΝ ΑΠΟΜΟΝΩΘΕΝΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ-ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν και μελετήθηκαν φυλλογεννετικά οι γενωμικές περιοχές VP1, VP2, VP3 και VP4 των απομονωθέντων στελεχών από τον βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας την περίοδο από 14/7/2005 έως 1/8/2007 και τα οποία αντιπροσωπεύουν 3 διαφορετικούς ορότυπους.

Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι εκκινητές 72437-216616 , 0340F-1200R , EUG3a,EUG3b,EUG3c-EUC2 , 222-292 (πίνακας 5) και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6..

ΔΕΙΓΜΑ	72437-216616	0340F-1200R	222/292	EUC-EUG
LR11F7	+	+	+	+
LR31G7	+	+	-	+
LR51A5	+	+	-	+
LR61G3	+	+	-	+

Πίνακας 6: Ζεύγη εκφυλισμένων εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν και PCR αποτελέσματα (+) θετικής ή (-) αρνητικής ανίχνευσης με το έκαστο ζεύγος εκκινητών.

Ο σχεδιασμός των εκκινητικών μορίων για την αλληλούχιση και του υπόλοιπου τμήματος της καψιδιακής περιοχής έγινε με την βοήθεια του προγράμματος <http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/> Primer3, Whitehead Institute πάνω σε ήδη αλληλουχημένες περιοχές (πίνακας 3).

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα για ολη τη P1 γενωμική περιοχή και ξεχωριστά για κάθε γονίδιο. Στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων συμπεριλήφθηκαν εκτός από τα δείγματα και οι αλληλουχίες όλων των οροτύπων των echo ιών της B ομάδας καθώς και του ίδιου ορότυπου τα οποία είναι κατατεθειμένα στο GeneBank και για τα οποία έχει αλληλουχηθεί ολόκληρη η P1 γενωμική περιοχή (εικόνες 15,16,17,18,19). Από τα δέντρα προέκυψε ότι τόσο στην καψιδιακή περιοχή όσο και σε κάθε γονίδιο ξεχωριστά υπήρχε ταξινόμηση με στελέχη του ίδιου ορότυπου.

Στην γενωμική περιοχή P1 που ενισχύθηκε και αλληλουχήθηκε το ποσοστό της νουκλεοτιδικής διαφοράς των απομονωθέντων echo ιών , των προτύπων και στελεχών ίδιου ορότυπου κυμάνθηκε από 0,10% έως 0,26% (πίνακες 7,8,9). Όλα τα στελέχη με ομόλογο ορότυπο ομαδοποιήθηκαν με τα πρότυπα στελέχη δημιουργώντας στα φυλογενετικά δέντρα τρεις ευδιάκριτους κλάδους όπου καθένας από αυτούς αντιστοιχεί σε μια οροτυπική ομάδα.

Σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων ,σε ολόκληρη την καψιδική περιοχή, ο μικρότερος αριθμός διαφορετικών αμινοξέων παρατηρήθηκε στο γονίδιο VP4 σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια της καψιδιακής περιοχής, ενώ οι περισσότερες διαφορές παρουσιάστηκαν στο γονίδιο VP1. Κατά την ανάλυση της P1 πρωτεϊνικής αλληλουχίας στα τέσσερα δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρότυπα παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό ομοιότητας (Εικόνα 19).

	LR11F7	ECHO7
LR11F7		
ECHO7	0,25	
HE7-SLC	0,21	0,25
HE7- UMMC	0,20	0,26
HE7-15936-01 AZERBAIJAN	0,20	0,26

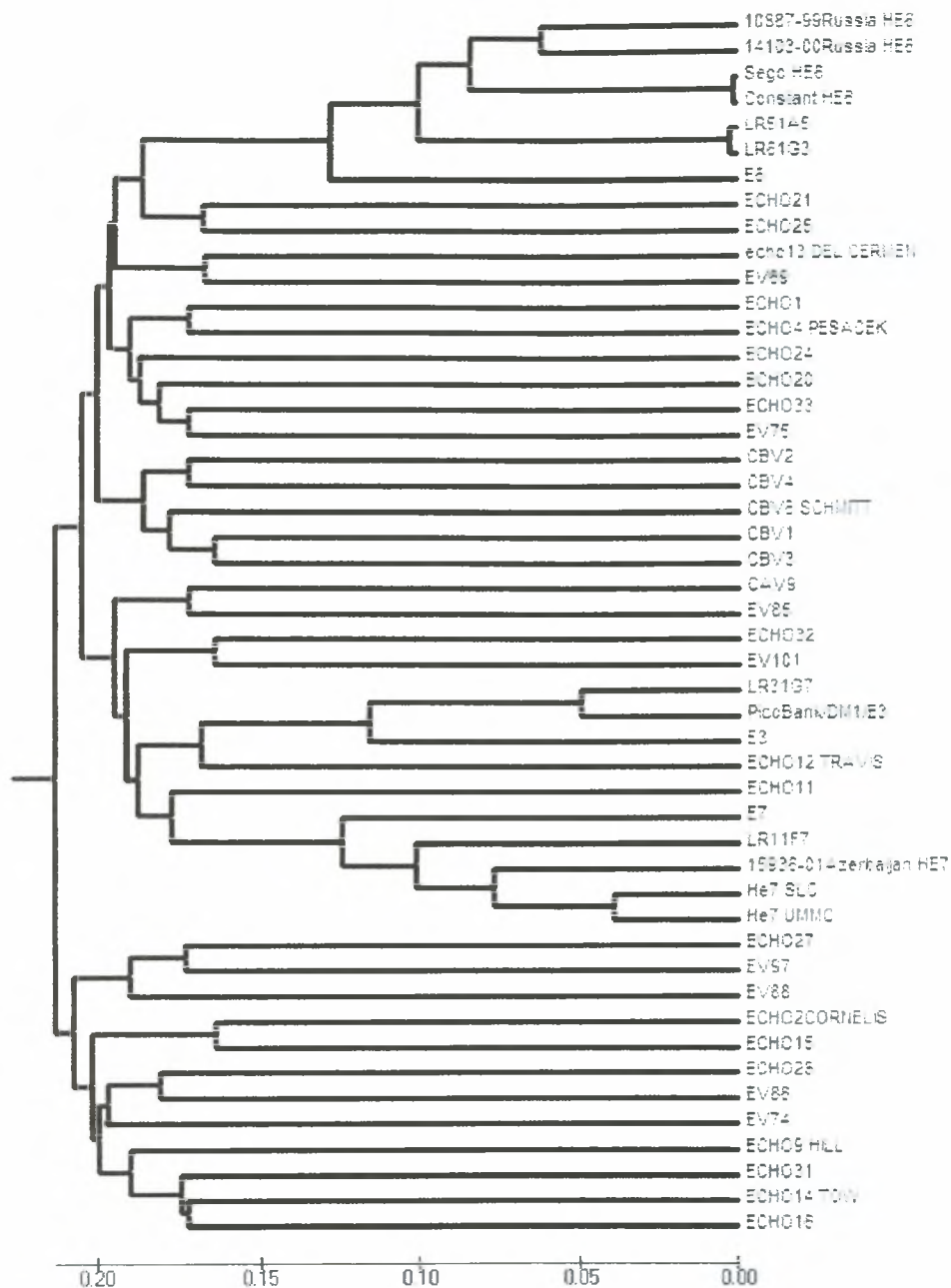
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Μέση εκατοστιαία απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του echo7 ορότυπου, στη γενωμική περιοχή P1.

	LR31gG7	ECHO3
LR31G7		
ECHO3	0,24	
PICO BANK/DM/E3	0,10	0,24

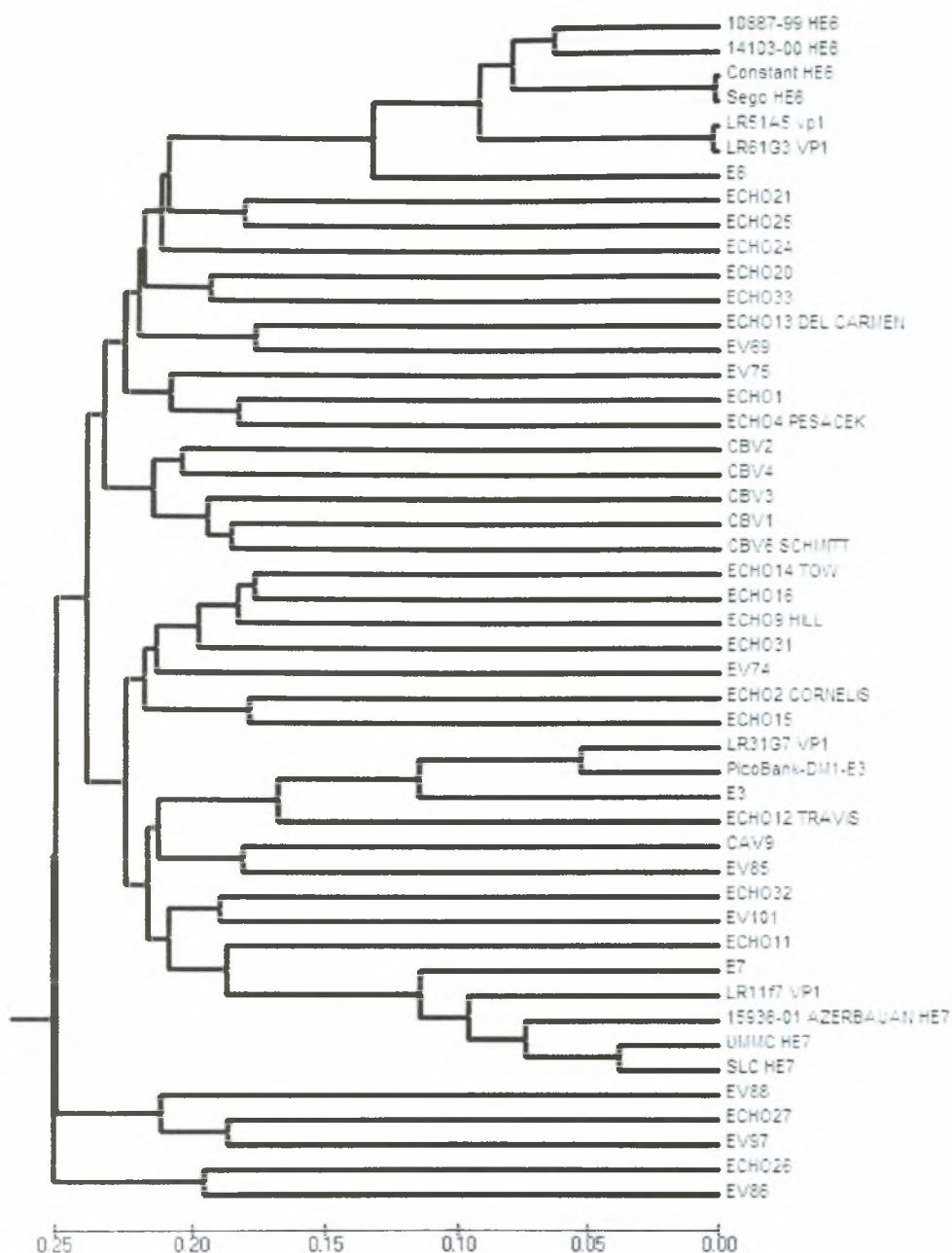
ΠΙΝΑΚΑΣ 8: Μέση εκατοστιαία απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του echo3 ορότυπου, στη γεννωμική περιοχή P1.

	LR51A5/LR61G3	ECHO6
LR51A5/LR61G3		
ECHO6	0,26	
HE6-10887-99 RUSSIA	0,19	0,26
HE6-14103-00 RUSSIA	0,21	0,26
HE6-SEGO	0,21	0,26
HE6-CONSTANT	0,21	0,26

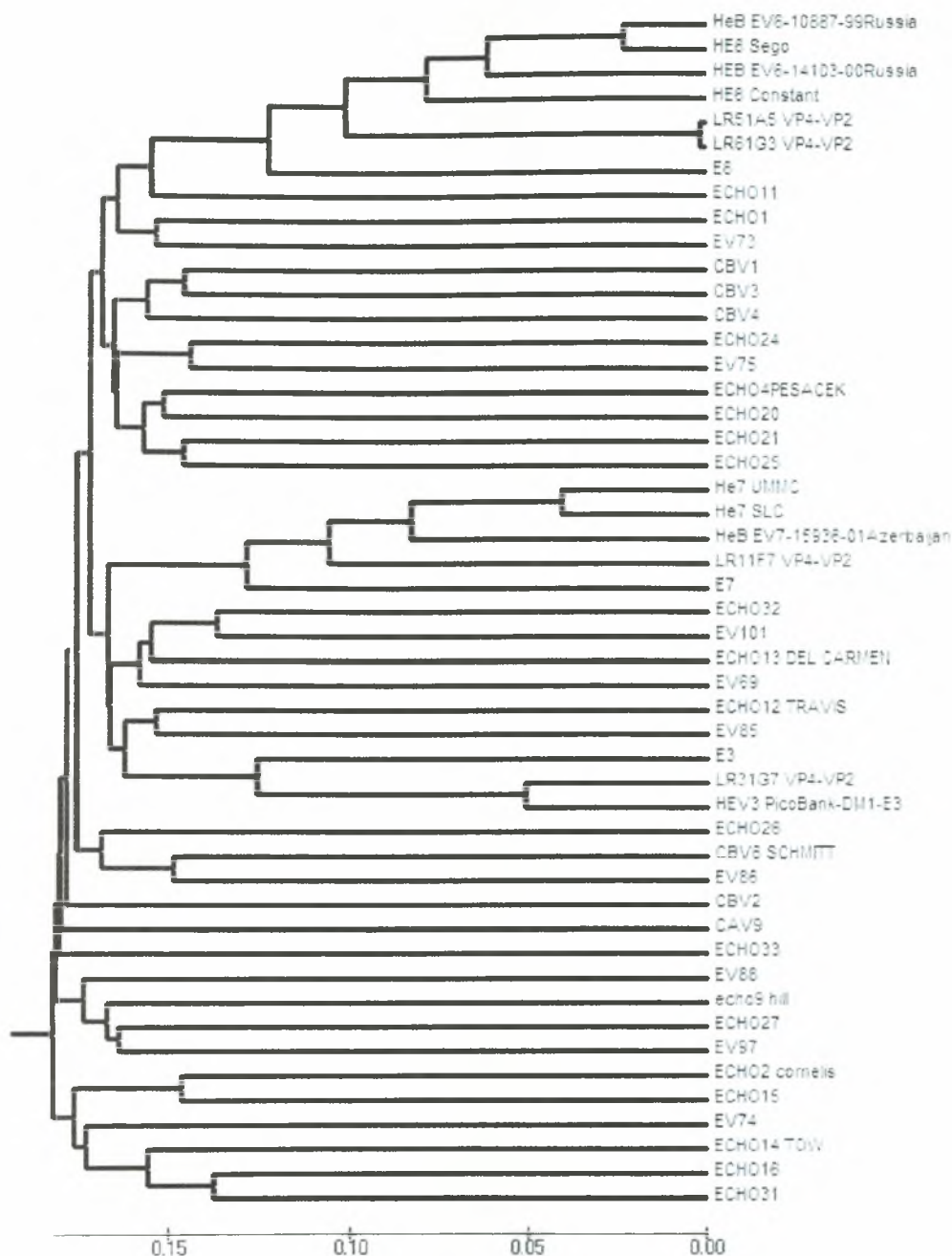
ΠΙΝΑΚΑΣ 9: Μέση εκατοστιαία απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του echo6 ορότυπου, στη γεννωμική περιοχή P1.



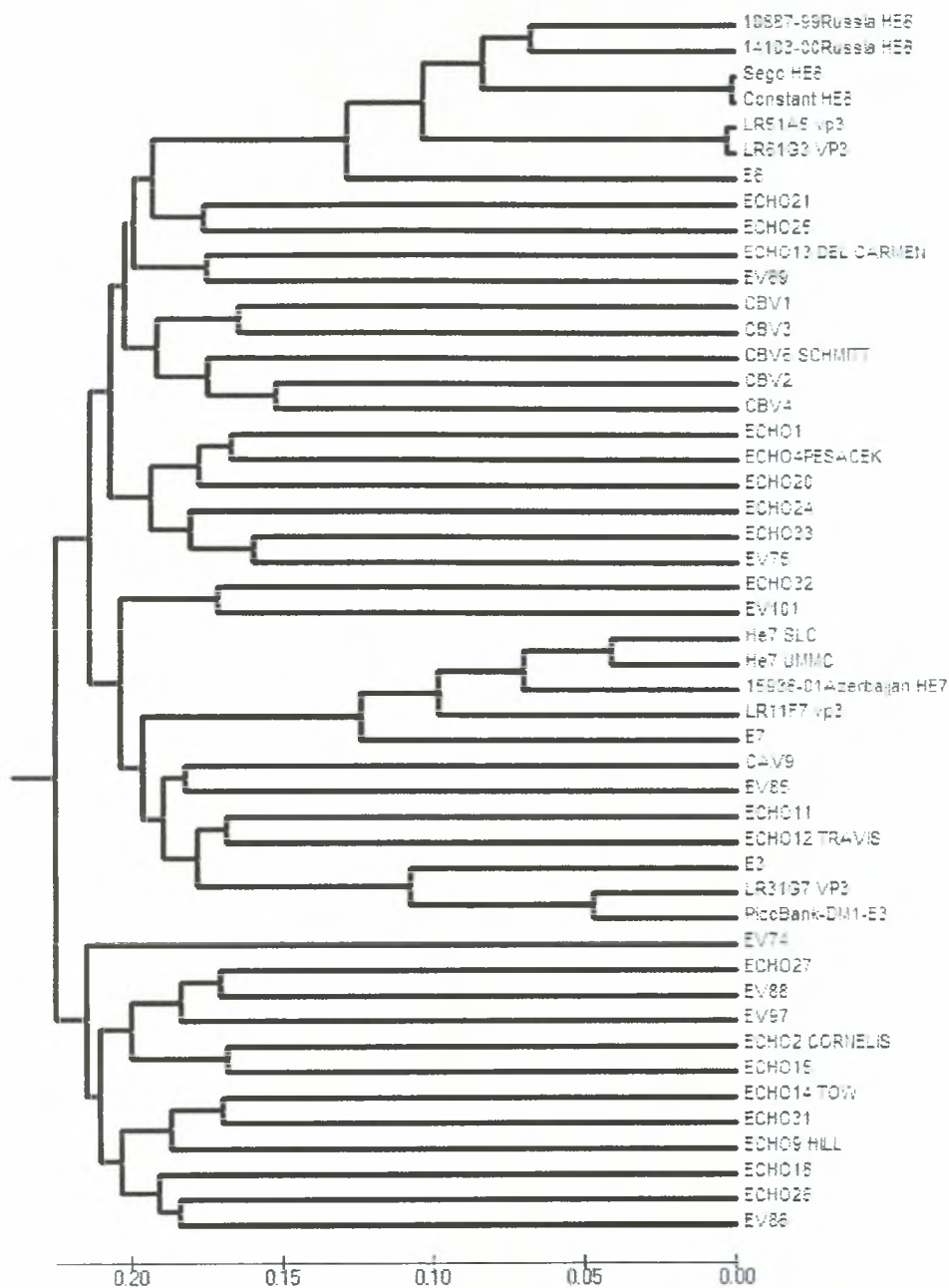
Εικόνα 15: Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από αλληλουχίες προτύπων στελεχών Echo ιών B ομάδας και στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο με τα περιβαλλοντικά δείγματα στο τμήμα P1 της γενωμικής περιοχής.



Εικόνα 16: Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από αλληλουχίες προτύπων στελεχών Echo ιών B ομάδας και στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο με τα περιβαλλοντικά δείγματα στο τμήμα του γονιδίου VP1.



Εικόνα 17: Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από αλληλουχίες προτύπων στελεχών Echo ιών B ομάδας και στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο με τα περιβαλλοντικά δείγματα στο τμήμα του γονιδίου VP4-VP2.



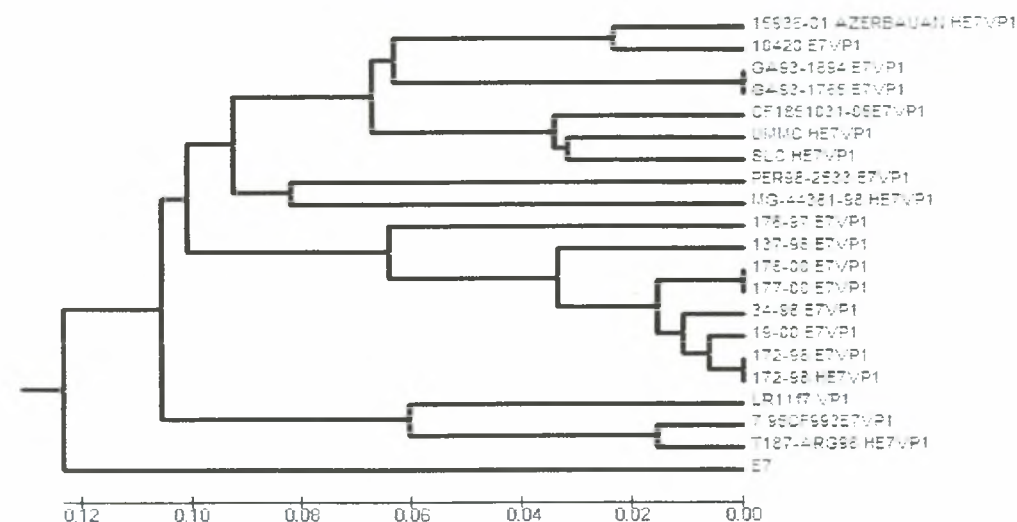
Εικόνα 18: Φυλογενετικό δέντρο κατασκευασμένο από αλληλουχίες προτύπων στελεχών Echo ιών Β ομάδας και στελεχών που ανήκουν στον ίδιο ορότυπο με τα περιβαλλοντικά δείγματα στο τμήμα του γονιδίου VP3.

ET	VP4	MGAGVSTQKT	GAHETGLNAS	GNSIIHYTNI	NYKDAASNS	ANRQDFTQDP	GKFTPEVKDI	MIKTM'PALNS	VP2	PSAECEGYSO
LR11F										
ET		RVRSLTLGNS	TITTTQESANV	VVGYGRAPEY	LRDDEATAED	QPTQPDVATC	RFYTLDSVQW	EKNSAGAWAK	FPEALKNMGL	
LR11F										
ET		FGQNMVHYL	GRAGYTHVQ	CNASKFHQGC	LLVVCVPEAE	MGCSQTDKEV	AANHLTKGEA	AHKFEPTKTT	GQHTVQSVIC	
LR11F										
ET		NAGMGVGVGN	LTTPHQAIN	LRTNMCATDV	MPYVNSVPMO	NKFRHYNFTL	MIIPFAPLDY	AAQASEYVPV	TVTIAPMCAE	
LR11F										
ET		VNGLRLAYQQ	GEPVLTTPGS	NQFMTSDDFQ	SPSAMPQFDV	TPHMCIPGEV	HNLMEIAEVD	SVVPVNNIKV	NLQSM'DAYHI	
LR11F										
ET		EVNTGNHQGE	KIF-FQHQPG	LESVFKRTLK	GEILNYYAHW	SGSIKLTFTF	CGSAMATGKL	LLAYSPPGAD	VPATRKQAWL	
LR11F										
ET		GTHNADIGL	QSSCVLCQPA	ISQTHYRLVQ	QDEYTSAGNV	TCAYQTGIIV	PPGTPNKCIV	LCFASACNDF	SVRLRLDTPF	
LR11F										
ET		IGQTALLQGD	TETADIDADA	RYADTVASGP	SNSTSIPLT	AVETGHTSQV	EPSDTMQTRH	VKNYHSRSES	TVENFLSRSA	
LR11F										
ET		CVYIEEYTK	DODMVRNYS	ATGNARRNVQ	LRRKFELEFY	NRFDMEITFY	ITSRQLPGTS	IAQDMPLPTH	QIMYIPPGGP	
LR11F										
ET		VPNSVTDPAW	QTSTNPSIFW	TEGNAPPRNS	IPFISIGNAY	SNFYDGASHF	SQNGVYGYNV	LNNMGKLYAR	HVNKDTPYQM	
LR11F										
ET		BSTIRVYFAP	KHIRVWVPRP	PRLSPIYKSS	NVNFNPTNLT	DERSSITYVP	DTIRPDVRTN			
LR11F										
ET	VP4	MGAGVSTQKT	GAHETGLNAS	GNSIIHYTNI	NYKDAASNS	ANRQDFTQDP	GKFTPEVKDI	MIKTM'PALNS	VP2	PSAECEGYSO
LR51G										
ET		RVRSLTLGNS	TITTTQESANV	VVGYGRAPEY	LRDDEATAED	QPTQPDVATC	RFYTLDSVQW	EKNSAGAWAK	FPEALKNMGL	
LR51G										
ET		FGQNMVHYL	GRAGYTHVQ	CNASKFHQGC	LLVVCVPEAE	MGCSQTDKEV	AANHLTKGEA	AHKFEPTKTT	GQHTVQSVIC	
LR51G										
ET		NAGMGVGVGN	LTTPHQAIN	LRTNMCATDV	MPYVNSVPMO	NKFRHYNFTL	MIIPFAKLEY	THQASNYPI	TVTIAPMCAE	
LR51G										
ET		VNGLRLAYQQ	GEPVLTTPGS	NQFMTSDDFQ	SPSAMPQFDV	TPHMCIPGEV	HNLMEIAEVD	SVVPVNNIKV	NLQSM'DAYRI	
LR51G										
ET		EVNTGNHQGE	KIF-FQHQPG	LESVFKRTLK	GEILNYYAHW	SGSIKLTFTF	CGSAMATGKF	LLAYSPPGAS	PPQNRKQAWL	
LR51G										
ET		GTHNADIGL	QSSCVLCQPA	ISQTHYRLVQ	QDEYTSAGNV	TCAYQTGIIV	PPGAPSSCTI	LCFASACNDF	SVRLRLDTPF	
LR51G										
ET		IGQTALLQGD	TETADIDADA	RYADTVASGP	SNSTSIPLT	AVETGHTSQV	EPSDTMQTRH	VKNYHSRSES	TVENFLSRSA	
LR51G										
ET		CVYITTKSA	GETPTEKIAS	ARINTROMVQ	LRRKFELEFY	LRFQWEITFY	ITSQDPSGTQ	IAQDMPLPTH	QIMYIPPGGP	
LR51G										
ET		VPNSATDPAW	QSSATNPSIFW	TEGCAPPRNS	VPFISIGNAY	TNFDGASHF	TQEGVYGFNS	LNNMGHIYR	HVNEQSLEVS	
LR51G										
ET		TSTIRVYFAP	KHIRVWVPRP	PRLSPIYKSS	NVNFNPTNLT	DERSSITYVP	DTIRPDVRTN			
LR51G										
ET	VP4	MGAGVSTQKT	GAHETGLNAS	GNSIIHYTNI	NYKDAASNS	ANRQDFTQDP	GKFTPEVKDI	MIKTM'PALNS	VP2	PSAECEGYSO
LR51L										
ET		RVRSLTLGNS	TITTTQESANV	VVGYGRAPEY	LRDDEATAED	QPTQPDVATC	RFYTLDSVQW	EKNSAGAWAK	FPEALKNMGL	
LR51L										
ET		FGQNMVHYL	GRAGYTHVQ	CNASKFHQGC	LLVVCVPEAE	MGCSQTDKEV	AANHLTKGEA	AHKFEPTKTT	GQHTVQSVIC	
LR51L										
ET		NAGMGVGVGN	LTTPHQAIN	LRTNMCATDV	MPYVNSVPMO	NKFRHYNFTL	MIIPFAKLEY	THQASNYPI	TVTIAPMCAE	
LR51L										
ET		VNGLRLAYQQ	GEPVLTTPGS	NQFMTSDDFQ	SPSAMPQFDV	TPHMCIPGEV	HNLMEIAEVD	SVVPVNNIKV	NLQSM'DAYRI	
LR51L										
ET		EVNTGNHQGE	KIF-FQHQPG	LESVFKRTLK	GEILNYYAHW	SGSIKLTFTF	CGSAMATGKF	LLAYSPPGAG	VPKARKEAWL	
LR51L										
ET		GTHNADIGL	QSSCVLCQPA	ISQTHYRLVQ	QDEYTSAGNV	TCAYQTGIIV	PPGAPSSCTI	LCFASACNDF	SVRLRLDTPF	
LR51L										
ET		IGQTALLQGD	TETADIDADA	RYADTVASGP	SNSTSIPLT	AVETGHTSQV	EPSDTMQTRH	VKNYHSRSES	TVENFLSRSA	
LR51L										
ET		CVYITTKSA	GETPTEKIAS	ARINTROMVQ	LRRKFELEFY	LRFQWEITFY	ITSQDPSGTQ	IAQDMPLPTH	QIMYIPPGGP	
LR51L										
ET		VPNSATDPAW	QSSATNPSIFW	TEGCAPPRNS	VPFISIGNAY	TNFDGASHF	TQEGVYGFNS	LNNMGHIYR	HVNEQSLEVS	
LR51L										
ET		TSTIRVYFAP	KHIRVWVPRP	PRLSPIYKSS	NVNFNPTNLT	DERSSITYVP	DTIRPDVRTN			
LR51L										

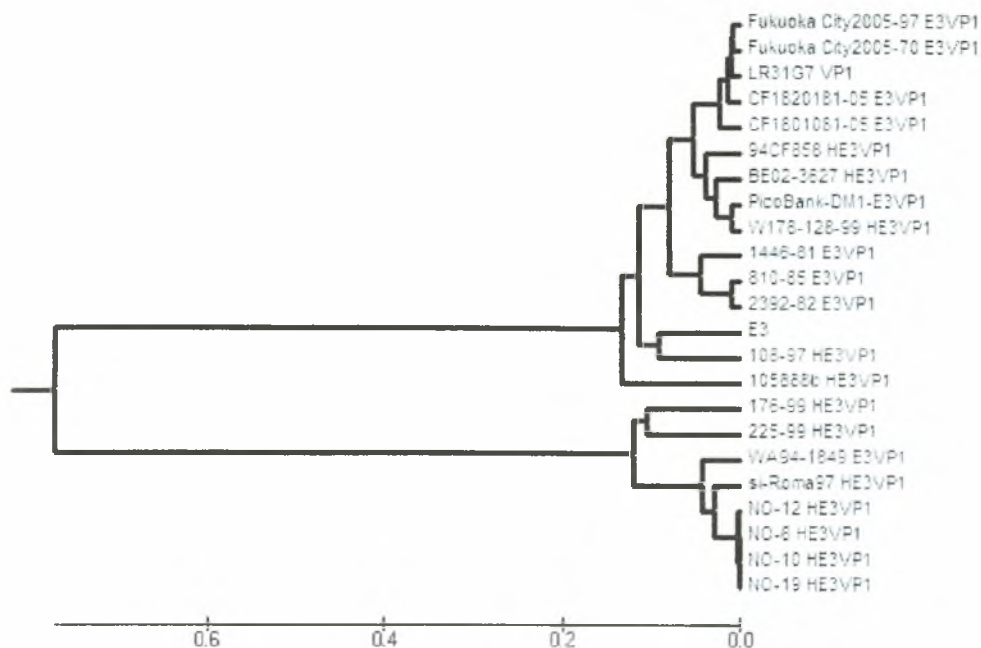
Εικόνα 19: Στοιχισμός πρωτεϊνικών ακολουθιών των τεσσάρων στελεχών της παρούσας μελέτης και των αντίστοιχων προτύπων. Οι τελείες υποδηλώνουν ομοιότητα με τα πρότυπα στελέχη.

3.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ ΣΕ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ VP1 ΓΕΝΩΜΙΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ

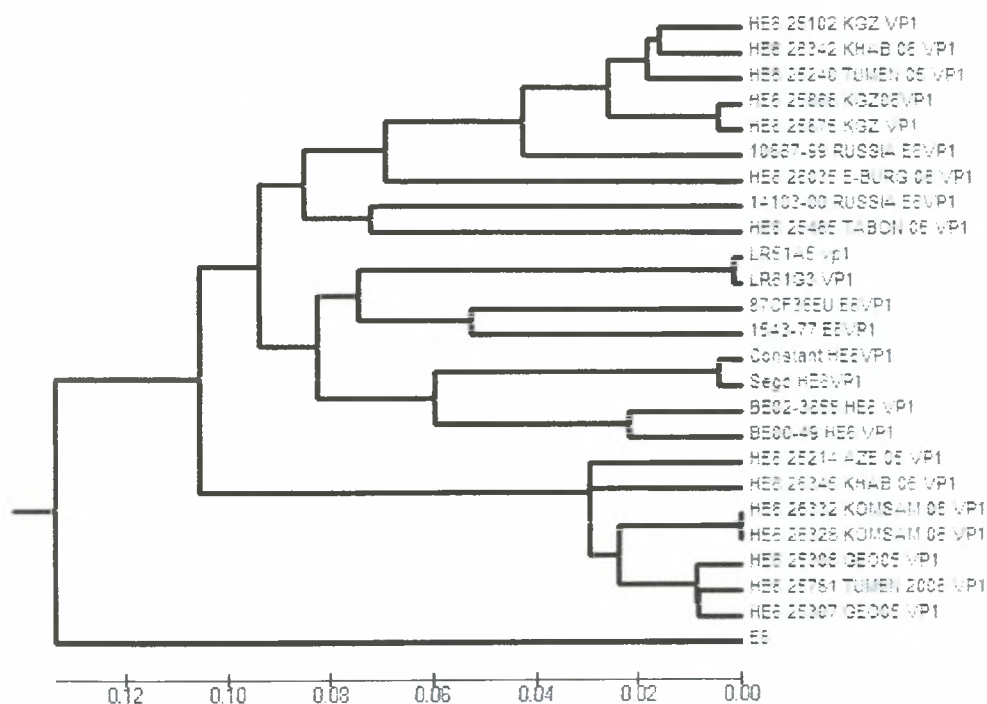
Έχοντας ως στόχο την επιδημιολογική μελέτη των ιών που ανιχνεύθηκαν στα περιβαλλοντικά δείγματα πραγματοποιήθηκαν φυλογενετικά δέντρα σε τμήματα της VP1 γενωμικής περιοχής για τα οποία υπάρχουν αλληλουχίες αρκετών Echo7 ,Echo3 και Echo6 ιών κατατεθειμένες στο Gene Bank. Σύμφωνα με τα παραπάνω πραγματοποιήθηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα για τους τρεις διαφορετικούς ορότυπους που ανιχνεύθηκαν. Για τον ορότυπο Echo 7 το τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής που χρησιμοποιήθηκε ήταν μήκους 332 βάσεων (nt 2954-3285). Το δέντρο αυτό μας δείχνει την ταξινόμηση του ιού μας με Echo 7 στελέχη που κυκλοφόρησαν και απομονώθηκαν κυρίως στην Ασία τη περίοδο 1997-2000 και όχι με στελέχη που απομονώθηκαν πιο πρόσφατα και μάλιστα σε περιοχές πιο κοντά στην Ελλάδα. Για τον ορότυπο Echo 3 το τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής που χρησιμοποιήθηκε ήταν μήκους 269 βάσεων (nt 2692-2962). Το δέντρο αυτό μας δείχνει την ταξινόμηση του ιού μας με Echo 3 στελέχη που κυκλοφόρησαν και απομονώθηκαν σε χώρες τόσο της Ασίας όσο και της Ευρώπης , παρουσιάζοντας το μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας (98%) με δυο στελέχη που απομονώθηκαν στην Ασία. Τέλος για τον ορότυπο Echo 6 το τμήμα της VP1 γενωμικής περιοχής που χρησιμοποιήθηκε ήταν μήκους 355 βάσεων (nt 2605-2959). Το δέντρο μας δείχνει ταξινόμηση του ιού μας με Echo 6 στελέχη που κυκλοφόρησαν και απομονώθηκαν σε χώρες της Ευρώπης και κυρίως της Ρωσίας.



Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο τμήματος της VP1 γενωμικής περιοχής 332 βάσεων για τον ορότυπο Echo7 (nt 2954-3285).



Εικόνα 21: Φυλογενετικό δέντρο τμήματος της VP1 γενομικής περιοχής, 269 βάσεων για τον ορότυπο Echo 3 (nt 2692-2962).



Εικόνα 22: Φυλογενετικό δέντρο τμήματος της VP1 γενομικής περιοχής 355 βάσεων για τον ορότυπο Echo 6 (nt 2605-2959).

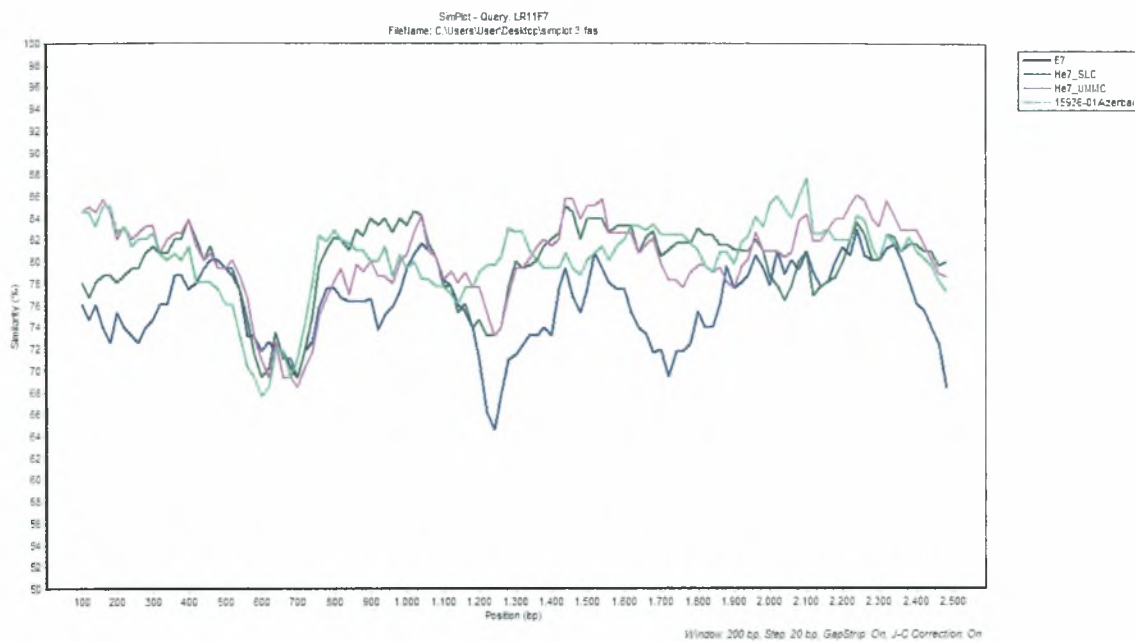
3.4 ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΠΙΘΑΝΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΗΝ P1 ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ

Η νουκλεοτιδική σύγκριση των στελεχών που ανιχνεύθηκαν με τα υπόλοιπα στελέχη του ίδιου ορότυπου ,για τα οποία υπάρχει κατατεθειμένη ολόκληρη η P1 περιοχή, καθώς και με τα αντίστοιχα πρότυπα Echo ιών αναπαρίσταται γραφικά με τη βοήθεια του SimPlot.

Σε ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή το στέλεχος LR11F7 φαίνεται να σχετίζεται φυλογενετικά με τα στελέχη He7-SLC, He7-UMMC και 15936 Azerbaijan ώστε να θεωρείται πιθανός ένας ανασυνδυασμός μεταξύ των παραπάνω στελεχών. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η πιθανότητα πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αλληλουχιών των γονιδίων της P1 περιοχής των παραπάνω στελεχών με τη βοήθεια του λογισμικού SimPlot(εικόνα 23). Φαίνεται ότι στην καψιδιακή περιοχή υπάρχει μια ομοιότητα με Echo 7 στελέχη ενώ αυτή η ομοιότητα διακόπτεται στην λειτουργική περιοχή. Κάτι τέτοιο είναι πιθανό λόγο της απότομης πτώσης των ποσοστών ομοιότητας στο τέλος της καψιδιακής περιοχής. Επίσης παρατηρείται μια αύξηση της ομοιότητας του LR11F7 με το στέλεχος 15936-Azerbaijan προς το τέλος της καψιδιακής περιοχής (2100 bp) έως 89% γεγονός που υποδηλώνει μέσω της συγκεκριμένης γραφικής απεικόνισης πιθανό ανασυνδυασμό.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και για τους διαφορετικούς ορότυπους για τους οποίους πραγματοποιήθηκε γραφική απεικόνιση με SimPlot. Έτσι σε ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή το στέλεχος LR31G7 φαίνεται να σχετίζεται φυλογενετικά με το στέλεχος PicoBank/DM1/E3. Επίσης παρατηρείται μια αύξηση της ομοιότητας του LR31G7 με το στέλεχος PicoBank/DM1/E3 έως 94% στην αρχή (520 bp), στην μέση (1080bp) και στο τέλος (1960bp)της καψιδιακής περιοχής γεγονός που υποδηλώνει μέσω της συγκεκριμένης γραφικής απεικόνισης πιθανούς ανασυνδυασμούς σε τρία γονίδια της καψιδιακής περιοχής VP2, VP3 και VP1 (εικόνα 24). Τέλος σε ολόκληρη την καψιδιακή περιοχή τα στελέχη LR51A5 και LR61G3 φαίνεται να σχετίζεται φυλογενετικά με τα στελέχη EV6-10887-99 Russia, EV6-14103-00 Russia, HE6_Sego και HE6_Constant.

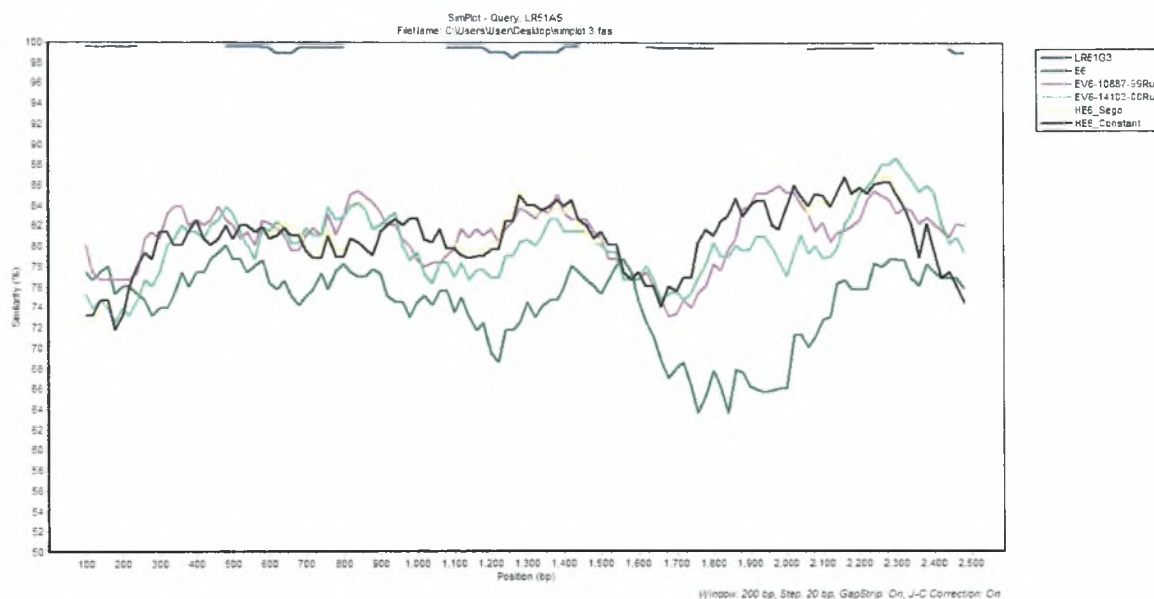
Εδώ δεν παρατηρείται κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην ομοιότητα των εξεταζόμενων αλληλουχιών ,όσον αφορά την καψιδιακή περιοχή, παρά μόνο μια απότομη αύξηση της ομοιότητας για το στέλεχος EV6-14103-00 Russia (2300bp) στο τέλος της VP1 γενωμικής περιοχής έως 89% γεγονός που υποδηλώνει μέσω της συγκεκριμένης γραφικής απεικόνισης πιθανό ανασυνδυασμό (εικόνα 25).



Εικόνα 23: Γραφική απεικόνιση στελέχους που ανιχνεύτηκε στην Ελλάδα και του προτύπου Echo 7 στελέχους συγκριτικά με στελέχη του ίδιου ορότυπου που προέρχονται από περιοχές εκτός Ελλάδος.



Εικόνα 24: Γραφική απεικόνιση στελέχους που ανιχνεύτηκε στην Ελλάδα και του προτύπου Echo 3 στελέχους συγκριτικά με στέλεχος του ίδιου ορότυπου που προέρχονται από περιοχές της Σκανδιναβίας.



Εικόνα 25: Γραφική απεικόνιση στελέχους που ανιχνεύτηκε στην Ελλάδα και του προτύπου Echo 6 στελέχους συγκριτικά με στελέχη του ίδιου ορότυπου που προέρχονται από περιοχές εκτός Ελλάδος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το περιβάλλον παίζει σημαντικό ρόλο στην κυκλοφορία των εντερικών ιών. Ένας μεγάλος αριθμός ιών που εγκλείονται στα κόπρανα μπορούν να ανιχνευτούν σε υδάτινες μάζες, τέτοιοι είναι οι νοροϊοί, οι ρεοϊοί, οι αδενοϊοί, οι ροταϊοί και οι εντεροϊοί. Τα επεξεργασμένα αστικά λύματα με την απόρριψη τους τόσο σε ποτάμια και λίμνες όσο και στη θάλασσα και η χρησιμοποίησή τους σε άρδευση και λίπανση, όταν δεν έχει γίνει σωστά η επεξεργασία τους, μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία με τη διασπορά τους στο περιβάλλον και την είσοδο τους στην τροφική αλυσίδα. Έτσι είναι σημαντικό να ελέγχονται περιβαλλοντικά δείγματα ώστε να παρακολουθείται η διάρκεια της κυκλοφορίας των εντεροϊών μέσα σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό και να γίνεται εφικτή η μοριακή ανάλυση αυτών των στελεχών.

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό της οικογένειας Picornaviridae, ως προς την παθογένεια των μελών του στον άνθρωπο. Αποτελείται από τουλάχιστον 65 οροτύπους οι οποίοι ταξινομούνται σε πέντε υποομάδες. Η τυποποίηση των εντεροϊών απαιτείται : α) για τη διάκριση των πόλιο από τους μη πόλιο-εντεροϊούς, β) για να ταυτοποιηθούν νέοι τύποι εντεροϊών ή variants αυτών, γ) για να διερευνηθεί η μοριακή επιδημιολογία και μοριακή φυλογένεια των εντεροϊών που ανιχνεύονται σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα δ) για τον εντοπισμό πιθανών θέσεων ανασυνδυασμών. Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών χρησιμοποιείται επιτυχώς ακόμη για να ανιχνεύσει και αυτούς τους οροτύπους οι οποίοι δεν αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη.

Η σύγκριση νουκλεοτιδικών όσο και αμινοξικών αλληλουχιών από το 5' άκρο της VP2 καψιδικής περιοχής, αποκάλυψε την ύπαρξη 4 μεγάλων φυλογενετικών ομάδων μέσα στο γένος των εντεροϊών (Clusters A-D) (Oberste et al., 1998b; Poÿry et al., 1996; Pulli et al., 1995; Zell et al., 1997). Η γενωμική αυτή περιοχή θεωρήθηκε καταλληλότερη σε σχέση με την 5'UTR για την ανάπτυξη μοριακής διαγνωστικής μεθόδου συσχετισμού του γονοτύπου με τον ορότυπο (Huttunen et al., 1996; Poÿry et

al., 1996; Pulli et al., 1995). Όμως, καταγράφηκαν περιπτώσεις όπου στελέχη τα οποία αν και ανήκαν στον ίδιο ορότυπο δεν ομαδοποιούνταν στενά κατά τη φυλογενετική ανάλυση (Arola et al., 1996 Oberste et al., 1998b). Έτσι για το τμήμα αυτό του γενετικού υλικού των εντεροϊών είναι πλέον αποδεκτή η μερική συσχέτιση του γενώματος με τον ορότυπο.

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου VP1 όλων των πρότυπων στελεχών των εντεροϊών του ανθρώπου από τους Oberste et al (Oberste et al., 1998b), καθώς και η μερική αλληλούχιση του ίδιου γονιδίου όπως περιγράφεται σε άλλες εργασίες (Oberste et al., 1999a; Caro et al., 2001; Norder et al., 2001) έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση του γενώματος σε αυτήν την περιοχή με τον ορότυπο. Η VP1 καψιδική πρωτεΐνη βρίσκεται τοποθετημένη κυρίως στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος των picorna-ίων και αποτελεί τμήμα των αντιγονικών θέσεων (Mateu, 1995).

Όπως έχει αποδειχθεί η BC-θηλειά η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό της αντιγονικής θέσης 1, περιέχει ειδικές για τον ορότυπο αντιγονικές θέσεις (Minor, 1990; Norder et al., 2001) και εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 82-93 (για τον echo ιό 30-AJ295172) της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης (295aa) (Muckelbauer et al., 1995; Norder et al., 2001). Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών του γονιδίου VP1 μεταξύ στελεχών διαφορετικών οροτύπων, έδειξε τη μεγαλύτερη ποικιλότητα συγκεντρωμένη στην περιοχή που αντιστοιχεί στη BC-θηλειά υποδηλώνοντας ότι το τμήμα αυτό του γενώματος αποτελεί το πλέον κατάλληλο για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών (Thoelen et al., 2003).

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε ανίχνευση και φυλογενετική ανάλυση στην P1 γενωμική περιοχή εντεροϊών από περιβαλλοντικά δείγματα. Η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε αρχικά με RT-PCR σε συντηρημένο τμήμα της 5-UTR μη κωδική περιχης με τη χρήση εκφυλισμένων εκκινητών από τη βιβλιογραφία (Siafalias et al 2000,2001 ,2002,Mulders et al. (1999), Lukashev et al., 2005, Caro et al. (2001), Oberste et al. (2003)) Στη συνέχεια ακλούθησε η ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν με αλληλούχιση της VP1 γενωμικής περιοχής. Σύμφωνα με την εργασία των Oberste et al., (1999b) ομοιότητα αλληλουχίας προερχόμενης από το γονίδιο VP1 που ξεπερνά το 75% με πρότυπο στέλεχος αναφοράς καταχωρημένο στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank), υποδηλώνει ότι το υπό μελέτη στέλεχος ανήκει στον ομόλογο ορότυπο, αρκεί ο επόμενος κοντινός σε επίπεδο ομοιότητας αλληλουχίας ορότυπος να έχει ποσοστό ομοιότητας μικρότερο

από 70%. Πρόέκυψε ότι τα στελέχη τα οποία ανιχνεύθηκαν και αλληλουχίστηκαν ταξινομούνται στους ορότυπους Echo 3, Echo 7 και Echo 6, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε και μέσω φυλογενετικής ανάλυσης με την κατασκευή φυλογενετικού δέντρου, προτείνοντας αυτή τη μέθοδο σαν εναλλακτική για την μοριακή τυποποίηση των echo ιών (Kotaridi et al. , 2005).

Στο επόμενο μέρος της μελέτης αλληλουχίστηκαν και μελετήθηκαν φυλογενετικά οι γενωμικές περιοχές VP1, VP2, VP3 και VP4 των απομονωθέντων στελεχών τα οποία αντιπροσωπεύουν 3 διαφορετικούς ορότυπους και απομονώθηκαν από τον βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας την περίοδο από 14/7/2005 έως 1/8/2007.

Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά εκκινητές γνωστοί από τη βιβλιογραφία για τη αλληλούχιση μέρους του γενώματος των εντεροϊών και μετά την αλληλούχιση αυτών των περιοχών σχεδιάστηκαν με την βοήθεια του προγράμματος Primer3, Whitehead Institute (<http://www.genome.wi.mit.edu/genomesoftware/other/>) εκκινητικά μόρια για την αλληλούχιση και του υπόλοιπου τμήματος της καψιδιακής περιοχής (πίνακας 3).

Στη συνέχεια οι αλληλουχημένες περιοχές μελετήθηκαν φυλογενετικά για όλη τη P1 γενωμική περιοχή και ξεχωριστά για κάθε γονίδιο. Κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δέντρα σύμφωνα με τα οποία προέκυψε ότι τόσο στην καψιδιακή περιοχή όσο και σε κάθε γονίδιο ξεχωριστά υπήρχε ταξινόμηση με στελέχη του ίδιου ορότυπου (εικόνες 15,16,17,18,19). Όλα τα στελέχη με ομόλογο ορότυπο ομαδοποιήθηκαν με τα πρότυπα στελέχη δημιουργώντας στα φυλογενετικά δέντρα τρεις ευδιάκριτους κλάδους όπου καθένας από αυτούς αντιστοιχεί σε μια οροτυπική ομάδα. Ακολούθησε η κατασκευή φυλογενετικών δέντρων σε τμήματα της VP1 γενωμικής περιοχής με σκοπό την επιδημιολογική μελέτη των ιών που ανιχνεύθηκαν στα περιβαλλοντικά δείγματα. Πραγματοποιήθηκαν τρία φυλογενετικά δέντρα για τους τρεις διαφορετικούς ορότυπους που ανιχνεύθηκαν. Σύμφωνα με αυτά παρατηρήθηκε ότι και τα τρία στελέχη κυκλοφόρησαν και απομονώθηκαν σε περιοχές εκτός Ελλάδος και μάλιστα τα στελέχη με ορότυπο Echo 3 και Echo7 σε περιοχές της Ασίας.

Τέλος πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική σύγκριση των στελεχών που ανιχνεύθηκαν με τα υπόλοιπα στελέχη του ίδιου ορότυπου ,για τα οποία υπάρχει κατατεθειμένη ολόκληρη η P1 περιοχή, καθώς και με τα αντίστοιχα πρότυπα Echo ιών και αναπαρίσταται γραφικά με τη βοήθεια του SimPlot. Για το στέλεχος με ορότυπο Echo 7 φαίνεται ότι στην καψιδιακή περιοχή υπάρχει μια ομοιότητα με Echo

7 στελέχη ενώ είναι πιθανόν αυτή να διακόπτεται όσο περνάμε στην λειτουργική περιοχή. Παρατηρείται μια αύξηση της ομοιότητας με ομόλογα στελέχη γεγονός που υποδηλώνει μέσω της συγκεκριμένης γραφικής απεικόνισης πιθανό ανασυνδυασμό. Αυτό μας δείχνει ότι, παρόλο που στην καψιδιακή περιοχή το στέλεχός μας ταξινομείται με Echo 7, θα πρέπει να συνεχιστεί η αλληλούχιση σε ολόκληρο το γένωμα του ιού για να ερευνηθεί και η πιθανότητα ανασυνδυασμών στη λειτουργική περιοχή.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουμε και για τους διαφορετικούς ορότυπους για τους οποίους πραγματοποιήθηκε γραφική απεικόνιση με SimPlot και φυσικά προτείνεται η συνέχιση της αλληλούχισης και στα άλλα δυο στελέχη που ανιχνεύθηκαν και η φυλογενετική τους ανάλυση για τον εντοπισμό πιθανών ανασυνδυασμών και ιδιαίτερα στη λειτουργική περιοχή του γενώματος τους. Και αυτό γιατί οι μεταλλάξεις και οι ανασυνδυασμοί μπορούν να οδηγήσουν σε νέους εντεροϊούς με άγνωστες μέχρι τώρα ιδιότητες. Συμπερασματικά ο έλεγχος του περοβάλλοντος κρίνεται ως απαραίτητος όχι μόνο για την παρακολούθηση της κυκλοφορίας των εντεροϊών σε ένα δεδομένο πληθυσμό αλλά και γιατί μπορεί να αποτελέσει μια πηγή απομόνωσης και μοριακού χαρακτηρισμού κυκλοφορούντων στελεχών

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agol V.I., Belov G.A., Bienz K., Egger D., Kolesnikova M.S., Romanova L.I., Sladkova L.V., and Tolskaya E.A.** (2000) Competing death programs in poliovirusinfected cells:commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J. Virol.*, 74:5534–5541.
- Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., and Barry R.D.** (1997) Integrin alpha v beta 6 enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, 239:71–77.
- Ambros V., and Baltimore D.** (1980) Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J. Biol. Chem.*, 255:6739–6744.
- Andersson P., Edman K., and Lindberg A.M.** (2002) Molecular analysis of the echovirus 18 prototype—Evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res.*, 85:71– 83.
- Arnold E., and Rossmann M.G.** (1990) Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refined at a resolution of 3.0 Å. *J. Mol. Biol.*, 211:763–801.
- Auvinen P., Stanway G., and Hyypia T.** (1989) Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch. Virol.*, 104:175–186.
- Barton D.J., Morasco B.J., and Flanagan J.B.** (1999) Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 73:10104–10112.
- Belnap D.M., McDermott B.M., Filman D.J., Cheng N.Q., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., and Steven A.C.** (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:73–78.
- Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M., Hemler M.E., and Finberg R.W.** (1992) Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*, 255:1718–1720.

Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., Stjohn N.F., Lin H.M., and Finberg R.W. (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6245-6248.

Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., and Finberg R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275:1320-1332.

Bhella D., Goodfellow I.G., Roversi P., Pettigrew D., Chaudhry Y., Evans D.J., and Lea S.M. (2004) The structure of echovirus type 12 bound to a two-domain fragment of its cellular attachment protein decay-accelerating factor (CD55). *J Biol Chem*. 279:8325-32.

Blomquist S., Bruu A.L., Stenvik M., and Hovi T. (2003) Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.*, 84:573–580.

Boege U., Ko D.S., and Scraba D.G. (1986) Toward an in vitro system for picornavirus assembly: Purification of mengovirus 14S capsid precursor particles. *J. Virol.*, 57:275–284.

Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorichis T. (2005) Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes*, 31:307-320.

Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., and Jacquemin-Sablon H. (2003) Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.*, 77:3353-3359.

Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R. (2001) Molecular strategy for ‘serotyping’ of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 82:79–91.

Carson S.D., Chapman N.N., and Tracy S.M. (1997) Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233:325-328.

Casas I., Powell L., Klapper P.E., and Cleator G.M. (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods*, 53:25–36.

Chetverin A.B. (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.*, 22:460:1-5.

Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., and Brown F. (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327:482-486.

Colunno R.J., Callahan P.L., Leippe D.M., Rueckert R.R., and Tomassini J.E. (1989) Inhibition of rhinovirus attachment by neutralizing monoclonal antibodies and their Fab fragments. *J. Virol.*, 63:36-42.

Colston E., and Racaniello V.R. (1994) Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.*, 13:5855–5862.

Colston E.M., and Racaniello V.R. (1995) Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J. Virol.*, 69:4823–4829.

Committee on the Enteroviruses. (1957) The enteroviruses. *Am. J. PublicHealth*, 47:1556–1566.

Costa-Mattioli M., Svitkin Y., and Sonenberg N. (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.*, 24:6861-6870.

Curry S., Abrams C.C., Fry E., Crowther J.C., Belsham G.J., Stuart D.I., and King A.M. (1995) Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Virol.*, 69:430–438.

Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., and Stuart D. (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: The structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 71:9743–9752.

Dasgupta A., Yalamanchili P., Clark M., Klierer S., Fradkin L., Rubinstein S., Das S., Shen Y., Weidman M.K., Banerjee R., Datta U., Igo M., Kundu P.,

Barat B. and Berk A.J. (2002) “*Molecular Biology of Picornaviruses*”. ASM Press, Washington, DC.

Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., van Depol S., Steinhauer D., DePolo N., and Holland J. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations:biological relevance-a review. *Gene*, 40:1-8.

Duggal R., Cuconati A., Gromeier M., and Wimmer E. (1997) Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13786–13791.

Duggal R., and Wimmer E. (1999) Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology*, 258:30–41.

Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K. (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 74:6570-6580.

Elices M.J. and Hemler M.E. (1989) The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86:9906-10.

Ellard F.M., Drew J., Blakemore W.E., Stuart D.I., and King A.M. (1999) Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Gen. Virol.*, 80:1911–1918.

Fenwick M.L., and Cooper P.D. (1962) Early interactions between poliovirus and ERK cells: some observations on the nature and significance of the rejected particles *Virology*, 18:212-223.

Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J., Minor P.D., and Hogle J.M. (1989) Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.*, 8:1567-1579.

Fricks, C. E., and Hogle, J. M. (1990) Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

Giachetti C., and Semler B.L. (1991) Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J. Virol.*, 65:2647–2654.

Giachetti C., Hwang S.S., and Semler B.L. (1992) cis-Acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J. Virol.*, 66:6045–6057.

Goodfellow I.G., Powell R.M., Ward T., Spiller O.B., Almond J.W., and Evans D.J. (2000b) Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59. *J. Gen. Virol.*, 81:1393–1401.

Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., and Evans D.J. (2001) Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface *J. Virol.*, 75:4918–492.

Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlor C.W., Kamarck M.E., and McClelland A. (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56:839–847.

Harber J., Bernhardt G., Lu H.H., Sgro J.Y., and Wimmer E. (1995) Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology*, 214:559–570.

He Y.N., Chipman P.R., Howitt, J., Bator C.M., Whitt M.A., Baker T.S., Kuhn R.J., Anderson C.W., Freimuth P., and Rossmann M.G. (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor *Nat. Struct. Biol.*, 8:874–878.

He Y.N., Mueller S., Chipman P.R., Bator C.M., Peng X.Z., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R. J., and Rossmann M.G. (2003) Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.*, 77:4827–4835.

Hendry E., Hatanaka H., Fry E., Smyth M., Tate J., Stanway G., Santti J., Maaronen M., Hyypia T., and Stuart D. (1999) The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure*, 7:1527–1538.

Herold J., and Andino R. (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell*, 7:581–591.

- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229:1358-1365.
- Hoover-Litty H., and Greve J.M.** (1993) Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J. Virol.*, 67:390-397.
- Hovanessian A.G., Puvion-Dutilleul F., Nisole S., Svab J., Perret E., Deng J.S., and Krust B.** (2000) The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell. Res.*, 261:312-28.
- Hughes P.J., North C., Minor P.D., and Stanway G.** (1989) The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol.*, 70:2943-2952.
- Hynes RO.** (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48:549-54.
- Hyypia T., Auvinen P., and Maaronen M.** (1989) Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 70:3261-3268.
- Hyypia T., and Stanway G.** (1993) Biology of coxsackie A viruses. *Adv. Virus Res.*, 42:343-373.
- Inoue T., Suzuki T., and Sekiguchi K.** (1989) The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70:919-934.
- Jarvis T.C., and Kirkegaard K.** (1992) Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.*, 11:3135-3145.
- Joki-Korpela P., and Hyypia T.** (2001) Parechoviruses, a novel group of human picornaviruses. *Ann. Med.*, 33:466-471.
- Karnauchow T.M., Tolson D.L., Harrison B.A., Altman E., Lublin D.M., and Dimock K.** (1996) The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.*, 70:5143-5152.
- Kew O.M., and Pallansch M.A.** (2002). "Molecular biology of picornaviruses". *ASM Press, Washington, DC*.
- King A.M.Q.** (1988) Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: an analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Res.*, 16:11705-11723.
- King AMQ., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg, A.C., Skern T., and Stanway G.** (2000) "Virus

taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Academic Press, San Diego, New York.

Kirkegaard K., and Baltimore D. (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47:433–443.

Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., and Wimmer E. (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291:547-553.

Kolatkar P.R., Bella J., Olson N.H., Bator C.M., Baker T.S., and Rossmann M.G. (1999) Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *EMBO J.* 18:6249-6259.

Kottaridi C., Bolanaki E., Siafakas N. and Markoulatos P. (2005) Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53:113-9.

Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., and Markoulatos P. (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.*, 151:1117-1132.

Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A. and Markoulatos P. (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58:407-12.

Kuge S., and Nomoto A. (1987) Construction of viable deletion and insertion mutants of the Sabin strain of type 1 poliovirus: function of the 5' noncoding sequence in viral replication. *J. Virol.*, 61:1478-1487.

Leveque N., Norder H. et al (2007) *Echovirus 6 strain derived from a clinical isolate show differences in haemagglutination ability and cell entry pathway.* *Virus research* 130 1-9

Lewis J.K., Bothner B., Smith T.J., and Siuzdak G. (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6774–6778.

Liao S., and Racaniello V. (1997) Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J. Virol.*, 71:9770–9777.

Lublin D.M., and Atkinson J.P. (1989) Decay accelerating factor: biochemistry, molecular biology and function. *Annu. Rev. Immunol.*, 7:35-58.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J. (2003a) Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*, 77:10423–10431.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., Karganova G.G., Reznik V.I., and Hinkkanen A.E. (2003b) Molecular epidemiology of enteroviruses causing uveitis and multisystem hemorrhagic disease of infants. *Virology*, 307:45–53.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., and Hinkkanen A.E. (2004) Recombination in uveitis-causing enterovirus strains. *J. Gen. Virol.*, 85:463-470.

Lukashev A.N. (2005a) Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.*, 15:157-167.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J. (2005b) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.*, 86:3281-3290.

Mateu M.G. (1995) Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.*, 38:1-24.

Manzara S. et al (2002) Molecular identification and typing of enteroviruses isolated from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology* p 4554-4560.

Melnick J.L. (1996) “Fields Virology”. 3rd Ed., PA: Lippincott/Raven, Philadelphia.

Mendelsohn C.L., Wimmer E., and Racaniello V.R. (1989) Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:855–865.

Mirand A. , Archimbaud C. et al (2006) Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. *J of medical virology* 78:1624-1634.

Minor P.D., Pipkin P.A., Hockley D., Schild G.C., and Almond J.W. (1984) Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus. *Virus Res.*, 1:203-212.

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry, T., and Weissbrich, B. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:202–227.

Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001) Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA*, 7:1126-1141.

Nasri D. et al (2007) Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. of clinical microbiology* p 2370-2379

Nobis P., Zibirre R., Meyer G., Kuhne J., Warnecke G., and Koch G. (1985) Production of a monoclonal antibody against an epitope on HeLa cells that is the functional poliovirus binding site. *J. Gen. Virol.*, 66:2563-2569.

Norder H., Bjerregaard L., and Magnius L.O. (2002) Open reading frame sequence of an Asian enterovirus 73 strain reveals that the prototype from California is recombinant. *J. Gen. Virol.*, 83:1721–1728.

Novak J.E., and Kirkegaard K. (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.*, 65:3384–3387.

Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A. (1998b) Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res.*, 58:35–43.

Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., and Pallansch M.A. (1999a) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.*, 73:1941–1948.

Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Brown B.A., and Pallansch M.A. (1999b) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1288-1293.

Oberste M.S., Schnurr D., Maher K., Al-Busaidy S., and Pallansch M.A. (2001) Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J. Gen. Virol.*, 82:409–416.

Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Uddin M., Norder H., Lau C.S., Chomel J.J., Magnius L., and Pallansch M.A. (2004a) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV 75. *J. Gen. Virol.*, 85:3205-3212.

Oberste M.S., Penaranda S., and Pallansch M.A. (2004b) RNA Recombination Plays a Major Role in Genomic Change during Circulation of Coxsackie B Viruses. *J. Virol.*, 78:2948-2955.

Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A. (2004c) Evidence for frequent recombination within species Human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.*, 78:855–867.

Oprisan G., Combiescu M., Guillot S., Caro V., Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R. (2002) Natural genetic recombination between cocirculating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 83:2193– 2200.

Palmenberg A.C. (1982) In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *J. Virol.*, 44:900–906.

Palmenberg A.C. (1989). “Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection”. *American Society for Microbiology, Washigton, D.C.*

Parsley T.B., Towner J.S., Blyn L.B., Ehrenfeld E., and Semler B.L. (1997) Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA*, 3:1124–1134.

Pasch A., Kupper J.H., Wolde A., Kandolf R., and Selinka H.C. (1999) Comparative analysis of virus-host cell interactions of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of coxsackievirus B3. *J. Gen. Virol.*, 80:3153-3158.

Paul A.V., van Boom J.H., Filipov D. and Wimmer E. (1998) Protein primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393:280-284.

Perez L. and Carrasco L. (1993) Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol.*, 67:4543–4548.

Petersen J.F., Cherney M.M., Liebig H.D., Skern T., Kuechler E., and James M.N. (1999) The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: A proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J*, 18:5463–5475.

Pilipenko E.V., Blinov V.M., Romanova L.I., Sinyakov A.N., Maslova S.V., and Agol V.I. (1989) Conserved structural domains in the 5'-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology*, 168:201–209.

Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., and Koch G. (1989) Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn^{2+} . *J. Virol.*, 63:3954–3960.

Rentz A. , et al (2006) Investigation of treatment failure in neonatal echovirus 7 infection.

Rivera V.M., Welsh J.D., and Maizel J.V. (1988) Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*, 165:42–50.

Rombaut B., Vrijksen R., and Boeye A. (1990) New evidence for the precursor role of 14 S subunits in poliovirus morphogenesis. *Virology*, 177:411–414.

Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., and Mosser A.G. (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317:145–153.

Rossmann M.G. (1989) The canyon hypothesis: Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* 264:14587–14590.

Ruoslahti E., and Pierschbacher M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238:491–497.

Rueckert R.R. (1985) “Virology”. *BN Fields, Raven press, New York, USA*.

Santti J., Hyypia T., Kinnunen L., and Salminen M. (1999) Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.*, 73:8741–8749.

Selinka H.C., Wolde A., Sauter M., Kandolf R., and Klingel K. (2004) Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)*, 193:127-131.

Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., and Barry RD. (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.*, 71:4736-4743.

Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., and Spyrou N. (2000) Isolation of Polioviruses and Other Enteroviruses in South Greece Between 1994 and 1998. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:157-163.

Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Stanway G. (2001) Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 15:87-95.

Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., and Kourea-Kremastinou J. (2002a) A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol. Cell. Probes.*, 16:209-216.

Siafakas N., Markoulatos P., and Stanway G. (2002b) Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J. Mol. Evol.*, 55:638-652.

Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., and Kourea-Kremastinou J. (2003). Molecular subgrouping of Enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.*, 17:113-123.

Skinner M.A., Racaniello V.R., Dunn G., Cooper J., Minor P.D., and Almond J.W. (1989) New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J. Mol. Biol.*, 207:379-392.

Smith T.J., Kremer M.J., Luo M., Vriend G., Arnold E., Kamer G., Rossmann M.G., McKinlay M.A., Diana G.D., and Otto M.J. (1986) The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*, 233:1286-1293.

- Smith T.J., Chase E.S., Schmidt T.J., Olson N.H. and Baker T.S.** (1996) Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon. *Nature*, 383:350–354.
- Sommergruber W., Casari G., Fessl F., Seipelt J., and Skern T.** (1994) The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme. *Virology*, 204:815–818.
- Sonenberg N., and Pelletier J.** (1989) Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism. *Bioessays*, 1:128–132
- Spiller O.B., Goodfellow I.G., Evans D.J., Hinchliffe S.J., and Morgan B.P.** (2002) Coxsackie B viruses that use human DAF as a receptor infect pig cells via pig CAR and do not use pig DAF. *J. Gen. Virol.*, 83:45–52.
- Springer T.A.** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346:425–434.
- Stanway G., Hughes P.J., Mountford R.C., Minor P.D., and Almond J.W.** (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.*, 12:7859–7815.
- Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 71:2483–2501.
- Staunton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D., and Springer T.A.** (1989) A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*, 56:849–853.
- Tang R.S., Barton D.J., Flanagan J.B., and Kirkegaard K.** (1997) Poliovirus RNA recombination in cell-free extracts. *RNA*, 3:624–633.
- Thoelen I., Lemey P., van der Donck I., Beuselinck I., Lindberg A.M., and van Ranst M.** (2003) Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J. Med. Virol.*, 70:420–429.
- Thoelen I., Moës E., Lemey P., Mostmans S., Wollants E., Lindberg A.M., Vandamme A., and van Ranst M.** (2004) Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human Enterovirus B species. *J. Clin. Microbiol.*, 42:963–971.

Tomassini J.E., Graham D., DeWitt C.M., Lineberger D.W., Rodkey J.A., Colonna R.J. (1989) cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:4907-4911.

Tomko R.P., Xu R., Philipson L. (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3352-3356

Torgersen H., Skern T., and Blaas D. (1989) Typing of human rhinoviruses based on sequence variations in the 5' non-coding region. *J. Gen. Virol.*, 70:3111-3116.

Tosteson M.T., and Chow M. (1997) Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.*, 71:507-511.

Trono D., Andino R., and Baltimore D. (1988) An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *J. Virol.*, 62:2291-2299.

Van Vlijmen H.W., Curry S., Schaefer M., and Karplus M. (1998) Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol.*, 275:295-308.

Wang X., and Bergelson J.M. (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.*, 73:2559-2562.

Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., and Almond J.W. (1998) Role for beta2- microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.*, 72:5360-5365.

White J.M., and Littman D.R. (1989) Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:725-728.

Xiao C., Bator-Kelly C.M., Bowman V.D., Rieder E., He Y.N., Hebert B., Bella J., Baker T.S., Wimmer E., Kuhn R.J., and Rossmann M.G. (2001) Interaction of coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1. *J. Virol.*, 75:2444-2451.

Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., and Semler B.L. (1988a) Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166:265-270.

