



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος

Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΔΑΣΚΟΥ ΜΑΡΙΑ

Ανάπτυξη μίας Stem Loop Mediated Reverse
Transcription Real Time PCR για τον εντοπισμό ενεργών
εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργεια

Λάρισα 2018

Ανάπτυξη μίας Stem Loop Mediated Reverse Transcription Real Time PCR για τον
εντοπισμό ενεργών εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργεια.

Development of a Stem Loop Mediated Reverse Transcription Real Time PCR for the
detection of actively replicating Enteroviruses in a cell culture.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η μεταπτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Τοξικολογία», από το Μάιο του 2017 έως το Δεκέμβριο του 2017.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την ανάθεση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά το διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, αλλά και για τη συνεχή υποστήριξη του, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αργύριο και Ελένη τόσο για την οικονομική, αλλά κυρίως για την ηθική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος των εντεροϊών. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και μία 3'αμετάφραστη περιοχή που καταλήγει σε πολύ(A)-ουρά. Οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, αλλά σε ένα ποσοστό οδηγούν στην εμφάνιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η παραλυτική πολιομυελίτιδα.

Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση του πληθυσμού για τυχόν ύπαρξη διαφόρων στελεχών εντεροϊών, καθώς και ο έλεγχος της αντιγραφικής ενεργότητας αυτών, διότι η ανίχνευση αποκλειστικά του γονιδιώματός τους, δεν αποτελεί απόδειξη της ενεργότητας των εντεροϊών ώστε να κατανοήσουμε πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν στον πληθυσμό.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία ειδική Stem Loop Reverse Transcription Real Time PCR, η οποία επέτρεψε την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) των στελεχών Sabin 1, Echo 12 και CAV13. Μέσω της ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, δημιουργήθηκαν τρεις κινητικές μελέτες για την αντιγραφική δραστηριότητα των τριών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Η τεχνική αυτή χάρη στη χαρακτηριστική δομή του εκκινητή που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της RT, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ παράλληλα δεν είναι καθόλου χρονοβόρα συγκριτικά με τις κυτταροκαλλιέργειες. Επιπλέον, ο σχεδιασμός του ειδικού stem loop εκκινητή της RT έχει γίνει στοχεύοντας την 5'UTR των εντεροϊών, που είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των εντεροϊών

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εφαρμογή της μοριακής αυτής τεχνικής, η ανίχνευση την αντιγραφικής ενεργότητας των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν πραγματοποιήθηκε επιτυχώς σε συγκεκριμένες ώρες μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, καθιστώντας αυτή την τεχνική ένα χρήσιμο εργαλείο που μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών που αφορούν γενικά όλους τους εντεροϊούς.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to *Picornaviridae* family to *Enterovirus* genus. Their genome is a positive sense, single strand RNA molecule (+ssRNA), of 7.500 nucleotides in length, surrounded by a viral icosahedral protein capsid. Their genome are consisted of a highly conserved 5' untranslated region, an open reading frame and a 3' untranslated region ending in a poly(A)-tract. Most infections with enteroviruses are asymptomatic; but in some instances Enteroviruses can cause different clinical symptoms ranging from aseptic meningitis to paralytic poliomyelitis.

For that reason, it is important to monitor the population for circulating enteroviruses. But, the detection of their genome, doesn't reflect the ability of enteroviruses to replicate and infect their hosts.

In the present study, a specific Stem Loop Mediated Reverse Transcription Real Time PCR assay was developed, which allowed the detection of the negative strand (replicative strand) of Sabin 1, Echo 12 and CAV13 strains. Through the detection of the negative strand in specific hours after the infection of a cell culture, we created one kinetic for replication activity of each strain. The structure of RT-primer provides high sensitivity and specificity to this molecular technique, whereas it is no time-consuming compared to cell cultures. Furthermore, the stem-loop primer was designed targeting on 5' UTR of enteroviruses, a highly conserve region between all enteroviruses. This fact, allows to the present assay to detect the negative strand of the most viruses belong to Enterovirus genus.

According to our results, the detection of the negative strand was achieved in specific hours post infection in all tested strains, making this specific RT- REAL TIME PCR assay a useful tool for the detection of actively replicating Enteroviruses.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1.1	Βιολογία των εντεροϊών.....	10
1.2	Ταξινόμηση των εντεροϊών	10
1.3	Δομή και αντιγονικότητα των ιοσωματίων	12
1.4	Οργάνωση και δομή του ιικού γονιδιώματος	14
1.5	Κύκλος ζωής εντεροϊών.....	16
1.6	Παθογένεια	25
1.7	Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών	26
1.8	Επιδημιολογία	29
2.	Σκοπός της εργασίας.....	31
3.	Υλικά και μέθοδοι	32
3.1	Πρότυπα στελέχη	32
3.2	Καλλιέργεια ιών	32
3.3	Υπολογισμός του CCID50	33
3.4	Υπολογισμός του ιικού τίτλου για το CAV13 μέσω Real Time PCR	34
3.5	Σειριακές Αραιώσεις	35
3.6	Μέτρηση κυττάρων.....	35
3.7	Υπολογισμός MOI.....	37
3.8	Μόλυνση κυττάρων και απομονώσεις σε συγκεκριμένες ώρες	37
3.9	Εκχύλιση του ιικού RNA	37
3.10	Σχεδιασμός ειδικών εκκινητικών μορίων.....	38
3.11	Αντίστροφη μεταγραφή (RT).....	39
3.12	Real Time PCR.....	40
3.13	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR.....	41

4.	Αποτελέσματα	43
4.1	Αποτελέσματα Real Time PCR για τον προσδιορισμό του ιικού τίτλο του CAV13.	43
4.2	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Sabin 1 [10^6] CCID ₅₀	45
4.3	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Sabin 1 [1] CCID ₅₀	47
4.4	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Echo 12 [10^6] CCID ₅₀	49
4.5	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Echo 12 [1] CCID ₅₀	51
4.6	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το CAV13 [10^6] CCID ₅₀	53
4.7	Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το CAV13 [1] CCID ₅₀	55
5.	Συζήτηση	56
6.	Βιβλιογραφία	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος *Enterovirus*. Είναι μη ελυτροφόροι ιοί και το γονιδίωμα τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+) ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Η οικογένεια των ιών Picorna, εκτός από τους εντεροϊούς, περιλαμβάνει και άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως είναι οι πολιοϊοί, ο ιός της ηπατίτιδας Α, οι ρινοϊοί και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών, υποδηλώνει το μικρό τους μέγεθος (pico) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος το οποίο απαρτίζει το ιϊκό τους γονιδίωμα (RNA) [1].

1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια *Picornaviridae* αποτελείται από 35 γένη, σύμφωνα με τη νέα εγκεκριμένη από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV), το Σεπτέμβριο του 2017 [2,3,4].

<i>Ampivirus</i>	<i>Aphthovirus</i>	<i>Aquamavirus</i>	<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avisivirus</i>
<i>Cardiovirus</i>	<i>Cosavirus</i>	<i>Dicipivirus</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Erbovirus</i>
<i>Gallivirus</i>	<i>Harkavirus</i>	<i>Hepatovirus</i>	<i>Hunnivirus</i>	<i>Kobuvirus</i>
<i>Kunsagivirus</i>	<i>Limnipivirus</i>	<i>Megrivirus</i>	<i>Mischivirus</i>	<i>Mosavirus</i>
<i>Oscivirus</i>	<i>Parechovirus</i>	<i>Pasivirus</i>	<i>Passerivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>
<i>Rabovirus</i>	<i>Rosavirus</i>	<i>Sakobuvirus</i>	<i>Salivirus</i>	<i>Sapelovirus</i>
<i>Senecavirus</i>	<i>Sicinivirus</i>	<i>Teschovirus</i>	<i>Torchivirus</i>	<i>Tremovirus</i>

Πίνακας 1.2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των 35 γενών της οικογένειας *Picornaviridae*

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται βάσει των ομοιοτήτων που εμφανίζουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσωματίου, τη γενωμική αλληλουχία και την οργάνωση του γονιδιώματος [1]. Το γένος των εντεροϊών είναι το σημαντικότερο όσον αφορά τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο. Αρχικά, αποτελούνταν από μέλη που κατατάσσονται στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες: Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), ιοί Cocksackie A (CAV, ορότυποι 1-24), ιοί Cocksackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και ιοί Echo (E, ορότυποι 1-33) [1]. Όμως με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 13 διακριτά είδη με πολλαπλούς ορότυπους ο καθένας.

Κάθε ορότυπος σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και, σε

Γένος εντεροϊών	Ορότυποι
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus I</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	54

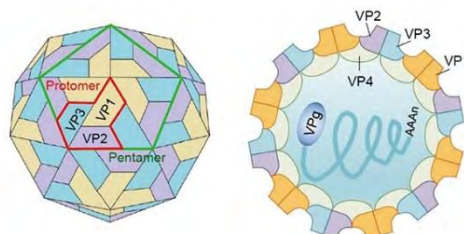
μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Cocksackie A ή B και ιούς Echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί Cocksackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί Cocksackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητάς τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντί-ορών [1].

Πίνακας 1.2.2: Νέα ταξινόμηση εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν πιο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται με την ανακάλυψη νέων ιών που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς οροτύπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς όμως, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [1]. Πλέον, οι νέοι εντεροϊοί ταξινομούνται με χρονολογική σειρά δίνοντας τους έναν αύξοντα αριθμό (EV-X 68-121), όπου X το γράμμα της ομάδας στην οποία ανήκουν.

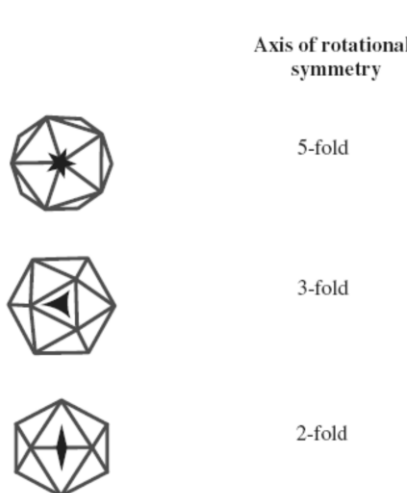
1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιοσωματίων

Τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Είναι απλά καθώς αποτελούνται αποκλειστικά από πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA και δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο. Τα



Εικόνα 1.3.1: Δομή ενός ιού Picorna [5]

καψίδια των εντεροϊών σχηματίζονται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές



δόμησης των ιών [6,7], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ένα εικοσάεδρο είναι ένα στερεό σώμα που αποτελείται από είκοσι τριγωνικές πλευρές και δώδεκα κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μίας τέτοιας δομής, είναι 60.

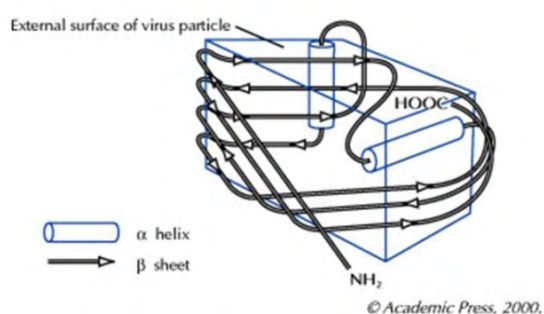
Εικόνα 1.3.2:

Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο[8]

Στο καψίδιο εντοπίζονται 3 άξονες συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται

ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων Χ ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους, οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή[8]. Βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η βασική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές το οποίο συνίσταται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4.

Κατά τη συναρμολόγηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο. Κατά την καψιδίωση του RNA του ιού, πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης, κατά την οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες του ιού, με σκοπό τη σταθεροποίηση του ώριμου

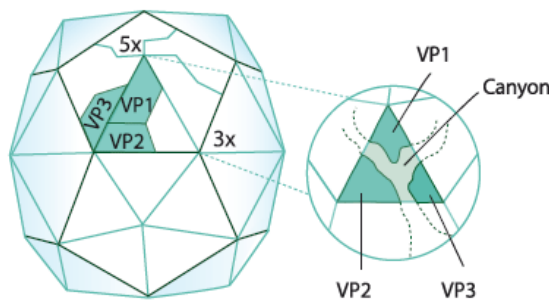


Εικόνα 1.3.3: Απεικόνιση του οκταπλού πλέγματος β'-βαρελίου [1]

πλέον ιού. Τελικά, οι VP1,VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται εξ'ολοκλήρου εσωτερικά του καψιδίου [9]. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία όσον αφορά την αλληλουχία τους, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις , οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA και N-AgIIIB [10]:

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIa αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIB από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.



Εικόνα 1.3.4: Σχηματική αναπαράσταση της αύλακας (canyon) [11]

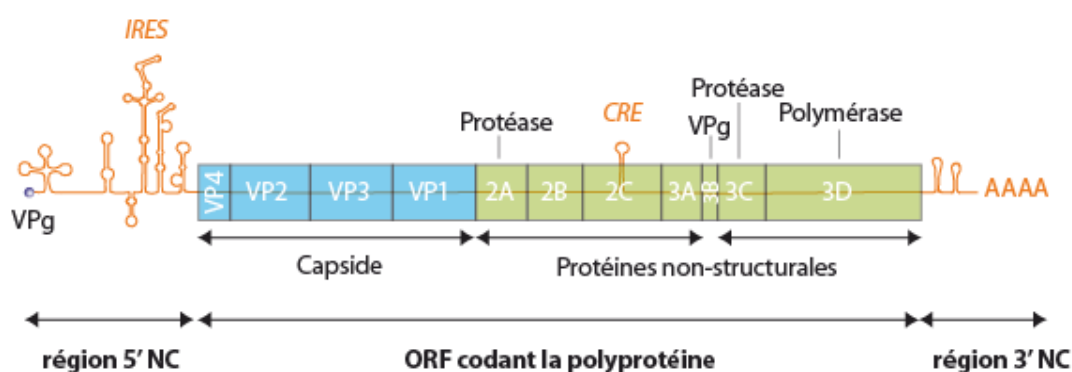
Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ [10]. Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται τόσο από προεξοχές όσο και από

αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά αυλάκωση (canyon), η οποία διαμορφώνεται στη σύνδεση της VP1 με τη VP3 και εντοπίζεται περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας, η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα.

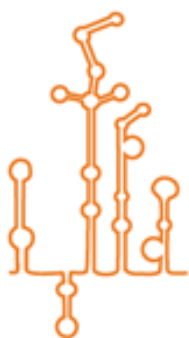
1.4 Οργάνωση και δομή του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Μετά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα με σκοπό να παραχθούν όλες οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τα

επιμέρους τμήματα: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την poly (A) ουρά, μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή. Το γενωμικό RNA των πολιοϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [6,12]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [13,14].



Εικόνα 1.4.1: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών [11]



Εικόνα 1.4.2: Περιοχή IRES [11]

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μακριές, περίπου 750 νουκλεοτίδια και υψηλά συντηρημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNAs με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [15].

Βιοχημικές μελέτες που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες [16]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [17].

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι αρκετά μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [18]. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA [19]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [20,21]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρουν μια πολύ(A) ουρά [22].

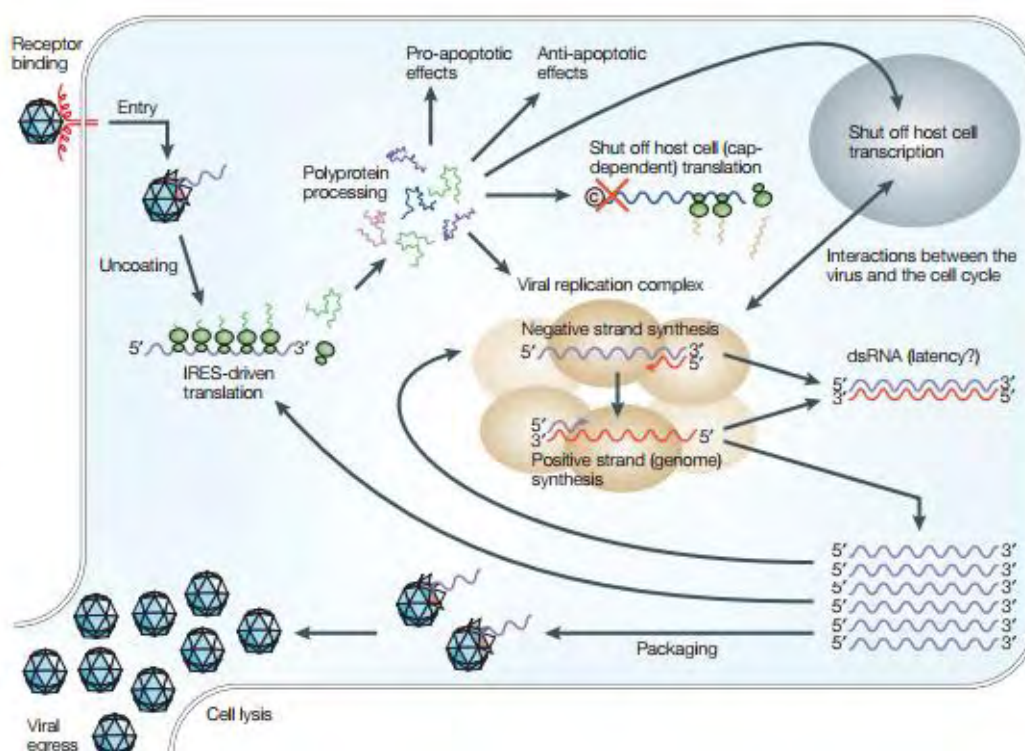
1.5 Κύκλος ζωής εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά, πραγματοποιείται η σύνδεση με τον κυτταρικό υποδοχέα και στη συνέχεια επιτελείται η είσοδος στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Ακολουθεί η διαδικασία της απέκδυσης, κατά την οποία το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα έπειτα από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, λειτουργεί απευθείας ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται αμέσως μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή χρησιμοποιώντας τα κυτταρικά ριβοσώματα. Το αποτέλεσμα της μετάφρασης είναι μία πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται και προκύπτουν τόσο οι δομικές, όσο και οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μία από τις λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι η 3D ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία καταλύει την αντιγραφή. Η αντιγραφή του ιού γίνεται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να

μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των (+) RNA κλώνων θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA και ένα μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού λοιπόν γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και η έξοδος του από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου [1].

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού, ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστή και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [15].

Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια:



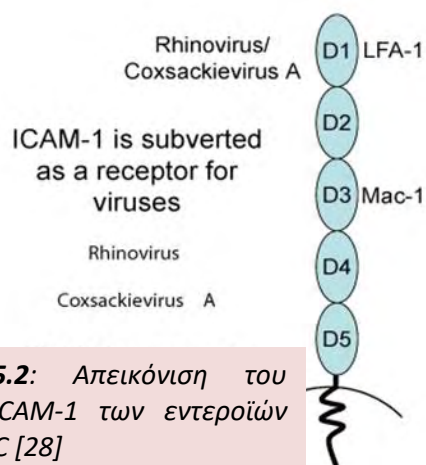
Εικόνα 1.5.1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των ιών Picorna [23]

A. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με τη σύνδεσή τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και

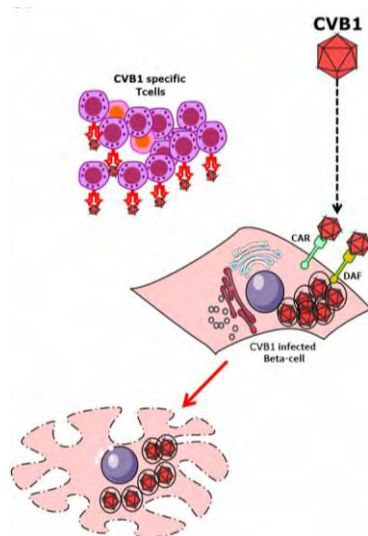
γλυκολιπίδια. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [24]. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη αύλακα (canyon) και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [25].

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει ποιά κύτταρα μπορεί να μολύνει κάθε ιός, δηλαδή τον τροπισμό του και εν μέρει, την παθογόνο δράση του, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών [26,27].



Ορισμένα μέλη των εντεροϊών της ομάδας C, όπως για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie A (CAV 13,17,20,21,24), χρησιμοποιούν τον υποδοχέα ICAM-1 ή αλλιώς CD54 για την είσοδό τους στο κύτταρο ξενιστή [27]. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.

Οι περισσότεροι εντεροϊοί της ομάδας B χρησιμοποιούν τα ευρέως διαθέσιμα μόρια DAF (decay-accelerating factor) και CAR (Coxsackie and adenovirus receptor) για να εισέλθουν στα κύτταρα ξενιστές τους [29]. Ορισμένα μέλη των εντεροϊών της ομάδας B, όπως για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie B (B1-B6)



Εικόνα 1.5.3: Απεικόνιση της σύνδεσης του CVB1 με τους υποδοχείς DAF και CAR στα β-λεμφοκύτταρα[30]

χρησιμοποιούν τον υποδοχέα CAR ενώ ορισμένοι Echo ιοί όπως (E6,E7,E11,E12,E13,E20,E21,E29,E33) χρησιμοποιούν τον υποδοχέα DAF. Τον υποδοχέα DAF μπορούν να χρησιμοποιήσουν επίσης οι ιοί Coxsackie B1,B3,B5.

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του, οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν, τα οποία καλούνται altered ή A σωματίδια,

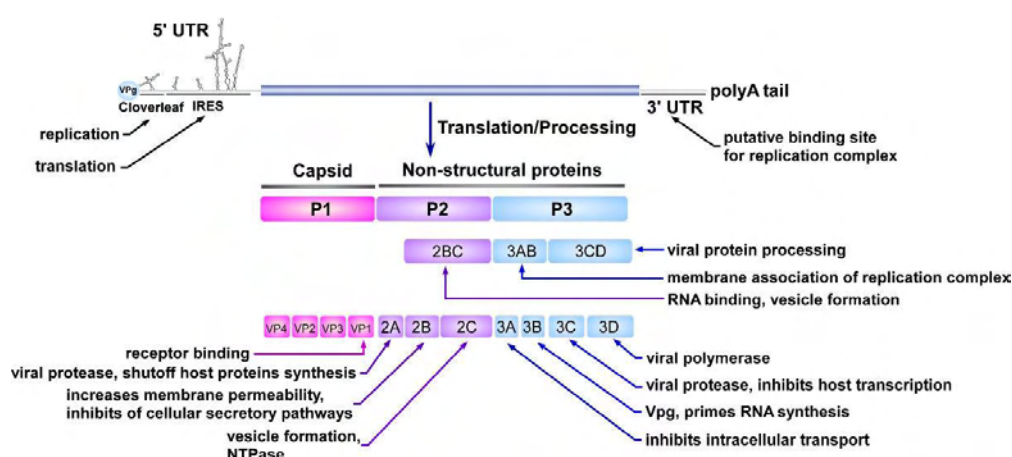
περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων A [31]. Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του [15].

B. Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως

συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [32]. Νουκλεοτιδική αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού, ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο των εντεροϊών, αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο, που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [17,27]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συντίθενται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεΐνάσες: την 2Apro και την 3Cpro ή 3CDpro [15].



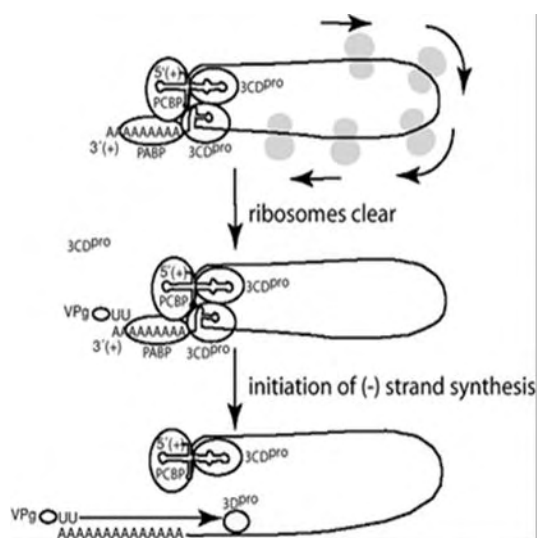
Εικόνα 1.5.4: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης [33]

Τόσο η 3Cpro όσο και η 2Apro είναι ενεργές στο πολυπεπτίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό-τεμαχισμό. Μόλις ελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός αποτελεί η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2Apro. Στη συνέχεια η 3CDpro απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Αυτή η πρωτεΐνη, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3Cpro. Τόσο η 3Cpro όσο και η 3CDpro επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την 3CDpro, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3Cpro, 3Dpol και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3Dpol αλληλουχία μέσα στην 3CDpro απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστηριότητα επεξεργασία από το 3Cpro μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση την πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστηριότητες [15].

Γ. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει μετά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή και πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται από ικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αυτού αποτελεί και το ιικό RNA, που περιέχει *cis*-

acting όπως η δομή “cloverleaf” που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο [34-37]. Οι ιικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3Dpol και την 3CDpro, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ιικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [38].



Εικόνα 1.5.5: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου [1]

Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας [39]. Ένα μοντέλο αντιγραφής του RNA θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI →

RNA(+), όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη καθώς, η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [40].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού (3Dpol) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης 3CDpro, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεϊνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης. Η 3Dpol είναι ένα

ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η 3Dpol δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδυλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίζει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδυλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το *cre* (*cis-acting replication element*), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών [41-43].

Επομένως, συνειδητοποιούμε πως το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA, αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός, όπου η δομή *cloverleaf* (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει πότε το RNA αντιγράφεται και πότε μεταφράζεται [44]. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCBP) στην δομή αυτή, επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή *cloverleaf*, καταστέλλει τη μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα.

Δ. Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, η οποία είναι η πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεϊνάση 3CDpro. Οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική

επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Μέσω αυτής της επεξεργασίας παράγεται το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Στη συνέχεια, πέντε πρωτομερή συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνωση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνάσες [13,40].

Η καψιδίωση των ιών picorna είναι εξαιρετικά ειδική και οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [13,40]. Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει την VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

Όσον αφορά την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [45].

Ε. Επιπτώσεις στο κύτταρο ξενιστή

Με τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή από κάποιον εντεροϊό, αναστέλλονται κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της δράσης ορισμένων ιικών πρωτεϊνών που προκύπτουν έπειτα από το τεμαχισμό της πολυπρωτεΐνης, η οποία παράγεται ύστερα από τη μετάφραση του θετικής πολικότητας RNA του εντεροϊού. Αρχικά, η 2A πρωτεάση διασπά τον παράγοντα p220 του συμπλόκου eIF-4F, που απαιτείται για τη μετάφραση των κυτταρικών mRNAs που εξαρτάται από την 5' καλύπτρα. Καθώς το RNA των εντεροϊών δε φέρει

μεθυλιωμένη καλύπτρα στο 5' άκρο του, αλλά είναι τροποποιημένο από την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης, το RNA του ιού συνεχίζει να μεταφράζεται. Έτσι, με αυτό τον τρόπο ο ιός καταστέλλει την μετάφραση του κυττάρου ξενιστή ενώ δεν επηρεάζεται η μετάφραση του δικού του RNA [23].

Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι εκτός από τη μετάφραση, αναστέλλεται και η μεταγραφή του κυττάρου-ξενιστή έπειτα από λοίμωξη με κάποιον ιό ricorna. Πιο συγκεκριμένα, μετά τη μόλυνση ενός κυττάρου ξενιστή με κάποιον πολιοϊό, αναστέλλεται η μεταγραφή που επιτελείται και από τα τρία είδη RNA πολυμερασών που υπάρχουν στα κύτταρα. Αυτό το φαινόμενο φαίνεται να μεσολαβείται από την 3C πρωτεάση, η οποία διασπά πολλούς κυτταρικούς μεταγραφικούς παράγοντες σε κατάλοιπα Gln-Gly [23,46]. Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι ο κύκλος ζωής των εντεροϊών ολοκληρώνεται στο κυτταρόπλασμα και η μεταγραφή του κυττάρου πραγματοποιείται στον πυρήνα, Πώς λοιπόν η 3C πρωτεάση αποκτά πρόσβαση στον πυρήνα; Μία πρόσφατη μελέτη δείχνει πως επειδή η 3C πρωτεάση στερείται σήμα εντοπισμού στον πυρήνα (NLS), εισέρχεται στον πυρήνα με την πρόδρομη μορφή 3CD, καθώς η 3D φαίνεται να διαθέτει ένα NLS. Η πρόδρομη μορφή 3CD στη συνέχεια παράγει την 3C με αυτοκατάλυση, οδηγώντας τελικά στη διάσπαση των μεταγραφικών παραγόντων στον πυρήνα [46].

Επίσης, έχει φανεί ότι μετά τη μόλυνση του κυττάρου από έναν ιό ricorna έχουμε τόσο προ-αποπτωτικές όσο και αντι-αποπτωτικές επιδράσεις στο κύτταρο. Έχει προταθεί ότι ενώ αρχικά οι ιοί ricorna προάγουν την απόπτωση, λίγο πριν επιτευχθεί ο κυτταρικός θάνατος ενεργοποιούν ένα εναλλακτικό μονοπάτι ώστε να προλάβουν να ολοκληρώσουν την αντιγραφή τους [23].

1.6 Παθογένεια

Η μόλυνση με εντεροϊούς ξεκινά από το πεπτικό σύστημα και η είσοδος του εντεροϊού γίνεται κυρίως από το στόμα. Αρχικά η μόλυνση συμβαίνει στις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντέρου και ακολουθεί μόλυνση των τοπικών λεμφαδένων και πολλαπλασιασμός του ιού. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η είσοδος του ιού στην κυκλοφορία του αίματος (ιαμία), όπου ο πολλαπλασιασμός

του ιού γίνεται εντονότερος και τελικά πραγματοποιείται η μεταφορά στο όργανο-στόχο. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [47,48].

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση πολύ σοβαρών ασθενειών όπως μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπεται από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [47,48].

1.7 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών

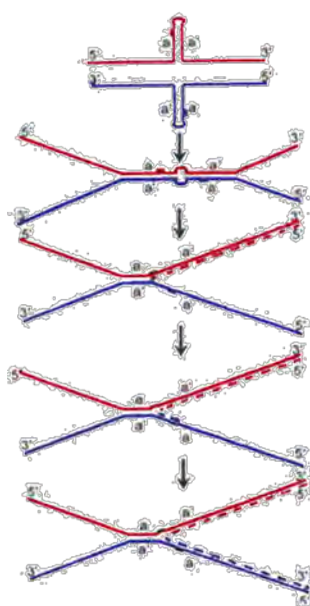
Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί που οφείλονται για τη μεγάλη ποικιλομορφία και εξέλιξη των εντεροϊών: Α. Οι μεταλλάξεις Β. Ο ανασυνδυασμός [49].

A. Μεταλλάξεις

Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA εντοπίζεται i) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και ii) στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών [50]. Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η

μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [51].

Χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Άμεσο αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών, όπως ότι η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα. Μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα, δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα [52].



Εικόνα 1.7.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας [59]

B. Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς από τον Hirst το 1962. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης σε σχέση με τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός [53].

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που

συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επίσης, συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) [54,55].

Ο βασικός μηχανισμός για να συμβεί ανασυνδυασμός είναι ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικού κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, το ένζυμο μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας [56] ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο [57] και να σταματήσει τη σύνθεση του (-) RNA.

Έτσι, η ιική 3D πολυμεράση αποδεσμεύεται μαζί με το νεοσυντιθέμενο κλώνο και μεταπηδά σε έναν άλλον RNA κλώνο θετικής πολικότητας, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει πλέον σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Ως αποτέλεσμα είναι η δημιουργία χιμαιρικών μορίων. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος [58], αντίθετα μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς.

Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-) RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία.

Εκτός από τον αντιγραφικό μηχανισμό, ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί και μέσω του μηχανισμού ρήξης και επανένωσης. Ο μηχανισμός αυτός σε αντίθεση με τον προηγούμενο είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση δύο

ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου [59]. Όμως, αυτός ο μηχανισμός είναι πολύ πιο σπάνιος σε σχέση με τον μηχανισμό αλλαγής μήτρας που περιγράφηκε προηγουμένως.

1.8 Επιδημιολογία

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων προσφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες.

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς:

- A. παρέχουν την ευκαιρία για ταυτοποίηση του στελέχους
- B. παρέχουν γνώσεις σχετικά με την κατάταξη των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους
- Γ. διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων

Για τους εντεροϊούς, η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχηση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μεταξύ αρκετών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων άγριων εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών [60].

Η τεχνολογία της αλληλούχησης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PVs, όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών [61,62]. Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί: (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία και (γ) διαφορές μεταξύ των απομονωθέντων στελεχών από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των

διαφόρων στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση τους [63-65].

Μελέτες σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογία των μη-πόλιο εντεροϊών, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση των απομονώσεων του ιού μέσα σε ένα ορότυπο, καθώς και τη σύγκριση των απομονώσεων από διαφορετικούς οροτύπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός της οικογένειας Picornaviridae.

Οι non-polio εντεροϊοί, όπως για παράδειγμα οι Coxsackie A και B ιοί, αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία είναι η πιο συχνή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις εντεροϊών. Σε εύκρατα κλίματα, αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Τα μικρά παιδιά είναι τα πιο κοινά θύματα, επειδή ο αριθμός των μολύνσεων με εντεροϊούς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ηλικία των ευπαθών ατόμων. Τα νεογνά είναι σε κίνδυνο για σοβαρή συστηματική νόσο όπως ηπατική νέκρωση, μυοκαρδίτιδα, και νεκρωτική εντεροκολίτιδα, εκ των οποίων μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, είναι πλέον συνήθεις νόσοι.

2. Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας διατριβής, ήταν η ανάπτυξη μίας γρήγορης και εξειδικευμένης τεχνικής Stem Loop Reverse Transcription Real Time PCR για τον εντοπισμό αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργεια, χρησιμοποιώντας τα πρότυπα στελέχη Sabin 1, Echo 12 και CAV13. Ουσιαστικά, στόχος ήταν η δημιουργία μίας κινητικής μελέτης για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, που αντικατοπτρίζει την αντιγραφική ενεργότητά τους, καθώς όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή για να ξεκινήσει η αντιγραφή των εντεροϊών πρέπει το γονιδίωμά τους να μετατραπεί αρχικά σε αρνητικής πολικότητας RNA από την 3D RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση τους, ώστε να χρησιμοποιηθεί σαν μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1 Πρότυπα στελέχη

Για το σχεδιασμό και την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1, το στέλεχος CAV13 που ανήκουν στους εντεροϊούς της ομάδας C και το πρότυπο στέλεχος Echo 12 που ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας B.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός καταχώρησης
PV-1	Sabin (LSc, 2ab)	V01150
CAV 13	Flores (Mexico/52)	AF499637
E12	Travis (Philippines/53)	X79047

Πίνακας 3.1.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων στελεχών, όπου αναφέρεται ο ορότυπος, το στέλεχος και ο αριθμός καταχώρησης του κάθε ιού.

3.2 Καλλιέργεια ιών

Αρχικά, 100μl από κάθε πρότυπο στέλεχος ενοφθαλμίστηκαν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα Rd σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 2% ορό. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Rd μη μολυσμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 2% ορό). Στη συνέχεια, ακολούθησαν αρκετές επανακαλλιιεργειες του κάθε ιού με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου, έτσι ώστε να εμφανίζεται πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, οι φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιικού τίτλου του ιού.

3.3 Υπολογισμός του CCID₅₀

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για όλα τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής CCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

$$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

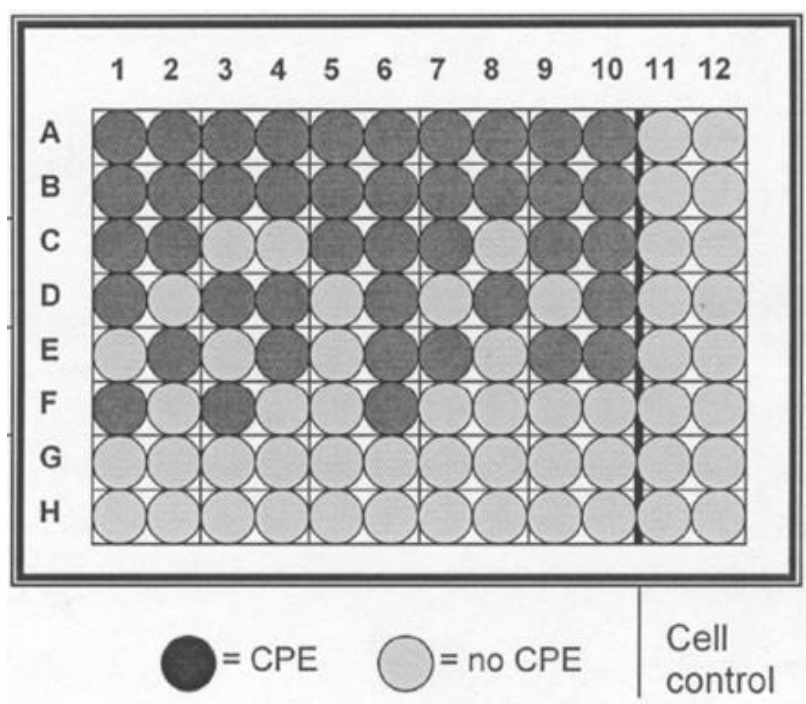
CCID: Cell Culture Infective Dose

L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε ιικό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁸. Στη συνέχεια, 100μl από την αντίστοιχη αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και αυτή τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C. Η παρακολούθησή της πλάκας για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκεσε μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Έπειτα έγινε η μέτρηση του CCID₅₀ με τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω για τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12.



Εικόνα 3.3.1: Η πλάκα μικροτιτλοποίησης για τον υπολογισμό του CCID₅₀. Οριζόντια τοποθετούνται οι σειριακές αραιώσεις με την αραιώση 10⁻¹ να αντιστοιχεί στη γραμμή A και τη 10⁻⁸ στη γραμμή H. Οι δύο τελευταίες στήλες αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης.

3.4 Υπολογισμός του ιικού τίτλου για το CAV13 μέσω Real Time PCR

Ο υπολογισμός του ιικού τίτλου γίνεται, όπως αναφέρθηκε ανωτέρω, με βάση τη μέτρηση του CCID₅₀. Στην περίπτωση των CAV ιών και συγκεκριμένα του στελέχους CAV13 η παραπάνω διαδικασία δεν ήταν δυνατή καθώς το συγκεκριμένο στέλεχος δεν προκαλούσε CPE. Έτσι σχεδιάστηκε μια Real-Time PCR για τον υπολογισμό του ιικού τίτλου του CAV13 με βάση δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων του στελέχους Sabin 1.

Αρχικά δημιουργήθηκαν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του στελέχους Sabin 1 δημιουργώντας δείγματα ιικού τίτλου από 10⁶ έως και 1 CCID₅₀. Τα δείγματα αυτά αφού εκχυλίστηκαν και συντέθηκε το cDNA, υποβλήθηκαν παράλληλα με το υπό μελέτη δείγμα CAV13 σε Real-Time PCR χρησιμοποιώντας το εκκινητικό ζεύγος UG52 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3' / UC53 5'-TTGTCACCATAACCAGCCA-3'.

Δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιείχε: 1X ROX Low (Kapa Biosystems, USA), 1X KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix (Kapa Biosystems, USA), 5pmol από τον κάθε εκκινητή και ddH₂O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστέθηκε σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις παρακάτω συνθήκες:

1 ^{ος} κύκλος	-1 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-3 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 ^{ος} κύκλος	- Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

3.5 Σειριακές Αραιώσεις

Μετά τον υπολογισμό του ιικού τίτλου, ακολούθησαν σειριακές αραιώσεις για την απόκτηση των επιθυμητών συγκεντρώσεων 10⁶ και 1 CCID₅₀ για τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

3.6 Μέτρηση κυττάρων

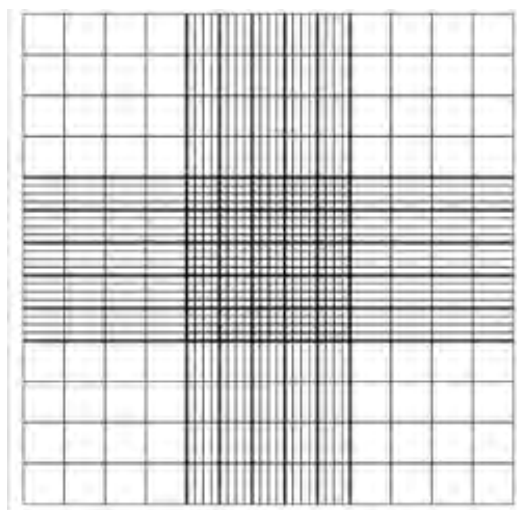
Η μέτρηση του αριθμού των κυττάρων πραγματοποιήθηκε έτσι ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του MOI (Multiplicity of Infection) που θα περιγραφεί αναλυτικά παρακάτω. Η μέτρηση αφορούσε τον αριθμό των Rd κυττάρων που περιέχονταν σε σωλήνες κυτταροκαλλιιεργειών, τους οποίους χρησιμοποιήσαμε αργότερα για να γίνουν οι μολύνσεις. Αρχικά προστέθηκαν 2ml εναιωρήματος κυτταροκαλλιιεργειας σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 2% ορό και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 h για την πλήρη κάλυψη της επιφάνειας από τα Rd κύτταρα. Στη

συνέχεια απομακρύνθηκε το θρεπτικό υλικό και προστέθηκαν 0.5ml διαλύματος θρυψίνης –EDTA εις διπλούν για την αποκόλληση των κυττάρων. Έπειτα, προστέθηκαν 2ml θρεπτικού υλικού D-MEM απουσία ορού με ταυτόχρονη ανάδευση για την διάσπαση τυχόν συσσωμάτων. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν 0.2ml εναιωρήματος κυττάρων και 0.2ml διαλύματος Trypan Blue (0.1% w/v) σε σωλήνα erpendorf (2ml) και αναμείχθηκαν με πιπετάρισμα. Χρησιμοποιώντας πιπέτα Pasteur μεταφέρθηκε αρκετή ποσότητα του μίγματος στην εγκοπή του αιμοκυτταρόμετρου Neubauer, έτσι ώστε να καλύπτεται όλη η επιφάνεια του αιμοκυτταρόμετρου, το οποίο στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο ανάστροφο μικροσκόπιο για την παρατήρηση και καταγραφή των ζωντανών κυττάρων. Λόγω του διαλύματος Trypan Blue τα νεκρά κύτταρα βάφονται μπλε, οπότε μετρήθηκαν μόνο τα λευκά κύτταρα και μόνο όσα βρίσκονταν στις τέσσερις γωνίες του αιμοκυτταρόμετρου. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων ανά ml έγινε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$C = tcn \times df \times 0.25 \times 10^4$$

tcn: ο συνολικός αριθμός των κυττάρων

df: ο συντελεστής αραίωσης του διαλύματος που μελετήθηκε



Εικόνα 3.6.1: Αιμοκυτταρόμετρο Neubauer. Οι τέσσερις γωνίες είναι οι θέσεις στις οποίες γίνεται η καταμέτρηση των κυττάρων. Τα κύτταρα που βρίσκονταν σε όλες τις υπόλοιπες θέσεις, καθώς επίσης και πάνω στις γραμμές δεν μετρούνται.

3.7 Υπολογισμός MOI

Το MOI ή αλλιώς Multiplicity Of Infection είναι η αναλογία μεταξύ του αριθμού των ιών σε μία μόλυνση και των κυττάρων-ξενιστών και υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\text{MOI} = \frac{\text{CCID}_{50}}{\text{Αριθμός Κυττάρων}}$$

3.8 Μόλυνση κυττάρων και απομονώσεις σε συγκεκριμένες ώρες

Σωλήνες με κύτταρα Rd σε θρεπτικό μέσο MEM-D χωρίς προσθήκη FBS μολύνθηκαν με τα πρότυπα στελέχη Sabin 1, Echo 12 και CAV 13 σε συγκεντρώσεις 10^6 και 1 CCID₅₀. Έγινε επώαση για 1 ώρα στους 37°C σε συσκευή κυκλικής ανάδευσης και στη συνέχεια ακολούθησε πλύση για την απομάκρυνση των ιών που δεν είχαν εισέλθει στα κύτταρα. Στη συνέχεια, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 και 48h μετά τη μόλυνση έγινε απομόνωση των κυττάρων για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν, με σκοπό την μελέτη της κινητικής της αντιγραφής του ιού. Ταυτόχρονα με τις απομονώσεις πραγματοποιήθηκε και παρακολούθηση των κυτταροκαλλιιεργειών για τυχόν ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Τέλος, ακολούθησε κατάψυξη των απομονώσεων στους -20° C για να διατηρηθούν μέχρι το επόμενο βήμα.

3.9 Εκχύλιση του ιικού RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA), έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο RNeasy mini kit της QIAGEN. Αρχικά, σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 700μl υλικό κυτταροκαλλιιεργειας MEM-D χωρίς προσθήκη FBS και ακολούθησε ψύξη-απόψυξη τρεις φορές ώστε να σπάσουν τα κύτταρα. Έπειτα, έγινε φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 5 λεπτά στα 8.000g και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Ακολούθως, προστέθηκαν 350μl RLT και πραγματοποιήθηκε vortex και ομογενοποίηση για 1min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350μl 70% αιθανόλης και ο συνολικός όγκος των 700ml τοποθετήθηκε σε μία στήλη όπου και ακολούθησε

φυγοκέντρωση για 15 δευτερόλεπτα στα 8.000g. Μετά την αφαίρεση του υλικού που προέκυψε από την φυγοκέντρωση, προστέθηκαν 700 ml RWI και φυγοκεντρήθηκαν για 15 δευτερόλεπτα στα 8.000g. Μετά την αφαίρεση του υλικού, προστέθηκαν 500 ml RPE δύο φορές και φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στα 8.000g. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο tube 1.5 ml και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50μl RNase free water. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

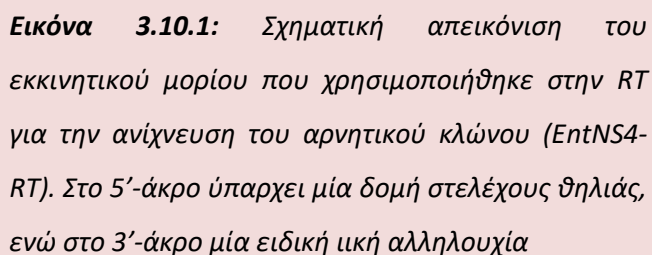
3.10 Σχεδιασμός ειδικών εκκινητικών μορίων

Για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας των εντεροϊών μέσω ανίχνευσης του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου τους, σχεδιάστηκαν εκκινητές τόσο για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής (RT), όσο και για την αντίδραση της Real time PCR. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τρία ειδικά εκκινητικά μόρια των οποίων η αλληλουχία, η θέση πρόσδεσής τους στο ιικό RNA αλλά και η πολικότητά τους, απεικονίζονται στον πίνακα 3.10.1.

Primer	Αλληλουχία	Θέση	Πολικότητα
EntNS4-RT	ACA GGG TTC CCC GCC GTC CCT GAA TGC GGC	451-469	Sense
EntNS2F	CGT TCC CCG CCG TCC CTG	-	Sense
UC53-Flap	AAT AAA TCA TAA TTG TCA CCA TAA CCA GCC A	588-606	Anti-sense
UG52-Flap	AAT AAA TCA TAA CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG	168-188	Sense

Πίνακας 3.10.1 : Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, πληροφορίες για την αλληλουχία τους, τη θέση πρόσδεσής τους, και τη πολικότητά τους

Για την αντίδραση της RT, σχεδιάστηκε ο EntNS4-RT που είναι ένας DNA-ολιγομερής εκκινητής με μία χαρακτηριστική δομή stem-loop (φουρκέτας) στο 5'-άκρο και μονόκλωνη μορφή στο 3' άκρο. Ως προς την αλληλουχία του, το 3' άκρο του εκκινητή είναι συμπληρωματικό σε συντηρημένη περιοχή της 5'-UTR του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου των εντεροϊών, ενώ το 5' άκρο του εκκινητή στην περιοχή της θηλιάς φέρει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία δεν εντοπίζεται στο γονιδίωμα των εντεροϊών και δημιουργεί μια θέση υβριδισμού του



εκκινητής EntNS2F
σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο
ώστε να συνδέεται απόλυτα
πάνω σε ένα συγκεκριμένο
σημείο του EntNS4-RT (πάνω
στη δομή stem-loop), καθώς
παρουσιάζουν την ίδια
νουκλεοτιδική αλληλουχία,
όπως φαίνεται και στον
πίνακα 3.10.1. Ο εκκινητής
UC53-flap είχε σχεδιαστεί σε
προηγούμενες μελέτες, με
σκοπό την ανίχνευση όλων
των εντεροϊών. Ο εκκινητής

UC53-flap χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον εκκινητή UG52-flap για τον έλεγχο ύπαρξης εντεροίου (ανίχνευση θετικού κλώνου) και περιέχει μία 5' αλληλουχία flap, αποτελούμενη κυρίως από TA επαναλήψεις.

3.11 Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει Real Time PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει. Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20 μl. Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε

αντίδραση 1μl specific primer EntNS4-RT (Macrogen, South Korea) (50pmol) για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε, 1μl dNTPs (2mM) και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl από το ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 4μl first strand Buffer (5X) , 2μl DTT (0,01M), 0,5μl RNase out (20U), 0,5μl Superscript II (100U) (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) και 1μl ddH₂O. Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες: 50 λεπτά στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

3.12 Real Time PCR

Η Real-Time PCR επιτρέπει την ποσοτικοποίηση του αρχικού υπό μελέτη δείγματος. Η ποσοτικοποίηση αυτή είναι δυνατή χρησιμοποιώντας μια χρωστική, στην παρούσα διατριβή την SYBR Green, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένεται σε δίκλωνο DNA φθορίζοντας σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (520nm). Η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο οδηγεί στην κατασκευή ενός σχεδιαγράμματος (Amplification Plot), μέσω του οποίου υπολογίζεται το Ct (Cycle threshold), ο κύκλος δηλαδή στον οποίο υπερβαίνει την ουδό (threshold) η τιμή φθορισμού. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη αρχικών αντιγράφων σχετιζόμενα με την τιμή Ct, μέσω της οποίας υπολογίζεται η ποσότητα των αρχικών αντιγράφων του υπό μελέτη δείγματος. Για την μελέτη της εξειδίκευσης της μεθόδου χρησιμοποιείται το Melting Curve Analysis (ή Dissociation Curve) στο οποίο παρουσιάζεται ένα σχεδιάγραμμα μεταβολής φθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία. Τμήματα ίσου μήκους με ίδια αλληλουχία εμφανίζουν μεταβολή στο φθορισμό στην ίδια θερμοκρασία, λόγω του T_m, ενώ η εμφάνιση μεταβολής φθορισμού σε διαφορετικές θερμοκρασίες υποδηλώνει την ύπαρξη παραπροϊόντων.

Για την ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν και για τις δύο συγκεντρώσεις (10^6 και 1 CCID_{50}) για όλες τις απομονώσεις, εφαρμόστηκε Real Time PCR χρησιμοποιώντας την τεχνολογία SYBR Green. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργήθηκε ουσιαστικά μία κινητική της αντιγραφικής ενεργότητας των εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν ανάλογα με τις ώρες ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου. Πιο συγκεκριμένα δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιείχε 2X SYBR Select qPCR Master Mix (Thermo Fischer SCIENTIF), 5pmol από τον κάθε εκκινητή και ddH₂O μέχρι τα 17μl. Το μίγμα αυτό προστέθηκε σε ειδικά μικροσωληνάρια για Real-Time PCR των 0.2ml και προστέθηκαν 3μl από κάθε δείγμα. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον ειδικό για Real-Time PCR θερμοκυκλοποιητή Mx3005p (STRATAGENE, USA) στις συνθήκες:

1 ^{ος} κύκλος	-2 min στους 50° C για την ενεργοποίηση UDG -2 min στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλοι	-15 sec στους 95°C για την αποδιάταξη του DNA -1 min στους 60°C για τον υβριδισμό των εκκινητών και την επιμήκυνση των κλώνων
1 ^{ος} κύκλος	- Ramping 55°C-95°C για τη δημιουργία του Melting Curve Analysis

3.13 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων που προέκυψαν έπειτα από τη Real Time PCR, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2%, διότι το προϊόν της αντίδρασης είναι στις 155bp. Αναλυτικά, αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης 0,8gr (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 40ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα

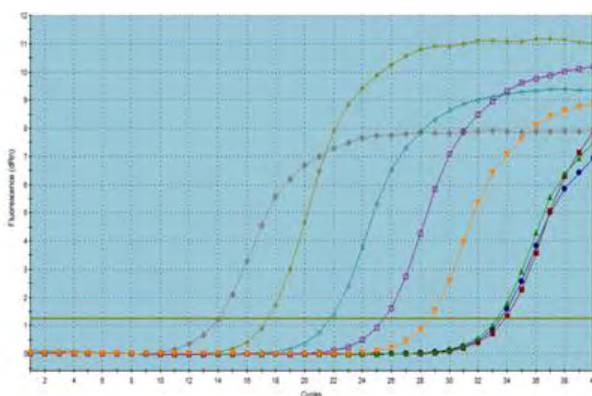
έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr2) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10µl από το προϊόν της Real Time PCR αναμιγνύονται με 2µl 10X Gel Loading Buffer (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40%w/v και TBE) και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στο πήκτωμα ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για περίπου 30 min. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε χρησιμοποιώντας ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

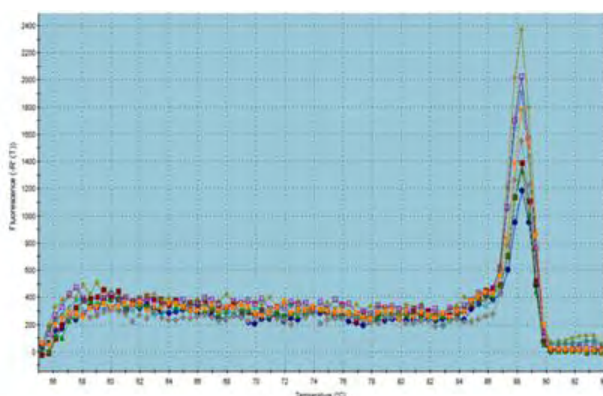
4. Αποτελέσματα

4.1 Αποτελέσματα Real Time PCR για τον προσδιορισμό του ιικού τίτλου του CAV13

Λόγω της ιδιαιτερότητας του πρότυπου στελέχους CAV13 που δεν εμφάνιζε CPE στις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, δεν ήταν δυνατή η μέτρηση του ιικού τίτλου του στελέχους μέσω κυτταροκαλλιιεργειών και υπολογισμού του CCID₅₀, όπως συνέβη με τα υπόλοιπα στελέχη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η Real-Time PCR και το εκκινητικό ζεύγος UG52 / UC53, όπου το αγνώστου ιικού τίτλου στέλεχος CAV13 συγκρίθηκε με γνωστές συγκεντρώσεις του στελέχους Sabin 1. Σειριακές αραιώσεις του στελέχους Sabin 1 με ιικό τίτλο 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10 και 1 CCID₅₀ παρουσίασαν με βάση το Amplification Plot και το Dissociation Curve μια καλή γραμμικότητα και εξειδίκευση αντίστοιχα. Η συγκέντρωση του 1 CCID₅₀ χρησιμοποιήθηκε εις τριπλούν, καθώς προσεγγίζει το όριο ανίχνευσης της τεχνικής.



Εικόνα 4.1.1: Amplification Plot: Αποτελέσματα της Real-Time PCR για τις γνωστές συγκεντρώσεις του στελέχους Sabin1.

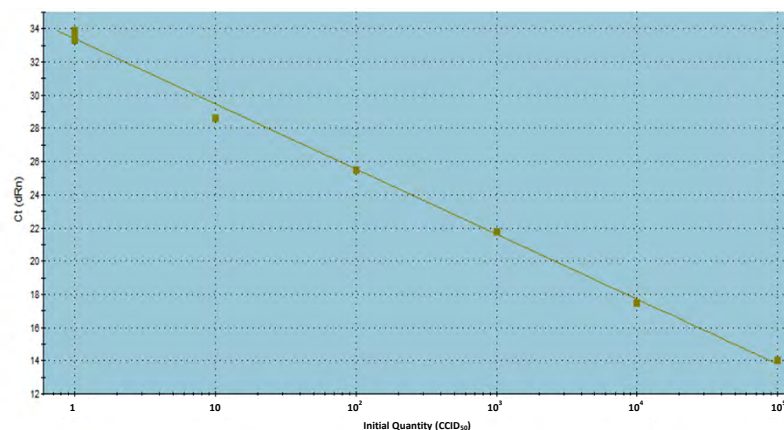


ΧΡΩΜΑ	ΔΕΙΓΜΑ
Γκρι	Sabin 1 [10 ⁵]
Χρυσό	Sabin 1 [10 ⁴]
Γαλάζιο	Sabin 1 [10 ³]
Μωβ	Sabin 1 [10 ²]
Κίτρινο	Sabin 1 [1]
Πράσινο	Sabin 1 [1]
Κόκκινο	Sabin 1 [1]
Μπλε	Sabin 1 [1]

Πίνακας 4.1.1: Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις συγκεντρώσεις του Sabin 1.

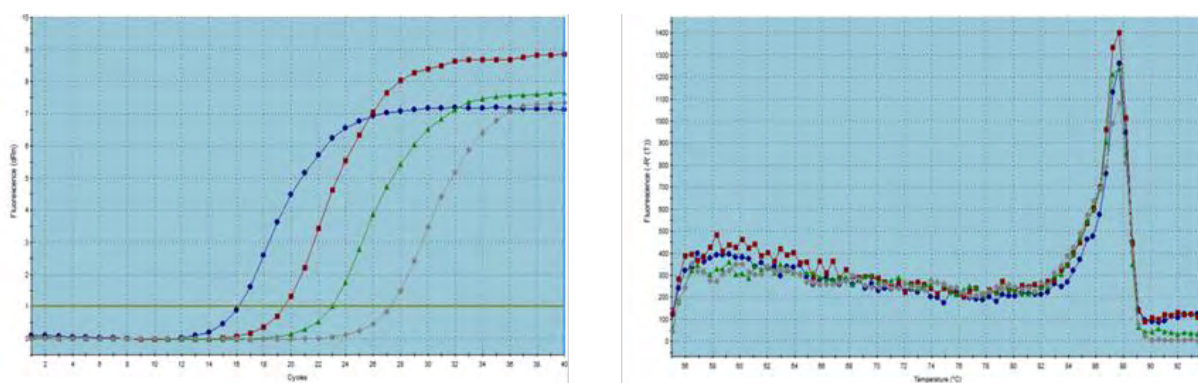
Εικόνα 4.1.2: Dissociation Curve της αντίδρασης.

Έτσι με βάση τα αποτελέσματα της παραπάνω Real-Time κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη Αρχικής Συγκέντρωσης – Ct.



Εικόνα 4.1.3: Πρότυπη καμπύλη δειγμάτων Sabin 1 γνωστών αρχικών συγκεντρώσεων.

Παράλληλα με τις γνωστές συγκεντρώσεις του ιού υποβλήθηκαν στην ίδια Real-Time PCR σειριακές αραιώσεις του στελέχους CAV13. Το Amplification Plot καθώς και το Dissociation Curve των δειγμάτων αυτών παρουσιάζονται παρακάτω:



Εικόνα 4.1.4: Αποτελέσματα της Real-Time PCR για τις άγνωστες συγκεντρώσεις του στελέχους CAV13. Αριστερά παρουσιάζεται το Amplification Plot και δεξιά το Dissociation Curve.

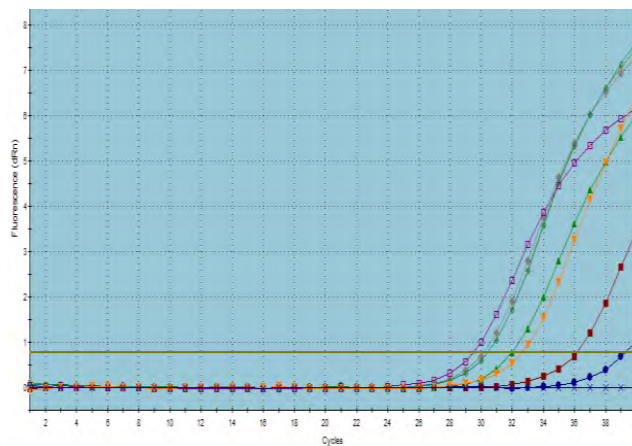
Από τα παραπάνω αποτελέσματα και τις τιμές Ct που αντιστοιχούσαν σε κάθε αραίωση του δείγματος CAV13 υπολογίστηκε η συγκέντρωση του αρχικού δείγματος με βάση την πρότυπη καμπύλη της εικόνας 4.1.3 σε $10^{6,7}$ CCID₅₀.

4.2 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Sabin 1 [10⁶] CCID₅₀

Για το στέλεχος Sabin 1 με ιικό τίτλο 10^6 CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.2.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι CPE άρχισε να εμφανίζεται 10 ώρες μετά τη μόλυνση και ότι 48 ώρες μετά τη μόλυνση είχαμε σχεδόν πλήρη καταστροφή των κυττάρων. Το γεγονός αυτό, αιτιολογεί το αποτέλεσμα ότι η συγκέντρωση του αρνητικού κλώνου στη Real Time PCR (Εικόνα 4.2.1) μειώνεται αισθητά μέσα στα κύτταρα στις 48h, διότι έχει ξεκινήσει λύση των κυττάρων. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται από τις 4h και έπειτα (Εικόνα 4.2.1), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 4 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίστηκε 12.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
Sabin 1 [10 ⁶]	απομον.							
Sabin 1 [10 ⁶]	-	απομον.						
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	απομον.					
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	-	απομον.				
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	-	-	απομον.			
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	-	-	1 ⁺	απομον.		
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	-	-	1 ⁺	1-2 ⁺	απομον.	
Sabin 1 [10 ⁶]	-	-	-	-	1 ⁺	1-2 ⁺	4 ⁺	απομον.
(-)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

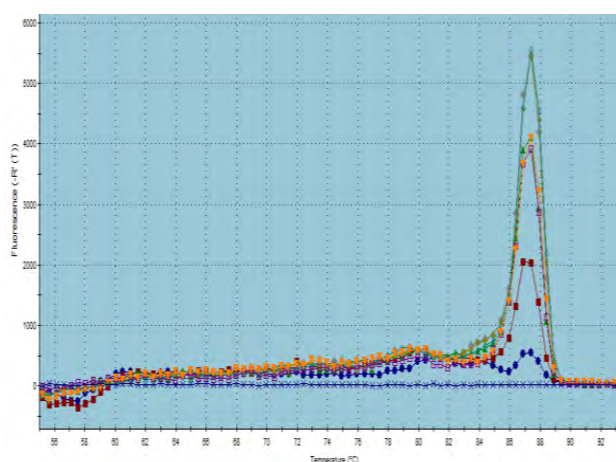
Πίνακας 4.2.1: Οι απομονώσεις του ιού και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



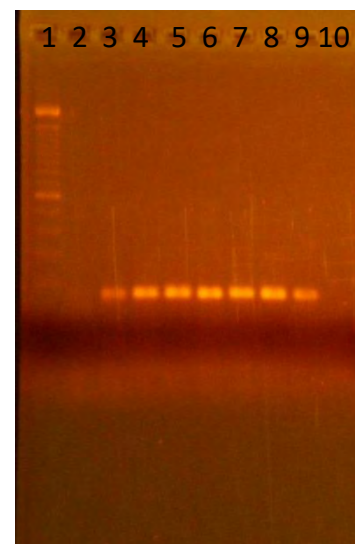
Εικόνα 4.2.1: Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10^6]. Οι 8, 10 και 12h ανιχνεύονται σχεδόν ταυτόχρονα, γεγονός που υποδηλώνει πως η αντιγραφή πραγματοποιείται με τον

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	Sabin 1 [10^6] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [10^6] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [10^6] 6h
Γκρι	Sabin 1 [10^6] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [10^6] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [10^6] 12h
Φούξια	Sabin 1 [10^6] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [10^6] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4.2.2: Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του Sabin 1 [10^6].



Εικόνα 4.2.2: Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 [10^6] που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T_m 87,4° C.



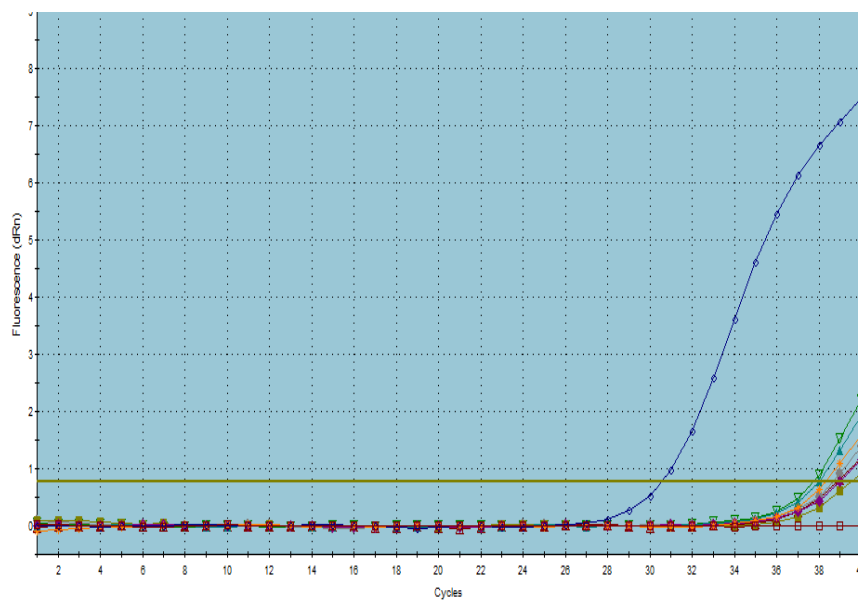
Εικόνα 4.2.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR (155 bp). 1: Ladder 100bp, 2: Sabin 1 [10^6] 2h, 3:4h, 4:6h, 5:8h, 6:10h, 7:12h, 8:24h, 9:48h, 10:ddH₂O

4.3 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Sabin 1 [1] CCID₅₀

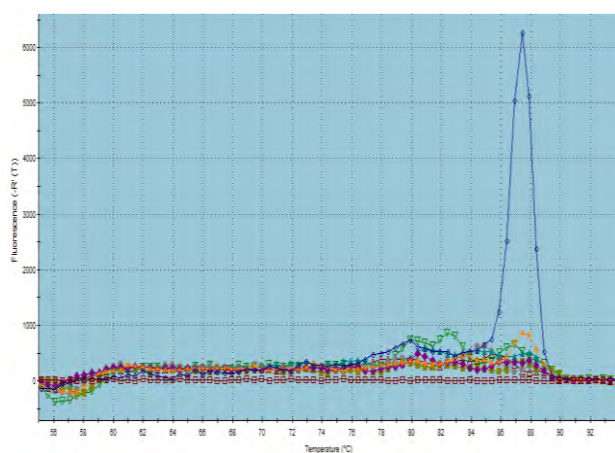
Για το στέλεχος Sabin 1 με ιικό τίτλο 1 CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.3.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι δεν εμφανίστηκε CPE σε καμία ώρα από εκείνες που πραγματοποιήθηκαν οι απομονώσεις. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται μόνο 48h μετά τη μόλυνση των κυττάρων από τον εντεροϊό (Εικόνα 4.3.1), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 48 ώρες μετά τη μόλυνση. Δηλαδή, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση 10⁶, παρατηρείται μεγάλη αύξηση του χρόνου που χρειάζεται ο ιός για να μπορέσει τελικά να αντιγραφεί. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12x10⁻⁶.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
Sabin 1 [1]	απομον.							
Sabin 1 [1]	-	απομον.						
Sabin 1 [1]	-	-	απομον.					
Sabin 1 [1]	-	-	-	απομον.				
Sabin 1 [1]	-	-	-	-	απομον.			
Sabin 1 [1]	-	-	-	-	-	απομον.		
Sabin 1 [1]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
Sabin 1 [1]	-	-	-	-	-	-	-	απομον.
(-)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

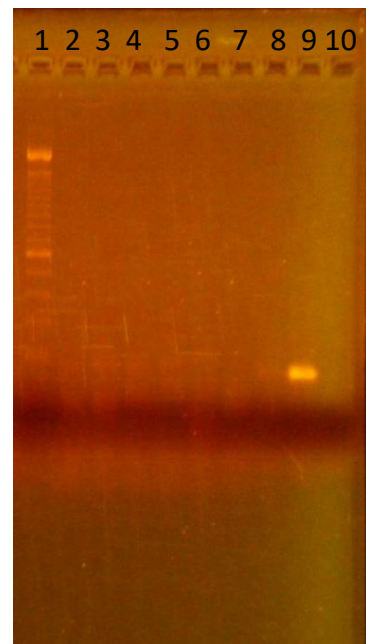
Πίνακας 4.3.1: Οι απομονώσεις του ιού και η παρατήρηση για CPE τις αντίστοιχες ώρες.



Εικόνα 4.3.1: Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους *Sabin 1* [1]. Παρατηρούμε πώς μόνο στις 48h (Μπλε χρώμα) έχουμε ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, άρα και αντιγραφική ενεργότητα του ιού.



Εικόνα 4.3.2: Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους *Sabin 1* [1] που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T_m 87,4° C.



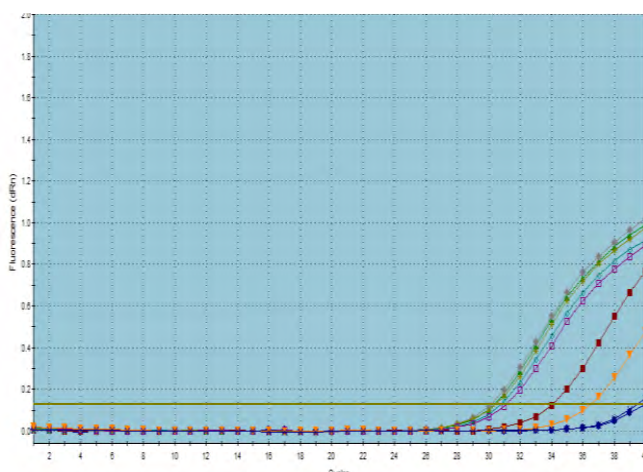
Εικόνα 4.3.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR (155 bp). 1: Ladder 100bp, 2: *Sabin 1* [1] 2h, 3:4h, 4:6h, 5:8h, 6:10h, 7:12h, 8:24h, 9:48h, 10:ddH₂O.

4.4 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Echo 12 [10⁶] CCID₅₀

Για το στέλεχος E12 με ιικό τίτλο 10⁶ CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.4.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι CPE άρχισε να εμφανίζεται 8 ώρες μετά τη μόλυνση και ότι 24 ώρες μετά τη μόλυνση είχαμε σχεδόν πλήρη καταστροφή των κυττάρων εξαιτίας του ιού. Το γεγονός αυτό, αιτιολογεί το αποτέλεσμα ότι η συγκέντρωση του αρνητικού κλώνου στη Real Time PCR (Εικόνα 4.4.1) μειώνεται αισθητά μέσα στα κύτταρα στις 24 και 48h, διότι έχει ξεκινήσει λύση των κυττάρων. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται από τις 4h και έπειτα (Εικόνα 4.4.1), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 4 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
E 12 [10 ⁶]	απομον.							
E 12 [10 ⁶]	-	απομον.						
E 12 [10 ⁶]	-	-	απομον.					
E 12 [10 ⁶]	-	-	-	απομον.				
E 12 [10 ⁶]	-	-	-	1 ⁺	απομον.			
E 12 [10 ⁶]	-	-	-	1 ⁺	2 ⁺	απομον.		
E 12 [10 ⁶]	-	-	-	1 ⁺	2 ⁺	2-3 ⁺	απομον.	
E 12 [10 ⁶]	-	-	-	1 ⁺	2 ⁺	2-3 ⁺	4 ⁺	απομον.
(-)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

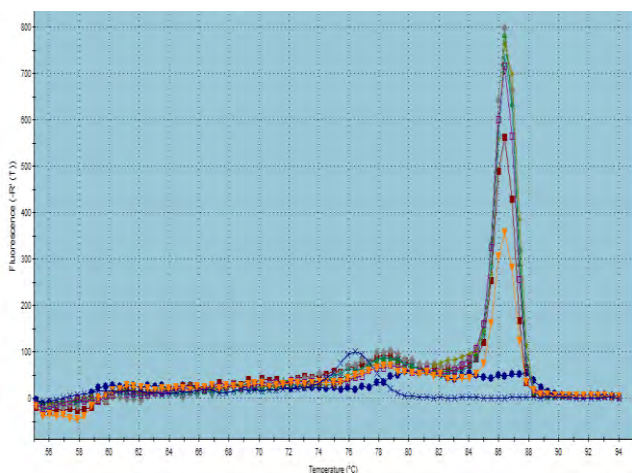
Πίνακας 4.4.1: Οι απομονώσεις του ιού και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



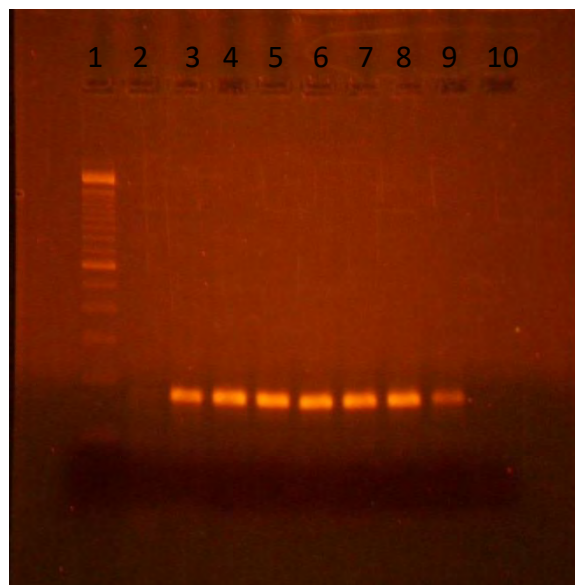
Εικόνα 4.4.1: Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [10^6]. Οι 6, 8 και 10h ανιχνεύονται σχεδόν ταυτόχρονα, γεγονός που υποδηλώνει πως η αντιγραφή πραγματοποιείται με τον ίδιο ρυθμό σε αυτές τις ώρες.

Χρώμα	cDNA
Έντονο μπλε	E12 [10^6] 2h
Κόκκινο	E12 [10^6] 4h
Πράσινο	E12 [10^6] 6h
Γκρι	E12 [10^6] 8h
Χρυσό	E12 [10^6] 10h
Γαλάζιο	E12 [10^6] 12h
Φούξια	E12 [10^6] 24h
Κίτρινο	E12 [10^6] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4.4.2: Αντιστοίχιση των χρωμάτων στο Amplification plot με τις απομονώσεις του E12 [10^6].



Εικόνα 4.2.2: Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [10^6] που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T_m 87,4° C. Η μικρότερη κορυφή απεικονίζει τα διμερή των εκκινητών.



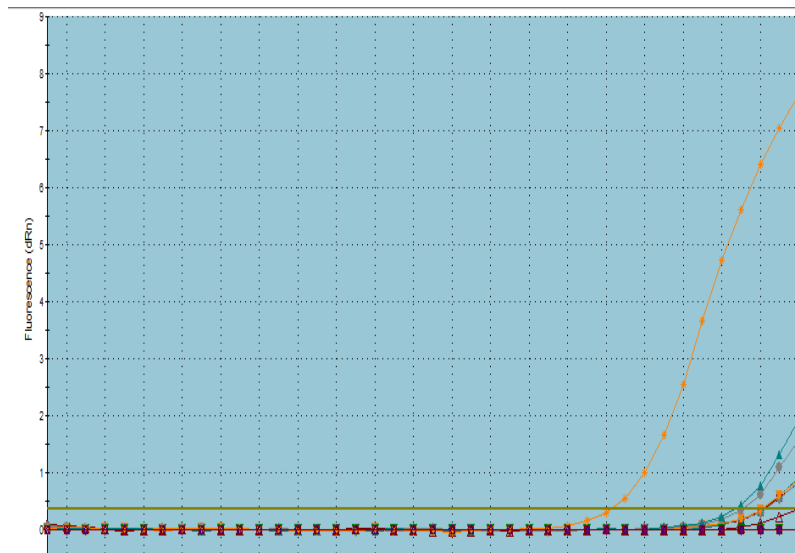
Εικόνα 4.4.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR (155 bp). 1: Ladder 100bp, 2: E12 [10^6] 2h, 3:4h, 4:6h, 5:8h, 6:10h, 7:12h, 8:24h, 9:48h, 10:ddH₂O.

4.5 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το Echo 12 [1] CCID₅₀

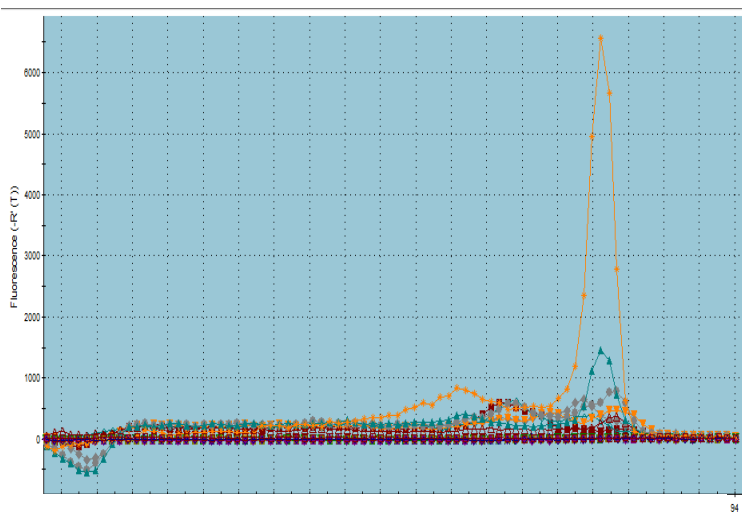
Για το στέλεχος Echo 12 με ιικό τίτλο 1 CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.5.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι εμφανίστηκε CPE 1⁺ στις 48h ώρες μετά τη μόλυνση. Επίσης είναι αξιοσημείωτο ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται οριακά στις 24h και κανονικά πλέον στις 48h μετά τη μόλυνση των κυττάρων από τον εντεροϊό (Εικόνα 4.5.1), που υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Δηλαδή, σε σύγκριση με τη συγκέντρωση 10⁶, παρατηρείται μεγάλη αύξηση του χρόνου που χρειάζεται ο ιός για να μπορέσει τελικά να αντιγραφεί, όπως ακριβώς συμβαίνει και με το στέλεχος Sabin 1 στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 12x10⁻⁶.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
E 12 [1]	απομον.							
E 12 [1]	-	απομον.						
E 12 [1]	-	-	απομον.					
E 12 [1]	-	-	-	απομον.				
E 12 [1]	-	-	-	-	απομον.			
E 12 [1]	-	-	-	-	-	απομον.		
E 12 [1]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
E 12 [1]	-	-	-	-	-	-	-	απομον. 1 ⁺
(-)	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ

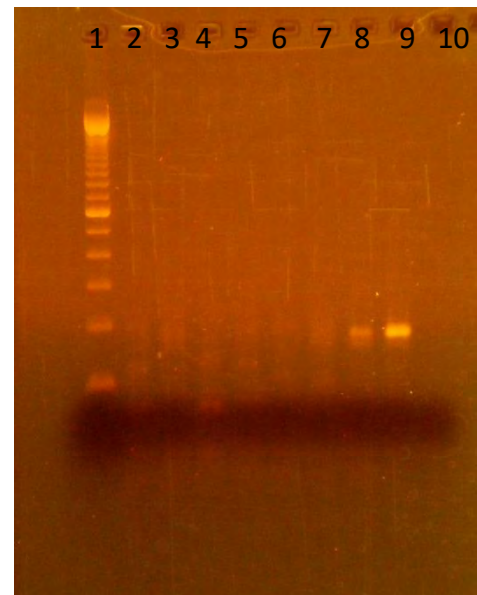
Πίνακας 4.5.1: Οι απομονώσεις του ιού και η εμφάνιση CPE τις αντίστοιχες ώρες.



Εικόνα 4.5.1: Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [1]. Παρατηρούμε πώς οριακά στις 24h (Γαλάζιο) και κανονικά πλέον στις 48h (Κίτρινο) έχουμε ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, άρα και αντιγραφική ενεργότητα του ιού.



Εικόνα 4.5.2: Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους E12 [1] που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T_m 87,4° C στις 24 (Γαλάζιο) και 48h (Κίτρινο).



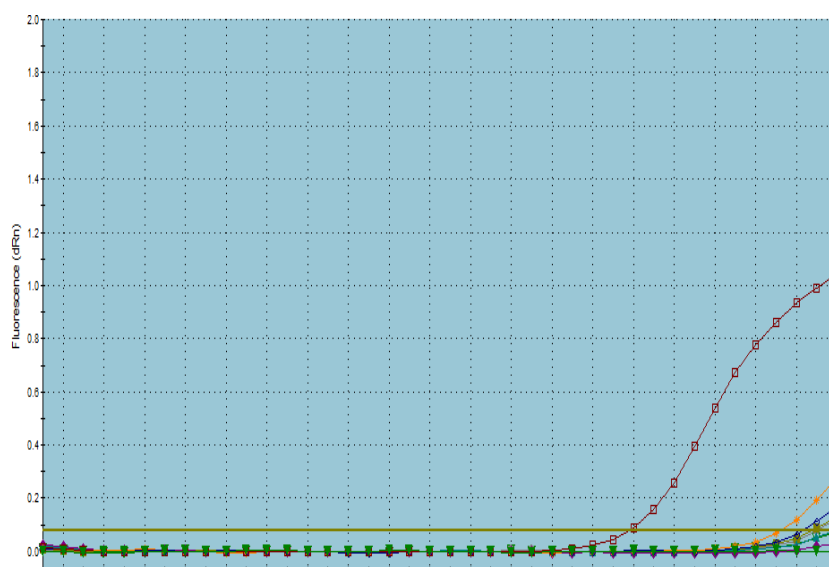
Εικόνα 4.5.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR (155 bp). 1: Ladder 100bp, 2:E12 [1] 2h, 3:4h, 4:6h, 5:8h, 6:10h, 7:12h, 8:24h, 9:48h, 10:ddH₂O.

4.6 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το CAV13 [10⁶] CCID₅₀

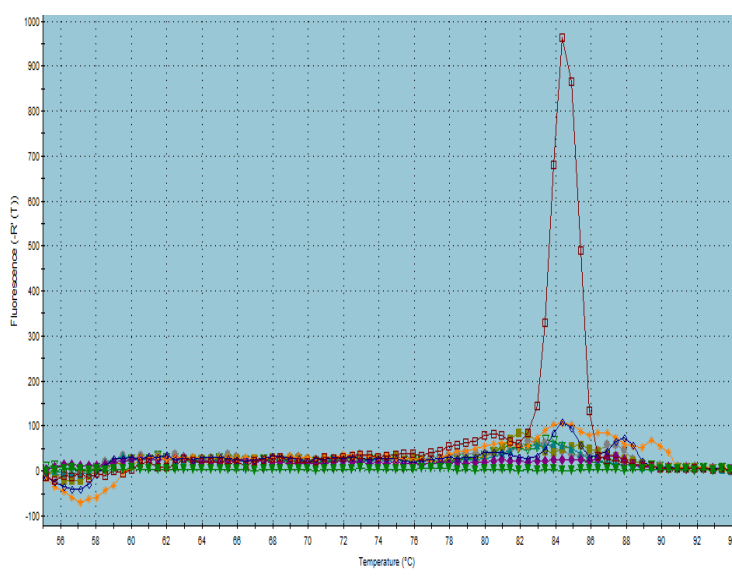
Για το στέλεχος CAV13 με ιικό τίτλο 10⁶ CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.6.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι CPE δεν εμφανίστηκε σε καμία από τις ώρες απομόνωσης, γεγονός το οποίο οφείλεται στη μη ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να προκαλεί κυτταρικές αλλοιώσεις σε κύτταρα Rd. Τα αποτελέσματα της Real Time PCR (Εικόνα 4.6.1) έδειξαν επίσης κάτι πολύ ενδιαφέρον όσον αφορά την αντιγραφική ενεργότητα του συγκεκριμένου στελέχους στα κύτταρα Rd που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιείται μόνο στις 48h (Εικόνα 4.6.1). Αυτό, υποδηλώνει ότι η έναρξη της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξεκινάει 48 ώρες μετά τη μόλυνση των κυττάρων. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 15.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
CAV13 [10 ⁶]	απομον.							
CAV13 [10 ⁶]	-	απομον.						
CAV13 [10 ⁶]	-	-	απομον.					
CAV13 [10 ⁶]	-	-	-	απομον.				
CAV13 [10 ⁶]	-	-	-	-	απομον.			
CAV13 [10 ⁶]	-	-	-	-	-	απομον.		
CAV13 [10 ⁶]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
CAV13 [10 ⁶]	-	-	-	-	-	-	-	απομον.
(-)	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ	ΟΚ

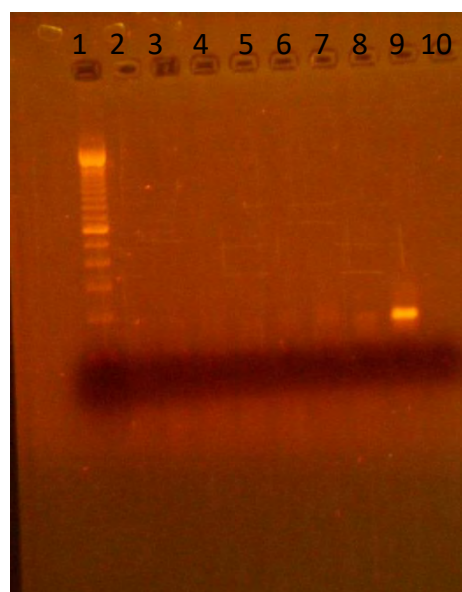
Πίνακας 4.6.1: Οι απομονώσεις του ιού και η παρατήρηση για CPE τις αντίστοιχες ώρες.



Εικόνα 4.6.1: Κινητική μελέτη ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου του στελέχους CAV13 [10^6]. Παρατηρούμε πώς μόνο στις 48h (Κόκκινο χρώμα) έχουμε ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, άρα και αντιγραφική ενεργότητα του ιού.



Εικόνα 4.6.2: Dissociation Curve του αρνητικού κλώνου του στελέχους CAV13 [10^6], που δείχνει την ειδικότητα του προϊόντος, T_m 87,4° C.



Εικόνα 4.6.3: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR (155 bp). 1: Ladder 100bp, 2: CAV13 [10^6] 2h, 3:4h, 4:6h, 5:8h, 6:10h, 7:12h, 8:24h, 9:48h, 10:ddH₂O.

4.7 Αποτελέσματα εμφάνισης CPE και Real Time PCR για το CAV13 [1] CCID₅₀

Για το στέλεχος CAV13 με ιικό τίτλο 1 CCID₅₀ κατά τη διάρκεια απομονώσεων έγινε ταυτόχρονη παρατήρηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης CPE (Πίνακας 4.7.1). Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι όπως και για τη συγκέντρωση 10⁶, CPE δεν εμφανίστηκε σε καμία από τις ώρες απομόνωσης, γεγονός το οποίο οφείλεται στη μη ικανότητα του συγκεκριμένου στελέχους να προκαλεί κυτταρικές αλλοιώσεις σε κύτταρα Rd. Τα αποτελέσματα της Real Time PCR αποδεικνύουν πως η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου δεν ήταν δυνατή σε καμία από τις ώρες απομόνωσης, πιθανόν λόγω του γεγονότος ότι στη συγκέντρωση αυτή ο ιός δεν προλαβαίνει να εισέλθει στα κύτταρα το χρονικό διάστημα πριν την πλύση. Να σημειωθεί ότι το MOI υπολογίσθηκε 15x10⁻⁶.

Δείγμα	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
CAV13 [1]	απομον.							
CAV13 [1]	-	απομον.						
CAV13 [1]	-	-	απομον.					
CAV13 [1]	-	-	-	απομον.				
CAV13 [1]	-	-	-	-	απομον.			
CAV13 [1]	-	-	-	-	-	απομον.		
CAV13 [1]	-	-	-	-	-	-	απομον.	
CAV13 [1]	-	-	-	-	-	-	-	απομον.
(-)	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK

Πίνακας 4.7.1: Οι απομονώσεις του ιού και η παρατήρηση για CPE τις αντίστοιχες ώρες.

5. Συζήτηση

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος Enterovirus. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί, ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως [66]. Σχετίζονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματικές μολύνσεις έως και σοβαρές ασθένειες. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν: το κοινό κρυολόγημα, η ασθένεια των χεριών, των ποδιών και του στόματος (HFMD), οξεία χαλαρή παράλυση, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα [67,68]. Η μετάδοση των εντεροϊών πραγματοποιείται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων [69]. Η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα με μολυσμένα κόπρανα, μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού [69,70]. Ένας μεγάλος αριθμός εντεροϊών έχει ανιχνευθεί τόσο σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα καθώς και σε διάφορα τρόφιμα [71,72,73].

Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των δειγμάτων για τυχόν ύπαρξη διαφόρων στελεχών εντεροϊών, αλλά και ο έλεγχος της αντιγραφικής ενεργότητας τους, καθώς η ανίχνευση αποκλειστικά του γονιδιώματός τους δεν είναι αρκετή για να κατανοήσουμε πιθανές δυσμενείς επιπτώσεις που μπορούν να προκληθούν.

Κατά τον κύκλο ζωής ενός εντεροϊού, αυτό που τον καθιστά αντιγραφικά ενεργό και επομένως ικανό να μολύνει το κύτταρο ξενιστή είναι η ύπαρξη του κλώνου αρνητικής πολικότητας [74].

Ένας συνήθης τρόπος για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας στους εντεροϊούς είναι μέσω ανάπτυξής τους σε κυτταροκαλλιέργειες και παρακολούθηση για κυτταροπαθογόνο δράση ή αλλιώς CPE. Παρά το γεγονός όμως ότι μπορεί να δώσει μία καλή ένδειξη για το πώς ένας εντεροϊός μπορεί να ολοκληρώσει τον

κύκλο ζωής του μέσα στο κύτταρο (μέσω της διαδικασίας λύσης και την εμφάνιση κυτταρικών αλλοιώσεων), δεν παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα αλλά και ευαισθησία. Μειονέκτημα επίσης της παρούσας προσέγγισης, αποτελεί ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία. Το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζει όμως, είναι πως ορισμένα στελέχη εντεροϊών δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε υπάρχουσες διαθέσιμες κυτταρικές σειρές, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει διάκριση για το αν τελικά ο ιός είναι ενεργός αντιγραφικά ή όχι. Για αυτό πλέον, η ανάπτυξη μοριακών τεχνικών τείνει να αντικαταστήσει τον παραδοσιακό τρόπο χρήσης κυτταροκαλλιεργειών και έχει οδηγήσει στην γρήγορη και ειδική ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας [75].

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μία ειδική Stem Loop Reverse Transcription Real Time PCR για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) των εντεροϊών. Πιο συγκεκριμένα έγινε χρήση τριών πρότυπων στελεχών εντεροϊών Sabin 1 (εντεροϊός ομάδας C), Echo 12 (εντεροϊός ομάδας B) που προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις και CAV13 (εντεροϊός ομάδας C) που δεν προκαλεί κυτταρικές αλλοιώσεις στα κύτταρα Rd που χρησιμοποιήθηκαν. Τα τρία αυτά στελέχη επιλέχθηκαν γιατί αντιπροσωπεύουν το καθένα μία διαφορετική κατηγορία εντεροϊών, με σκοπό να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Εξαιτίας του γεγονότος όμως, ότι ο ειδικός εκκινητής της RT που χρησιμοποιείται στην παρούσα τεχνική στοχεύει σε τμήμα της 5'-UTR, η οποία είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή μεταξύ όλων των εντεροϊών, την καθιστά κατάλληλη για την ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας των περισσότερων ιών που ανήκουν στο γένος των εντεροϊών.

Στόχος ήταν να δημιουργηθεί μια κινητική μελέτη για την αντιγραφική ενεργότητα των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν μέσω ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου, ώστε έτσι να γνωρίζουμε για μετέπειτα μελέτες το χρόνο έναρξης αλλά και την πορεία της αντιγραφής μέσα στα κύτταρα ξενιστές. Πιο αναλυτικά, σχεδιάστηκαν δύο ειδικοί εκκινητές για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας. Ο ένας EntNS4-RT, χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT) και φέρει τρεις διακριτές περιοχές. Μία ειδική ιική

αλληλουχία στο 3' άκρο, μία stem-loop δομή κοντά στο 5' άκρο και μια χαρακτηριστική μη-ικκή αλληλουχία στη θηλιά του 5' άκρου. Ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε σε προηγούμενες μελέτες που έδειξαν τη σημαντική αύξηση της ειδικότητας και ευαισθησίας λόγω θερμοδυναμικής σταθερότητας με τη χρήση stem-loop εκκινητών σε σχέση με τους γραμμικούς [76,77,78].

Επιπλέον, σχεδιάστηκε ένας δεύτερος εκκινητής (EntNS2F) που χρησιμοποιήθηκε κατά την επακόλουθη διαδικασία της Real Time PCR και διέθετε την ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία με την αλληλουχία της θηλιάς του 5' άκρου του stem-loop εκκινητή της RT. Αυτός ο σχεδιασμός επέτρεψε τον υβριδισμό του ενός εκ των δύο εκκινητών της Real Time PCR στον εκκινητή της RT και όχι στο γονιδίωμα του ιού, καθιστώντας την διαδικασία εξαιρετικά ειδική.

Η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας για το Sabin 1 [10⁶] πραγματοποιήθηκε 4h μετά τη μόλυνση, γεγονός που σημαίνει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος σε αυτή την συγκέντρωση ξεκινάει την αντιγραφή του 4h μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Επίσης, 6h μετά τη μόλυνση ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση μέσα στα κύτταρα, καθώς εμφάνισε μικρότερο Ct σε σύγκριση με τις 4h, πράγμα που υποδεικνύει συνέχιση και αύξηση της αντιγραφής του ιού. Στις 8, 10 και 12h ο αρνητικός κλώνος φαίνεται να ανιχνεύεται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις μέσα στα κύτταρα, πιθανόν εξαιτίας του σταθερού ρυθμού αντιγραφής σε συνδυασμό με την εμφάνιση CPE στις 10h. Με την εμφάνιση CPE ξεκινάει λύση των κυττάρων με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται ορισμένοι κλώνοι αρνητικής πολικότητας και στον εξωκυττάριο χώρο. Στις 24h παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση των αρνητικών κλώνων και τελικά στις 48h όπου έχει συμβεί σχεδόν πλήρης λύση των κυττάρων, η συγκέντρωση μειώνεται κατακόρυφα. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή της μεθόδου, έρχονται σε συμφωνία με τα συμπεράσματα που διεξάγονται από την παρατήρηση του CPE, διότι η ανίχνευση πραγματοποιείται μόνο στα κύτταρα, καθώς το υπερκείμενο έχει απομακρυνθεί κατά την απομόνωση.

Όσον αφορά το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης [1] CCID₅₀, η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας πραγματοποιείται μόνο 48h μετά τη μόλυνση των

κυττάρων, πιθανόν λόγω της πολύ μικρής συγκέντρωσης του. Ως αποτέλεσμα, χρειάζεται περισσότερο χρόνο να εγκαθιδρύσει τη λοίμωξη και να ξεκινήσει την αντιγραφή του μέσα στο κύτταρο ξενιστή, απ' ότι στη μεγαλύτερη συγκέντρωση [10⁶]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι δεν παρατηρήθηκε CPE.

Για το στέλεχος Echo 12 με συγκέντρωση [10⁶], η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, επιτεύχθηκε 4h μετά τη μόλυνση. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως το συγκεκριμένο στέλεχος σε μεγάλες συγκεντρώσεις ξεκινάει τον κύκλο αντιγραφής του 4h μετά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Στις 6, 8 και 10h μετά τη μόλυνση έχουμε ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου σχεδόν στα ίδια επίπεδα. Από εκεί και πέρα, δηλαδή από τις 12h έως τις 24h έχουμε μία ελαφριά μείωση στη συγκέντρωση του επιθυμητού κλώνου μέσα στα κύτταρα και τελικά στις 48h, έχουμε κατακόρυφη πτώση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η παρατήρηση CPE ξεκινάει στις 8h, με αποτέλεσμα από τότε να ξεκινάει η λύση των κυττάρων και να μειώνεται η ποσότητα των αρνητικών κλώνων μέσα στα κύτταρα, παρόλο που η αντιγραφή συνεχίζεται με τον ίδιο ρυθμό. Η κατακόρυφη μείωση στις 48h μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι από τις 24h και έπειτα είχαμε σχεδόν πλήρη καταστροφή των κυττάρων.

Ακόμη, το στέλεχος Echo 12 σε συγκέντρωση [1] CCID₅₀ φαίνεται να ξεκίνησε την αντιγραφική του δραστηριότητα 24h μετά τη μόλυνση, καθώς τότε επιτεύχθηκε η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας μέσα στα κύτταρα. Βέβαια, 48h μετά τη μόλυνση ο αρνητικός κλώνος εντοπίστηκε σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση, καθώς είχαμε μεγάλη μείωση στην τιμή του Ct. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι στις 48h, είχαμε και εμφάνιση CPE της τάξης του 1⁺.

Η εικόνα από την κινητική μελέτη που προέκυψε για το στέλεχος Echo 12 τόσο για τη συγκέντρωση [10⁶], όσο και για τη συγκέντρωση [1] CCID₅₀, προσομοιάζει σε αυτή που είχε το στέλεχος Sabin 1, παρόλο που πρόκειται για εντεροϊούς που ανήκουν σε διαφορετική ομάδα. Το γεγονός αυτό δηλώνει πως έχουν παρόμοιο κύκλο αντιγραφής στα κύτταρα Rd που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη για την ανάπτυξη τους. Όπως προαναφέρθηκε, και στα δύο στελέχη στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ο αρνητικός κλώνος μπόρεσε να ανιχνευτεί μέσα σε 4

ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, χωρίς να εμφανιστεί κάποια κυτταρική αλλοίωση μέχρι τότε. Αντίστοιχα, το ίδιο συνέβη και στις μικρότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας πραγματοποιήθηκε στις 24h για το Echo 12 και στις 48h για το Sabin 1 και πάλι χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια κυτταρική αλλοίωση. Κάτι τέτοιο καθιστά την συγκεκριμένη Stem Loop Reverse Transcription Real Time PCR μία μη-χρονοβόρα τεχνική με αξιόπιστα αποτελέσματα, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τον εντοπισμό αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών.

Σε προσθήκη με τα παραπάνω, όσον αφορά το πρότυπο στέλεχος CAV13 σε συγκέντρωση $[10^6]$, τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την κινητική ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου, παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά σε σχέση με τα άλλα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Σε αυτή την περίπτωση, ο αντιγραφόμενος κλώνος ανιχνεύθηκε μόνο 48h ώρες μετά τη μόλυνση, παρά την αυξημένη συγκέντρωση του ιού. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα κύτταρα Rd δεν είναι η κατάλληλη κυτταρική σειρά για την καλλιέργεια του συγκεκριμένου στελέχους και έτσι καθυστερεί αρκετά τόσο η είσοδος του ιού μέσα στα κύτταρα λόγω πιθανής έλλειψης κάποιου συνυποδοχέα, όσο και η εγκαθίδρυση της λοίμωξης και η έναρξη της αντιγραφής. Γενικά, το CAV13 αν και ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας C, παρουσιάζει όμως ιδιαιτερότητα στο γεγονός ότι δεν εμφανίζει την χαρακτηριστική εικόνα του CPE κάνοντας ακόμα πιο δύσκολη την ανίχνευση της μολυσματικότητάς του [79]. Πρακτικά αυτό σημαίνει πως με τη χρήση κυτταροκαλλιεργειών δε θα μπορούσε να επιτευχθεί διάκριση ενεργού και μη ενεργού αντιγραφικά ιού όσον αφορά το συγκεκριμένο στέλεχος. Κατά συνέπεια λοιπόν, με την εφαρμογή της τεχνικής που αναπτύξαμε η διάκριση αυτή γίνεται εφικτή.

Τέλος, όσον αφορά το CAV 13 συγκέντρωσης $[1] \text{CCID}_{50}$, ο αρνητικός κλώνος δεν κατάφερε να ανιχνευτεί σε καμία ώρα από αυτές που επιλέχθηκαν για τις απομονώσεις. Αυτό όμως θα μπορούσε να σημαίνει δύο πράγματα, είτε ότι το στέλεχος σε αυτή τη συγκέντρωση δεν κατάφερε να εισέλθει καν στα κύτταρα στο χρονικό διάστημα πριν την πλύση, είτε ότι εισήλθε κανονικά αλλά δεν ήταν αρκετός ο χρόνος για να μπορέσει να ξεκινήσει την αντιγραφή του. Μέσω προσπάθειας για ανίχνευση του θετικού κλώνου, που υποδηλώνει την παρουσία του ιού στα κύτταρα

στις συγκεκριμένες ώρες, φάνηκε τελικά ότι ίσχυε η πρώτη υπόθεση, καθώς ούτε ο θετικός κλώνος κατάφερε να ανιχνευθεί.

Βάσει των παραπάνω, συνειδητοποιούμε πως η ειδική αυτή Stem Loop Reverse Transcription Real Time PCR είναι μία μέθοδος που μπορεί να ανιχνεύσει την αντιγραφική ενεργότητα των ιών Sabin 1, Echo 12 και CAV13 μέσω ανίχνευσης του αρνητικής πολικότητας RNA. Ο σχεδιασμός του ειδικού stem loop εκκινητή της RT έγινε στοχεύοντας την 5'UTR των εντεροϊών, που είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή, έτσι ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικής πολικότητας RNA κλώνου στους περισσότερους ιούς του γένους των εντεροϊών. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη δημιουργήθηκε μία κινητική μελέτη της ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου, έτσι ώστε να είναι δυνατή η στοχευμένη ανίχνευση της αντιγραφικής ενεργότητας σε συγκεκριμένη ώρα μετά τη μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Αυτή η τεχνική μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών, όπως για παράδειγμα σε βιομηχανίες ανάπτυξης εμβολίων όπου το ενδιαφέρον τους επικεντρώνεται στο κατά πόσο οι τεχνικές αδρανοποίησης που έχουν εφαρμοστεί στα διάφορα στελέχη έχουν επιτύχει, καθιστώντας τον ιό αντιγραφικά ανενεργό.

6. Βιβλιογραφία

1. Knipe D. M., and Howley P. M. *Fields Virology, 5th Edition 2007; Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
2. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and ICTV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picornaviridae*. J. Gen. Virol. 2017; Sep 8. doi: 10.1099/jgv.0.000911.
3. Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P. and Carstens, E.B. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch. Virol. 2015;160:1837-1850.
4. Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, 2012; pp 855-880.
5. Eun-Je Yi, Yun-Ju Shin, Jeong-Hwan Kim, Tae-Gyun Kim, and Sun-Young Chang. Clin Exp Vaccine Res. 2017; Jan;6(1):4-14. doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.4.
6. Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:961-965.
7. Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1962;27:1-22.
8. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. Proc Natl Acad Sci U S A 1969;62:912-919.
9. Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. J. Gen. Virol. 1990;71(11): 2483-2501.
10. Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e. 1999
11. Ellie Ehrenfeld, Esteban Domingo, Raymond P. Roos. The Picornaviruses. ASM Press, 2010

12. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:59–63
13. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 1977;268:208–213.
14. Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357–365
15. Racaniello V. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830.
16. Summers DF, Maizel JV. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
17. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981;291: 547–553.
18. Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol* 1993;67:2961–2971.
19. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):119-28.
20. Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
21. Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol*. 1997;71:8868–8874.
22. Yogo Y, Teng MH, Wimmer E. Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101–1109.
23. Whitton JL, Cornell CT, Feuer R. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat Rev Microbiol*. 2005 DOI: 10.1038/nrmicro1284.
24. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989;56:855–865.
25. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*. 2002;10(7): 324–331.

26. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 951–955.
27. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916–919.
28. Intercellular Adhesion Molecule-1: binding to cellular and viral ligands, with implications for biotherapeutics, Jin Lab, Weill Cornell Medical College.
29. Varpu Marjomäki, Paula Turkki, and Moona Huttunen. Infectious Entry Pathway of Enterovirus B Species. 2015 doi: 10.3390/v7122945
30. Francesco Dotta and Guido Sebastiani. Enteroviral Infections and Development of Type 1 Diabetes: *The Brothers Karamazov* Within the CVBs. 2014 doi.org/10.2337/db13-1441
31. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.
32. Ambros V, Baltimore D. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* 1980; 255:6739–6744
33. Jing-Yi Lin, Tzu-Chun Chen, Kuo-Feng Weng, Shih-Cheng Chang, Li-Lien Chen and Shin-Ru Shih. *Journal of Biomedical Science*. 2009 doi.org/10.1186/1423-0127-16-103.
34. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol*
35. Egger D., Bienz K. Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 2002;76(21): 10960 – 10971. 2000;74: 6570–6580.
36. Bienz K, Egger D, Pasamontes L. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 1987;160:220–226.
37. Cho MW, Teterina N, Egger D, et al. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 1994;202:129–145
38. Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.
39. Murray K. E., and Barton D. J. Poliovirus CRE – dependent VPg uridylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* 2003;77(8):4739–4750.

40. Novak JE, Kirkegaard K. 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* 1991;65:3384–3387.
41. Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000;74: 10371–10380.
42. Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 2000;74:10359–10370.
43. Yin J, Paul AV, Wimmer E, et al. Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* 2003;77:5152–5166.
44. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998;12:2293–2304
45. Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 1993;67:4274-4282.
46. Sharma, R., Raychaudhuri, S. & Dasgupta, A. Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* 2004;320, 195–205.
47. Melnick J. L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.) 1990;549 – 605.
48. G. Palacios and MS Oberste. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of neurovirology* 2005;11: 424 – 433
49. Domingo E. and J. J. Holland. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 1997;5:151-178.
50. Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 1993;27:353-436.
51. Figlerowicz M, Magdalena Aleksa, A. Kurzynska-Kokorniak. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 2003;23(4):488-518
52. Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 2003;77(19): 10423-31.

53. Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic.. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 2000;74(18):8434-8443.
54. Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P. Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.* 2007;58(4): 407 – 412
55. Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulis C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/ Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:343 - 351.
56. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. The primery structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology.*1986;155: 202–213.
57. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 1995;23(11): 1870–1875.
58. Kirkegaard K., and Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus.*Cell* 1986;47(3): 433 – 443
59. Agol V. I. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 1997;8:77-84.
60. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160:311-322.
61. Kew O, De L, Yang C-F, et al. The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* 1993;215-246.
62. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al. Molecular epidemiology of polioviruses. In: Kew OM, Nathanson N, eds. *Molecular Epidemiology. Seminars in Virology*, Vol 6. New York: Academic Press; 1995:401-414.
63. Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al. Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* 1995;76:1687β€“1699.
64. Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, et al. Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* 1995;171:1399-1405

65. Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, et al. Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis* 1993;168:1361-1367.
66. Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, Pallansch MA. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*. 2006;55:1–20.
67. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Viol J*. 2009;6:149. doi: 10.1186/1743-422X-6-149.
68. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press; 2001. pp. 723–775
69. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med*. 2008;15:199–203
70. Lee HK, Jeong YS. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol*. 2004;70:3632–3636. doi: 10.1128/AEM.70.6.3632-3636.2004
71. Nicholson F, Meetoo G, Aiyar S, Banatvala JE, Muir P. Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *J Virol Methods* 1994;48(Jul (2-3)):155-66
72. Kopecka H, Dubrou S, Prevot J, Marechal J, López-Pila JM. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(Apr (4)):1213-9
73. Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2014;86(Dec (12)):2019-25
74. Li Y, Pan Z, Ji Y, Peng T, Archard LC, Zhang H. Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease. *Eur Heart J* 2002;23(Apr (7)):567–73.
75. Bhattacharya SS, Kulka M, Lampel KA, Cebula TA, Goswami BB. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *J Virol Methods* 2004;116(Mar (2)):181-7
76. Anwar A, August JT, Too HP. A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Anal Biochem* 2006;352 (May (1)):120-8

77. Riccelli PV, Merante F, Leung KT, Bortolin S, Zastawny RL, Janeczko R, Benight AS. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res* 2001;29 (Feb (4)):996-1004
78. Fikatas A, Dimitriou T.G, Kyriakopoulou Z, et al. Detection of negative and positive RNA strand of poliovirus Sabin 1 and echovirus E19 by a stem-loop reverse transcription PCR. *Lett Appl Microbiol* 2017 Sep;65(3):234-240
79. Lee, S. H., Lee, C., Lee, K. W., Cho, H. B., & Kim, S. J. The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. *J Appl Microbiol*, 2005;98(5), 1020-1029.