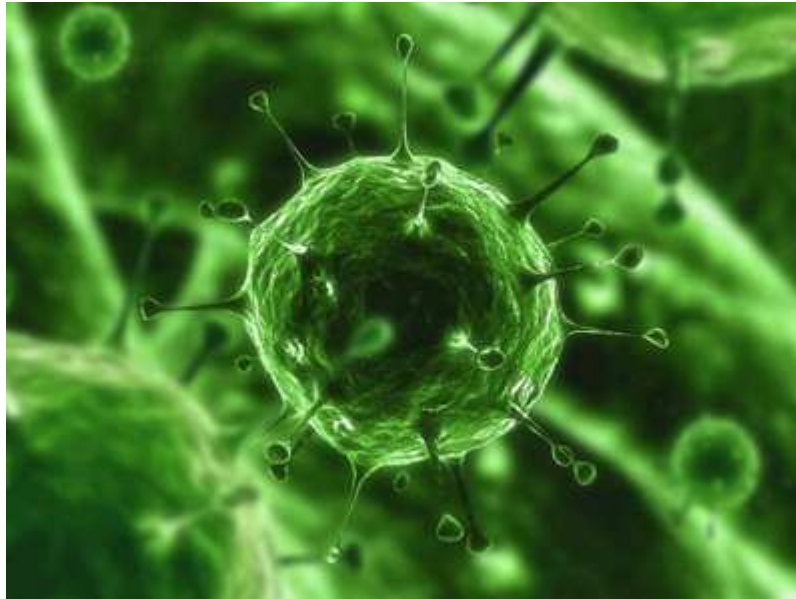


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Δημιουργία PCR μικροσυστοιχιών για την ανίχνευση
και τον μοριακό χαρακτηρισμό των ιών Coxsackie A**

Επιβλέπων καθηγητής : Π. Μαρκουλάτος

ΠΑΤΑΚΟΣ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗΣ

Δημιουργία PCR μικροσυστοιχιών για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των ιών Coxsackie A

Επιβλέπων καθηγητής : Π. Μαρκουλάτος

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Μαρκουλάτος Παναγιώτης : Καθηγητής εφαρμοσμένης μικροβιολογίας-ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος : Αναπληρωτής καθηγητής περιβαλλοντικής μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος : Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ (σελ.4-22)

- 1. Γενικά χαρακτηριστικά**
- 2. Βιολογία των Coxsackie ιών**
 - 2.1 Ταξινόμηση
 - 2.2 Δομή του ιικού σωματιδίου
 - 2.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος
- 3. Κύκλος ζωής των Coxsackie ιών**
- 4. Επιδημιολογία**
- 5. Παθογένεια**

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ (σελ.23-28)

- 1. Κλινικά δείγματα**
- 2. Εκχύλιση RNA**
- 3. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)**
- 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**
- 5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (σελ.29-37)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ (σελ.38-40)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (σελ.41-46)

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά χαρακτηριστικά

Οι ιοί Coxsackie A ανήκουν στο γένος των ανθρώπινων εντεροϊών (enteroviruses)-HEV, το οποίο περιέχει τους polioviruses, coxsackie και echoviruses. Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί (HEV) κατατάσσονται στην οικογένεια των Picorna ιών (Picornaviridae). Αν και οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, εκτιμάται ότι στις Η.Π.Α παρουσιάζουν 5-10.000.000 συμπτωματικές μολύνσεις ετησίως. Οι περισσότερες από αυτές δεν προκαλούν σοβαρά συμπτώματα, ωστόσο η μόλυνση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες ειδικά σε νεογνά και σε άτομα που βρίσκονται σε ανοσοκαταστολή. Επιπλέον, αυτή η ομάδα ιών είναι υπεύθυνη τις περισσότερες φορές για την εκδήλωση ιογενούς μηνιγγίτιδας (aseptic/sterile meningitis), η οποία αποτελεί και την πιο συχνή μόλυνση του κεντρικού νευρικού συστήματος. Η ιογενής μηνιγγίτιδα μπορεί να προκληθεί επίσης και από μόλυνση με κυτταρομεγαλοϊό (Cytomegalovirus) ή και από ερπητοϊό (Herpes virus). Οι ιοί αυτοί ανιχνεύονται στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και προκαλούν την αύξηση των λευκοκυττάρων σε αυτό. Οι εντεροϊοί εμπλέκονται τόσο σε οξείες όσο και σε χρόνιες ασθένειες όπως είναι η νεανική δερματομυοσίτιδα-Dermatomyositis (DM), πολυμυοσίτιδα-polymyositis (PM), διατακτική μυοκαρδιοπάθεια-dilated cardiomyopathy (DCM) και διαβήτη-diabetes mellitus.

2. Βιολογία των Cocksackie ιών

2.1 Ταξινόμηση

Η οικογένεια των Picorna ιών αποτελείται από 9 γένη όπως παρατάσσονται στον παρακάτω πίνακα 2.1.1 .

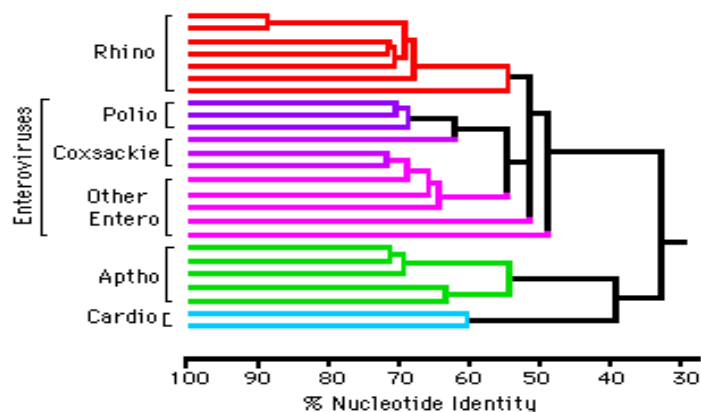
Οικογένεια	Γένος
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>
	<i>Rhinovirus</i>
	<i>Hepatovirus</i>
	<i>Cardiovirus</i>
	<i>Aphthovirus</i>
	<i>Parechovirus</i>
	<i>Erbovirus</i>
	<i>Kobuvirus</i>
	<i>Teschovirus</i>

Πίνακας 2.1.1: Ταξινόμηση των Picorna ιών.(Hygria et al. 1997, Oberste et al. 1999)

Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει τους polio ιούς(3 ορότυποι), τους coxsackie ιούς(23 ορότυποι), τους echo ιούς(28 ορότυποι), 4 ορότυπους ανθρώπινων εντεροϊών(human enterovirus) και πολλούς εντεροϊούς που δεν προσβάλλουν τον άνθρωπο.(Πίνακας 2.1.2)

Γένος	Ιοί
<i>Enteroviruses</i>	<i>Coxsackie virus</i>
	<i>Poliovirus</i>
	<i>Echovirus</i>
	<i>Human enterovirus</i>
	<i>Non human enteric viruses</i>

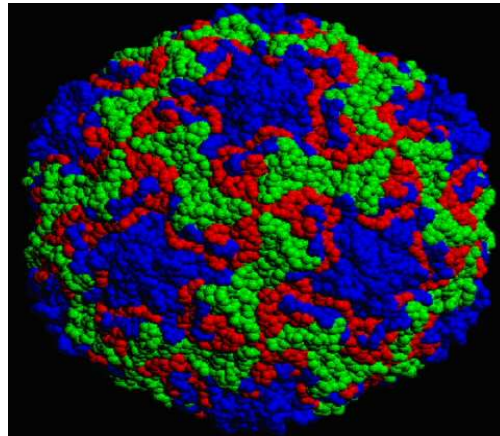
Πίνακας 2.1.2: Ιοί που περιλαμβάνονται στο γένος των εντεροϊών.



Εικόνα 2.1.3 : Παρουσίαση της νουκλεοτιδικής ομοιότητας της οικογένειας των Picorna ιών.(
microbiologybytes.com/virology/HAV)

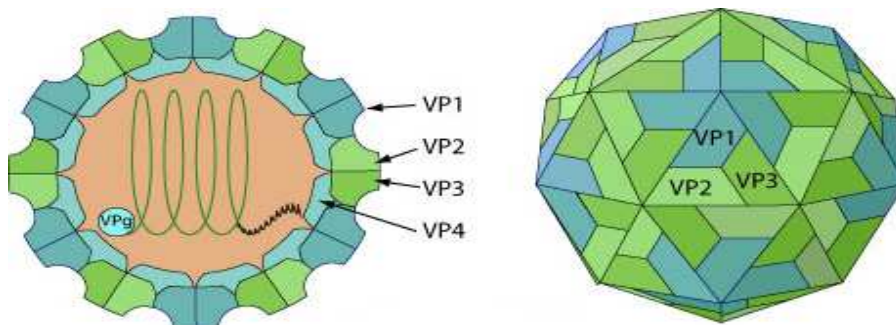
2.2 Δομή του ιικού σωματιδίου

Οι Picornaviridae είναι RNA ιοί με σχετικά απλή δομή. Το ιικό τους σωματίο έχει διάμετρο 30 nm και αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας το οποίο περιβάλλεται από ένα καψίδιο το οποίο παρουσιάζει δομή εικοσαεδρικής συμμετρίας.(Ansardi et al. 1996)



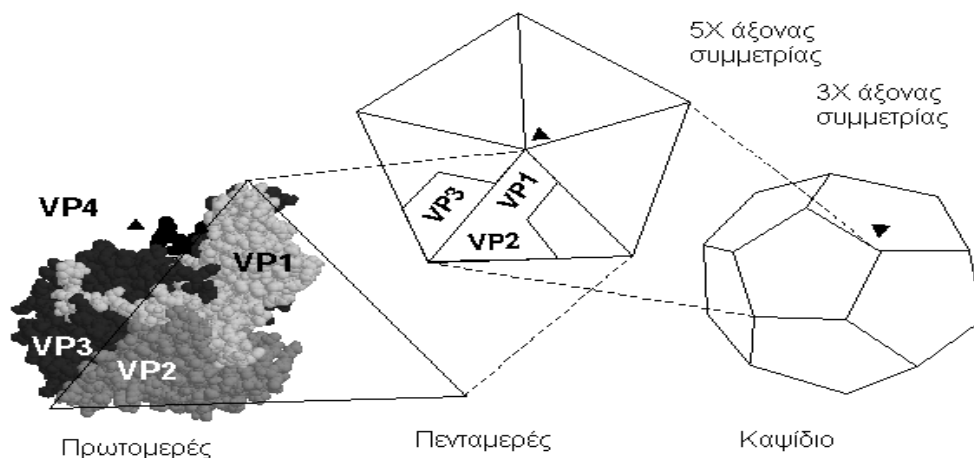
Εικόνα 2.2.1: Κρυσταλλική δομή ενός ισομάτιου της οικογένειας των Picornaviridae.
(Uomaha.edu/biology/tapprich, Dr William E. Tapprich)

Το καψίδιο των Picorna ιών αποτελείται από 4 δομικές πρωτεΐνες: τη VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εξωτερικό τμήμα της επιφάνειας του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό τμήμα. (Εικόνα 2.2.2) Οι 4 πρωτεΐνες βρίσκονται σε 60 αντίγραφα η κάθε μία και όλες μαζί σχηματίζουν το καψίδιο μέσα στο οποίο βρίσκεται το <<γυμνό>> RNA θετικής πολικότητας.



Εικόνα 2.2.2 : Αναπαράσταση της θέσης των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου.
(expasy.ch/viralzone/all_by_species/97)

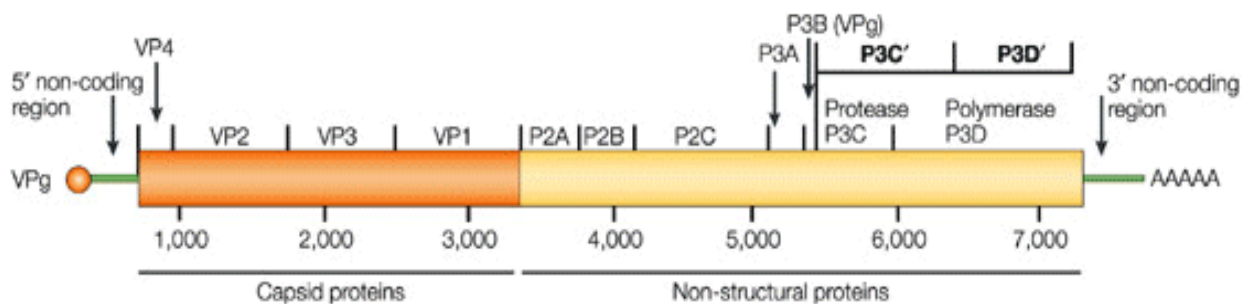
Οι πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 αποτελούν προϊόντα μίας πολύπρωτεΐνης (P1) η οποία έχει υποστεί πρωτεόλυση. Η P1 πρωτεΐνη του καψιδίου κατά την πρωτεόλυση κόβεται στα πολυπεπίδια VP0, VP1 και VP3 τα οποία σχηματίζουν πρωτομερή. Στη συνέχεια παρατηρείται συσσωμάτωση των πρωτομερών και δημιουργία πενταμερών. Τελικά τα πενταμερή σχηματίζουν το προκαψίδιο του ιού, όπου σε αυτό το σημείο το RNA <<πακετάρεται>> στα ιικά σωματίδια και η πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται σε VP2 και VP4 δίνοντας έτσι στον ιό ένα ώριμο πλέον ιικό σωματίδιο σταθερό και ανθεκτικό ακόμα και σε ισχυρά απορρυπαντικά (SDS). Το ώριμο καψίδιο του ιού εμφανίζει 3 άξονες συμμετρίας, τον πενταμερή άξονα (5X) όπου στο κέντρο των πενταμερών παρουσιάζονται ο διμερής (2X) και τριμερής άξονας (3X). Πέντε μόρια της πρωτεΐνης VP1 περιβάλλουν τον 5X άξονα ενώ οι VP2 και VP3 βρίσκονται εναλλάξ στον 3X άξονα συμμετρίας. (Blondel et al. 1998) (Εικόνα 2.2.3)



Εικόνα 2.2.3 : Αναπαράσταση των 3X και 5X των αξόνων συμμετρίας. Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην επιφάνεια του καψιδίου ενώ η VP4 βρίσκεται εξ' ολοκλήρου στο εσωτερικό τμήμα. Το εικοσάεδρο που σχηματίζει το καψίδιο αποτελείται από 12 πενταμερή. (Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease, Philip D. Minor, June 2004)

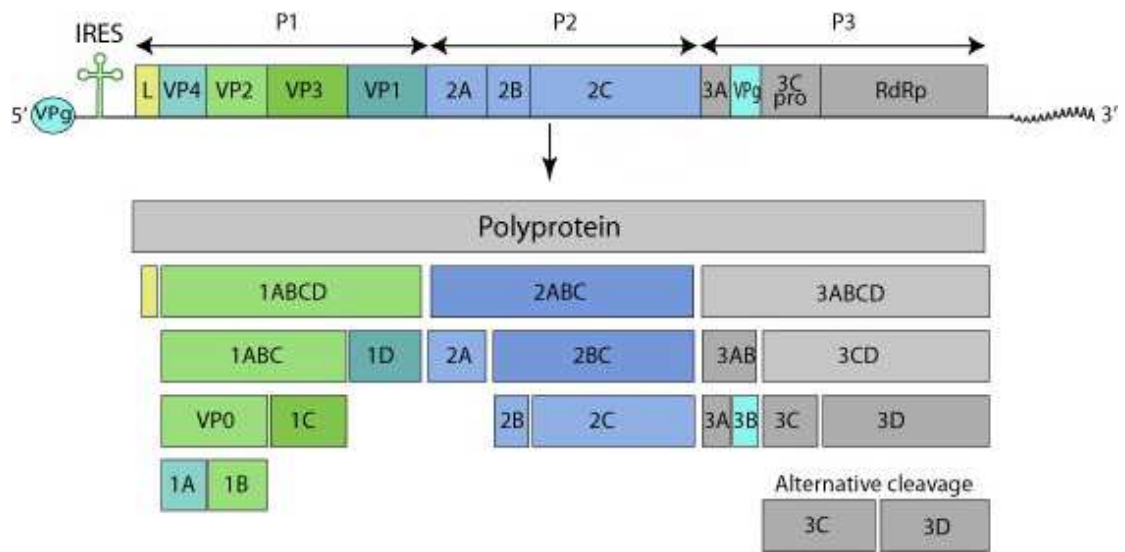
2.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γένωμα των Picorna ιών είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μεγέθους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων. Η νουκλεοτιδική αλληλούχηση μεταξύ πολλών Picorna ιών έδειξε ότι το μέγεθος του γενώματος κυμαίνεται από 7.209 σε 8.450 βάσεις, ενώ παρουσιάζει μια κοινή δομή και οργάνωση. Το RNA θετικής πολικότητας χαρακτηρίζεται ως '<<μολυσματικό>>' καθώς μεταφράζεται με την είσοδό του στο κύτταρο-ξενιστή, για να παράγει τις ικές πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για την αντιγραφή. Το γένωμα των Picorna ιών έχει το μοναδικό χαρακτηριστικό ότι συνδέεται ομοιοπολικώς με μια πρωτεΐνη η οποία καλείται VPg (Virion Protein Genome linked) στο 5' άκρο του ενώ το 3' άκρο του είναι πολυαδενυλιωμένο. (Εικόνα 2.3.1) Η VPg ποικίλει σε μέγεθος ανάλογα με τον Picorna ιό από 22 μέχρι 24 αμινοξέα. (Wimmer et al. 1993)

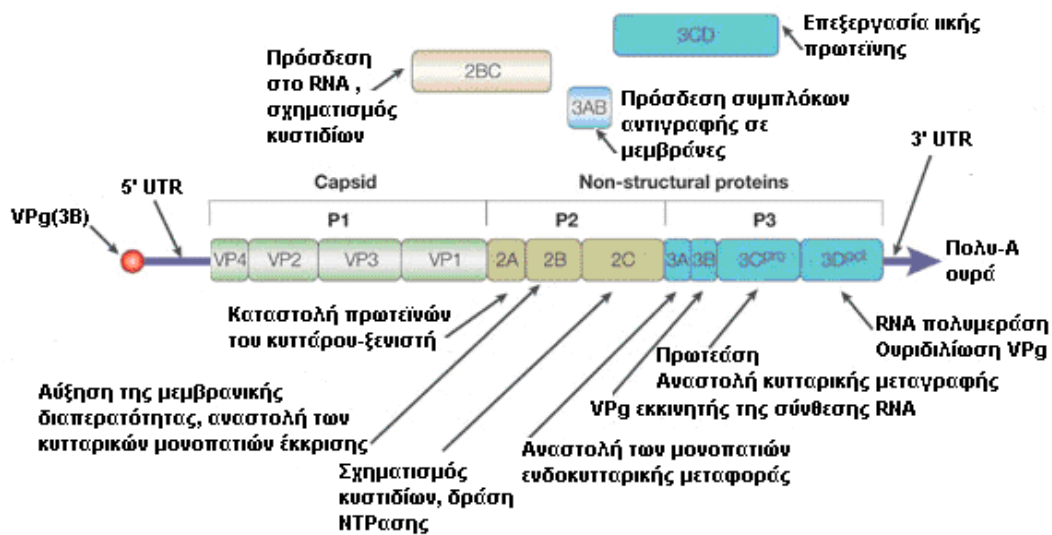


Εικόνα 2.3.1 : Οργάνωση του ιικού γενώματος των Picornaviridae. (Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism, J. Lindsay Whitton, Christopher T. Cornell & Ralph Feuer, *Nature Reviews Microbiology* **3**, 765-776 October 2005)

Η έκφραση της γενετικής πληροφορίας στους Picorna ιούς γίνεται με την αρχική παραγωγή μιας πολυπρωτεΐνης, η οποία περιλαμβάνει όλη την κωδικοποιούσα γενετική περιοχή του ιού. Στη συνέχεια η πολυπρωτεΐνη θα υποβληθεί σε πέψη από πρωτεάσες του ιού και μέσω ενδιάμεσων πρόδρομων πρωτεϊνών, που προκύπτουν από εναλλακτικές διασπάσεις, θα παραχθούν τα ώριμα πολυπεπίδια. (Εικόνα 2.3.2)

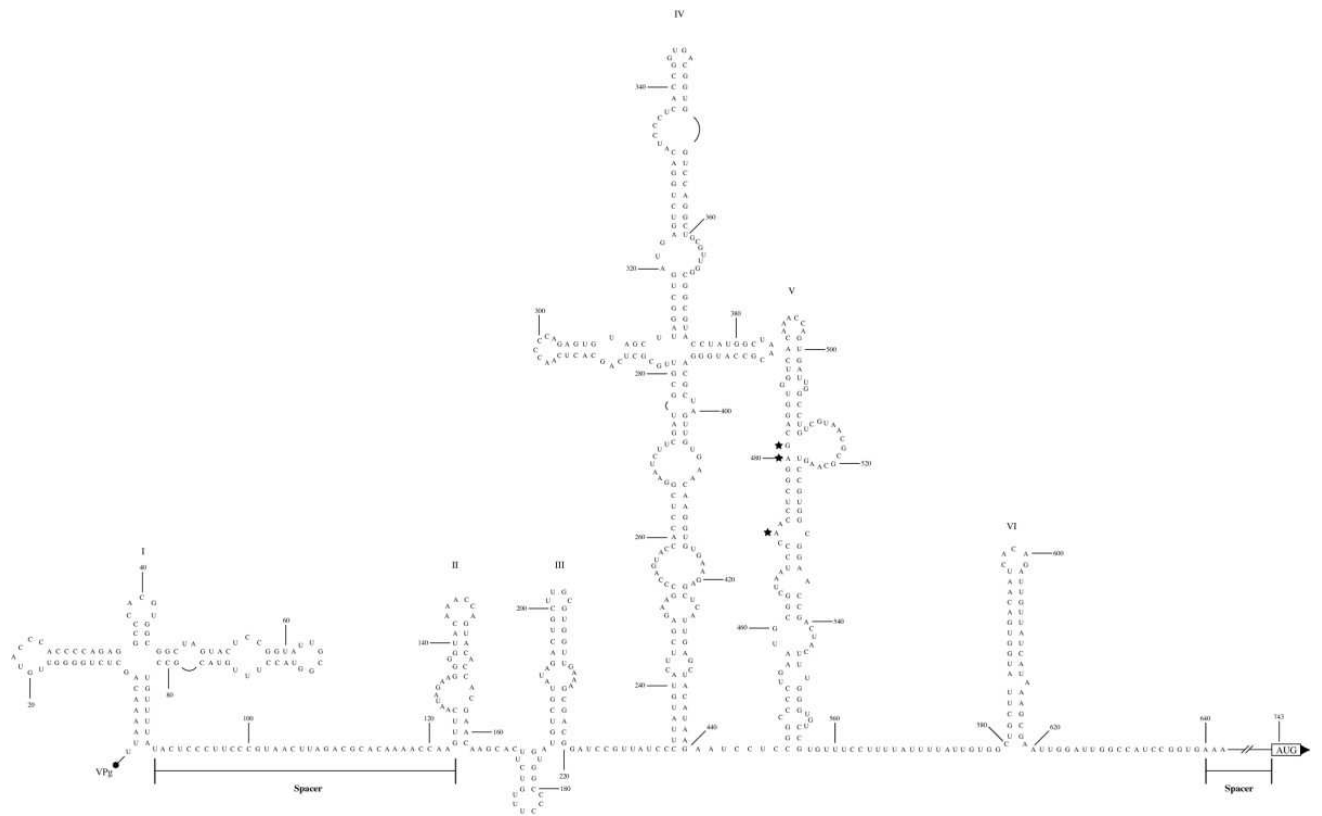


Εικόνα 2.3.2 : Έκφραση της γενετικής πληροφορίας στους Picorna ιούς.
(expasy.ch/viralzone/all_by_species/97, Jennbrophy rhinoviruses)



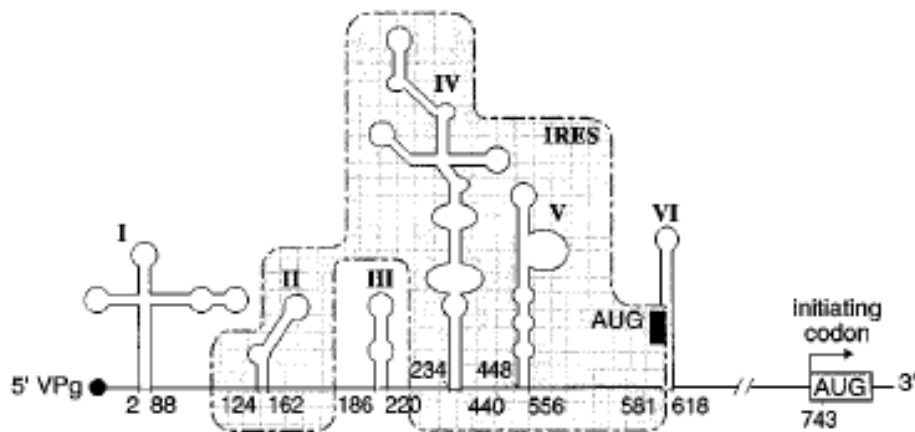
Εικόνα 2.3.3 : Διαγραμματική αναπαράσταση του γενώματος των Picorna ιών όπου παρουσιάζονται τα 12 ώριμα πολυπεπίδια μαζί με τις 3 πρόδρομες πρωτεΐνες

Οι Picorna ιοί παρουσιάζουν έναν εναλλακτικό τρόπο ελέγχου της μετάφρασης. Η 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος του ιού είναι 624-1.100 νουκλεοτίδια περίπου και αποτελεί το 10% του συνολικού γενώματος είναι πλούσια σε δευτεροταγείς δομές και περίπλοκα δομημένη. Περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και την μετάφραση του γενώματος.(Tucker et al. 1993) Σε αυτήν την περιοχή περιέχεται και το γενετικό στοιχείο IRES(Internal Ribosome Entry Site), το οποίο κατευθύνει την μετάφραση του mRNA με πρόσδεση του ριβοσώματος σε αυτό.(Εικόνα 2.3.4)



Εικόνα 2.3.4 : Το γενετικό στοιχείο IRES στην 5' μη κωδική περιοχή (Epidemics to eradication the modern history of poliomyelitis, N.H. De Jesus, *Virology*, 2007)

Στα κυτταρικά mRNA η μετάφραση ξεκινάει όταν τα ριβοσώματα, αφού αναγνωρίσουν την καλύπτρα στο 5' άκρο του mRNA και <<σαρώσουν>> την νουκλεοτιδική αλληλουχία, συναντήσουν ένα κωδικόνιο έναρξης AUG. Σε αντίθεση με την κυτταρική έκφραση, το γένωμα των Picorna ιών μεταφράζεται με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα το 5' άκρο δε φέρει καλύπτρα και συνεπώς δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα, λόγω πρόσδεσης της VPg πρωτεΐνης. Τα ριβοσώματα αντί να <<σαρώνουν>> κατά μήκος τη 5'μη κωδική περιοχή, προσδένονται μέσω του IRES στο RNA του ιού και ξεκινά κατά αυτόν τον τρόπο εσωτερικώς η μετάφραση. (Εικόνα 2.3.5) Αυτός ο μηχανισμός εκτός από τους Picorna ιούς χρησιμοποιείται και από άλλους ιούς όπως ο ιός της ηπατίτιδας C. (B. Blondel et al 1998)



Εικόνα 2.3.5 : Οι δευτεροταγείς δομές όπως παρουσιάζονται στην 5' μη κωδική περιοχή του γενώματος του ιού. Οι έξι δομές φουρκετών αριθμούνται από I-VI. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf, ενώ οι δομές II-VI(εκτός III) αποτελούν το IRES στο οποίο προσδένεται το ριβόσωμα.(B. Blondel et al 1998)

3. Κύκλος ζωής των Coxsackie ιών

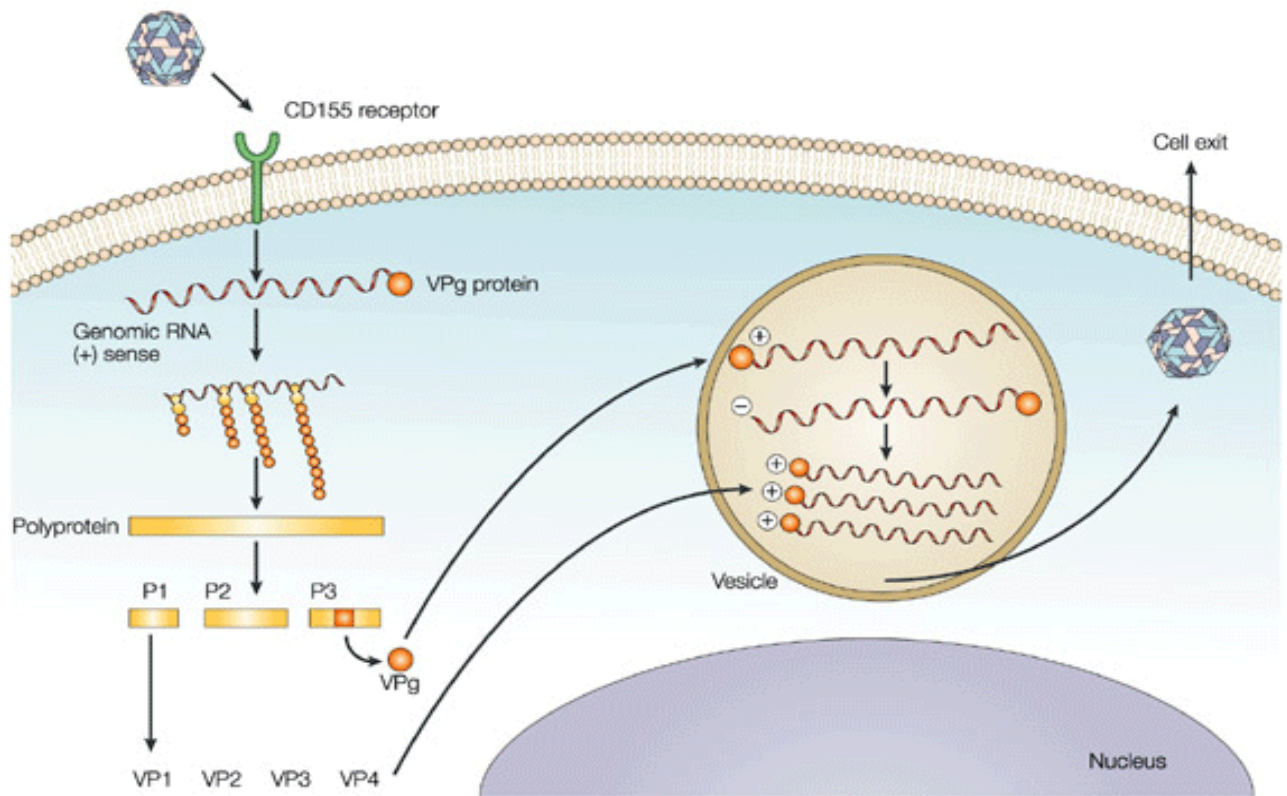
Από τη στιγμή που το γένωμα του ιού εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστή, ξεκινάει η μετάφραση του ιικού RNA θετικής πολικότητας. Παράλληλα με την πρωτεϊνοσύνθεση συντίθεται μεμβρανώδη κυστίδια από συγκεκριμένες πρωτεΐνες του ιού(2,5-3,5 ώρες μετά την μόλυνση). Η εμφάνιση μολυσματικών ιικών σωματιδίων συνδέεται στενά με την αντιγραφή του RNA. Ένας μολυσματικός κύκλος διαρκεί 6-7 ώρες και παράγονται μέχρι και 10^5 νέα ιικά σωματίδια/κύτταρο. Ένας κύκλος ζωής ενός Coxsackie ιού περιγράφεται με τα παρακάτω στάδια(Pfister et al. 1999) :

1. Ο ιός προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα CD155.
2. Η είσοδος του γενώματος του ιού πραγματοποιείται με ενδοκύττωση στο κυττοσόλιο.
3. Αμέσως μετά την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, μία κυτταρική πρωτεάση απομακρύνει την VPg από το 5' άκρο του γενώματος του ιού και πραγματοποιείται η μετάφραση από τα ριβοσώματα. Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού RNA με τη πρόσδεση του ριβοσώματος(40 S ριβοσωμική υπομονάδα) στην περιοχή όπου βρίσκεται η αλληλουχία IRES (Εικόνα 2.3.5), 100 νουκλεοτίδια upstream του κωδικονίου έναρξης AUG.
4. Το ιικό RNA μεταφράζεται σε μία πολυπρωτεΐνη(polyprotein) η οποία υφίσταται διάσπαση μέσω πρωτεόλυσης από ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$) και τελικά παράγονται οι ώριμες λειτουργικές ικές πρωτεΐνες.
5. Η παραγωγή της πρωτεΐνης 2BC του ιού οδηγεί στην εμφάνιση μεμβρανωδών κυστιδίων (vesicle) όπου εσωτερικά τους πραγματοποιείται η αντιγραφή του RNA.
6. Η αντιγραφή του RNA ακολουθεί το κοινό μονοπάτι RNA (+) → RNA(-)→RNA (+). Το RNA (-) αποτελεί ένα RNA ενδιάμεσο(intermediate) το οποίο είναι μερικώς υβριδισμένο σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Ωστόσο η διαδικασία της αντιγραφής δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA απαιτεί την VPg πρωτεΐνη του ιού ως εκκινητή.
7. Τα νεοσυντεθέμενα μόρια RNA (+) μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν στην παραγωγή νέων μορίων RNA, μέσω της διαδικασίας της αντιγραφής, είτε στο να συμμετέχουν ξανά στην πρωτεϊνοσύνθεση. Τέλος τα μόρια RNA (+)

περνούν στο στάδιο της καψιδίωσης για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων. Ο σχηματισμός των νέων ικών σωματιδίων φαίνεται συνδέεται με την αντιγραφή του ιικού RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα(αντιγραφή-καψιδίωση) πραγματοποιούνται στην επιφάνεια των μεμβρανικών κυστιδίων(vesicles) στο κύτταρόπλασμα. Υπάρχουν δύο μοντέλα όσον αφορά το σχηματισμό του καψιδίου, είτε το ικό RNA (+) εισέρχεται στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, είτε τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ικό RNA (+).

8. Το τελικό στάδιο του κύκλου του ιού είναι η συναρμολόγηση των νέων ικών σωματιδίων και η έξοδός τους από το κύτταρο-ξενιστή.

Τα στάδια που περιγράφηκαν παραπάνω, αναπαρίστανται στη ακόλουθη εικόνα 3



Εικόνα 3 : Κύκλος ζωής των Coxsackie ιών

4. Επιδημιολογία

Βάσει ερευνών ο σημαντικότερος παράγοντας, που επηρεάζει τη σοβαρότητα των συμπτωμάτων είναι η ηλικία. Διαφορετικές ηλικίες έχουν διαφορετική ευαισθησία στη λοίμωξη από εντεροϊό και παρουσιάζουν διαφορετικά κλινικά συμπτώματα. Το ιστορικό του ασθενή από προηγούμενες μολύνσεις επηρεάζει την ανοσολογική κατάσταση του ασθενή και συνεπώς την ευαισθησία του στον ιό. Επειδή η μόλυνση είναι πολύ κοινή, η πρώτη επαφή με τον ιό συμβαίνει στην παιδική ηλικία. Αυτός είναι και ο λόγος που τα μικρά παιδιά αποτελούν την συνηθέστερη ομάδα μετάδοσης των εντεροϊών. Η μεγάλη διάρκεια έκθεσης των

παιδιών στον ιό, αυξάνει την πιθανότητα να παρουσιάσουν σημαντικά κλινικά συμπτώματα. Για παράδειγμα, σε ένα ξέσπασμα μηνιγγίτιδας τα παιδιά έχουν υψηλότερο ρίσκο να νοσήσουν απ' ότι οι ενήλικες. Επίσης μια καθυστερημένη εκδήλωση συμπτωμάτων μετά από μια αρχική λοίμωξη, αυξάνει την πιθανότητα σοβαρών επιπλοκών κατά τη μόλυνση με άλλους εντεροϊούς. Για παράδειγμα ένα εξάνθημα το οποίο σχετίζεται με τους Coxsackie A και τους Echo ιούς είναι περισσότερο ήπιο στα παιδιά παρά στους ενήλικες. Ωστόσο, μερικοί εντεροϊοί μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες στα νεογνά παρά σε μεγαλύτερης ηλικίας παιδιά ή στους ενήλικες, προκαλώντας ιική σήψη, μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα και μερικές φορές θάνατο. Σε γενικές γραμμές, η εγκεφαλίτιδα και η ασηπτική μηνιγγίτιδα είναι οι συνηθέστερες ασθένειες που προκαλούν οι εντεροϊοί σε παιδιά ηλικίας 5-14 χρονών, ενώ δεν είναι τόσο συχνά τα κρούσματα σε μικρότερες ή μεγαλύτερες ηλικίες. Οι μολύνσεις με εντεροϊό έχουν παρατηρηθεί ότι επικρατούν σε άτομα χαμηλής κοινωνικής και οικονομικής κατάστασης, σε αντίθεση με άτομα που κατοικούν σε αστικά κέντρα σύμφωνα με έρευνες που έγιναν σε παιδιά τις χρονιές 1951-1953 σε πολιτεία των Η.Π.Α. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσε μία έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Γκάνα το 1971-1973, όπου η συχνότητα εμφάνισης εντεροϊών ήταν σημαντικά αυξημένη σε περιοχές με μειωμένο επίπεδο υγιεινής, σε σύγκριση με τις πόλεις κατά περιόδους των βροχών και της ξηρασίας.(Enteroviruses:polioviruses,coxsackie viruses,echoviruses,and newer enteroviruses,M.Pallansh & R.Roos,2007)

Έτος	Τοποθεσία	Κλινικά συμπτώματα
1969	Καλιφόρνια	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα
1972	Νέα Υόρκη	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος
1972	Αυστραλία	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εξανθήματα, πολυνευρίτιδα,

		οξεία αναπνευστική μόλυνση
1973	Σουηδία	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος
1973	Ιαπωνία	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος
1975	Βουλγαρία	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, οξεία μυοκαρδίτιδα, οξεία παράλυση
1978	Ουγγαρία	Ασηπτική μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, οξεία παράλυση
1985	Χονγκ Κονγκ	Μονοπληγία
1986	Αυστραλία	Ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος
1987	Η.Π.Α	Μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, οξεία παράλυση
1989	Κίνα	Εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος
1997	Μαλαισία	Θανατηφόρα εγκεφαλίτιδα, οξεία παράλυση, εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος
1998	Ταϊβάν	Θανατηφόρα εγκεφαλίτιδα, εξανθήματα στο στόμα και στα άκρα του σώματος

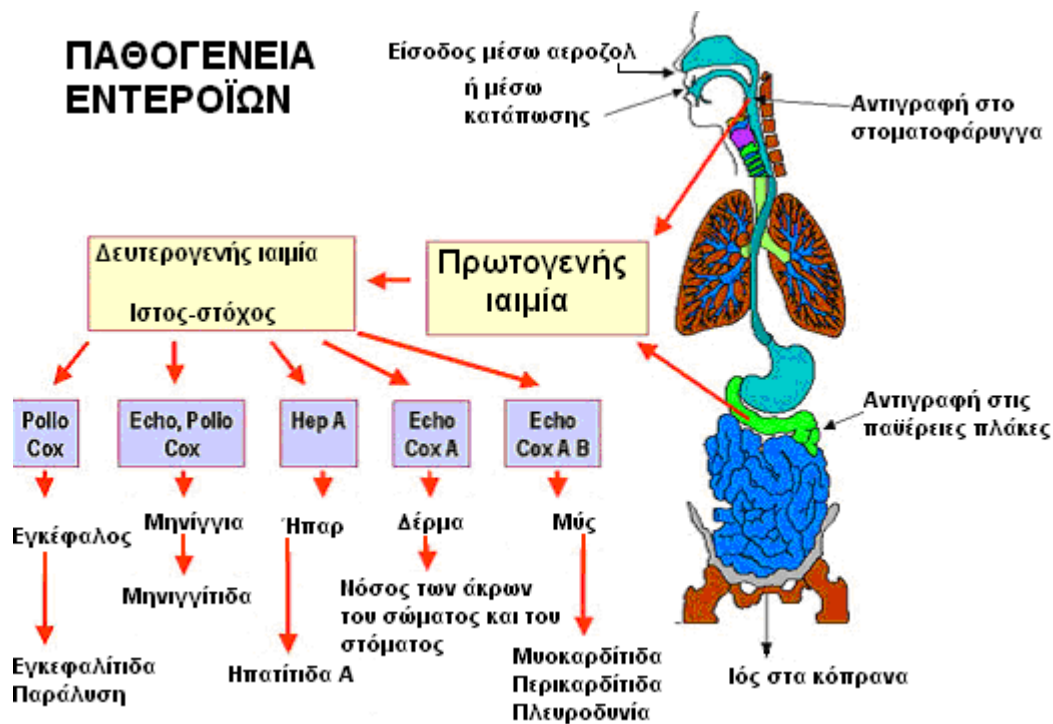
Πίνακας 4 : Παρουσίαση μερικών καταγεγραμμένων περιστατικών ανά την υφήλιο από κρούσματα εντεροϊών κατά τη χρονική περίοδο 1969 – 1998 .

Οι εντεροϊοί προκαλούν ασθένειες και προσβάλλουν με μεγαλύτερη συχνότητα τους άντρες απ' ότι τις γυναίκες σε αναλογία 1,2-2,5:1 (άντρες : γυναίκες). Επίσης οι έρευνες δείχνουν ότι οι άντρες τείνουν να παρουσιάζουν τα σοβαρότερα συμπτώματα της μόλυνσης με EV (π.χ. ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος) απ' ότι τα πιο ελαφριά συμπτώματα, όπως είναι τα εξανθήματα στο

σώμα. Αυτό πιθανότατα έχει κοινωνική και βιολογική εξήγηση. Για παράδειγμα ο ιός πιθανόν στους άντρες να παράγει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα ιικά σωματίδια απ' ό,τι στις γυναίκες. Μια άλλη πιθανότητα αφορά την μεγαλύτερη έκθεση των αρσενικών ενηλίκων σε παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω διαφορετικών γονικών συμπεριφορών. Για παράδειγμα τα παιχνίδια με μικρότερα παιδιά και οι δραστηριότητες με τα μεγαλύτερα. Τέλος οι άντρες ίσως είναι πιθανότερο να αναπτύξουν μία σοβαρή λοίμωξη από εντεροϊό από τις γυναίκες λόγω διαφορετικών ενδοκρινικών επιδράσεων του οργανισμού κατά τη σεξουαλική δραστηριότητα.(Picornaviridae: the viruses and their replication,V.R. Racaniello, 2007) Αυτός είναι και ο λόγος που η μυοκαρδίτιδα προσβάλλει κυρίως τα αρσενικά απ' ό,τι τα θηλυκά άτομα.(με εξαίρεση τις εγκύους και τις γυναίκες με επιλόχεια ψύχωση)

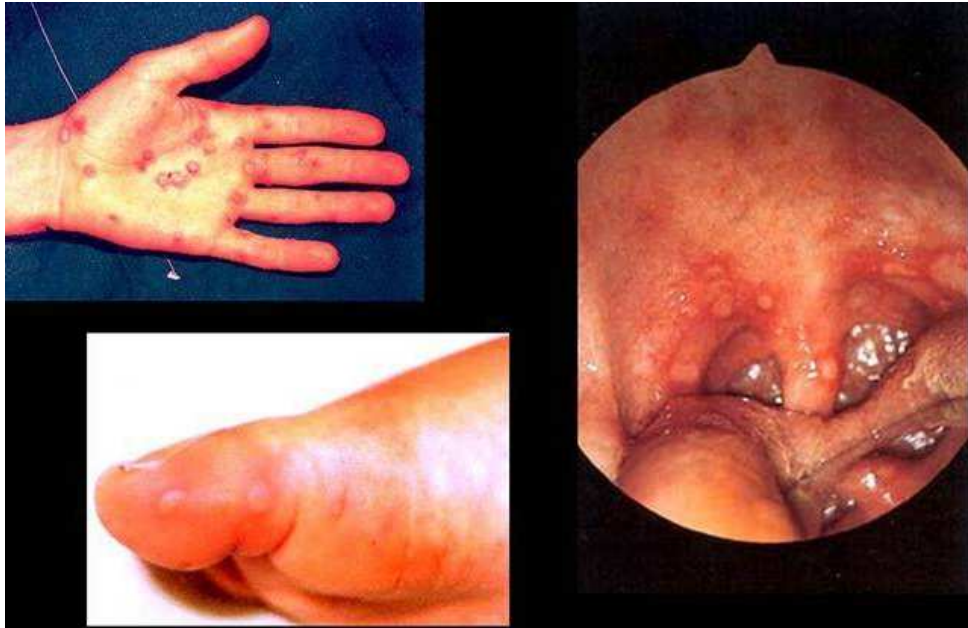
5. Παθογένεια

Οι ιοί Coxsackie A ανήκουν στην κατηγορία των εντεροϊών που προσβάλλουν μυϊκό και επιδερμικό ιστό όπως και οι Coxsackie B και Echo ιοί.(Εικόνα 5.1)



Εικόνα 5.1 : Οδοί και ιστοί-στόχοι των εντεροϊών

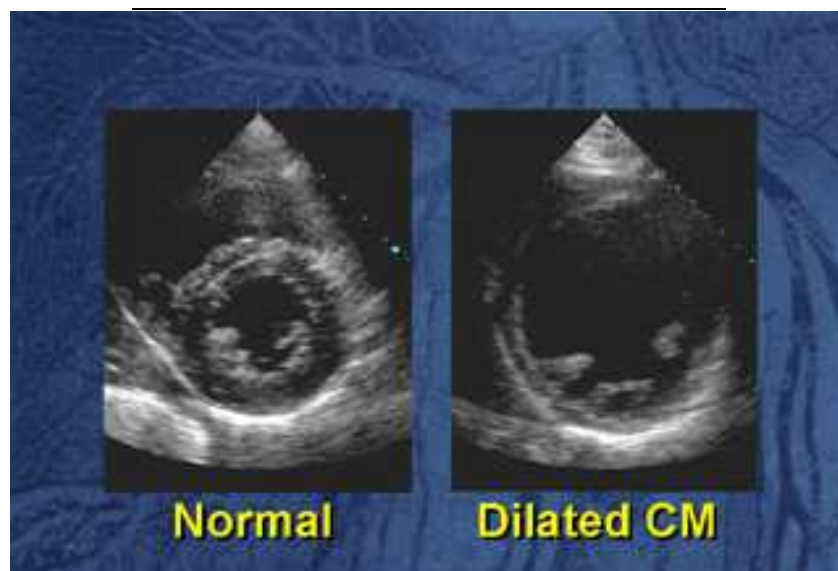
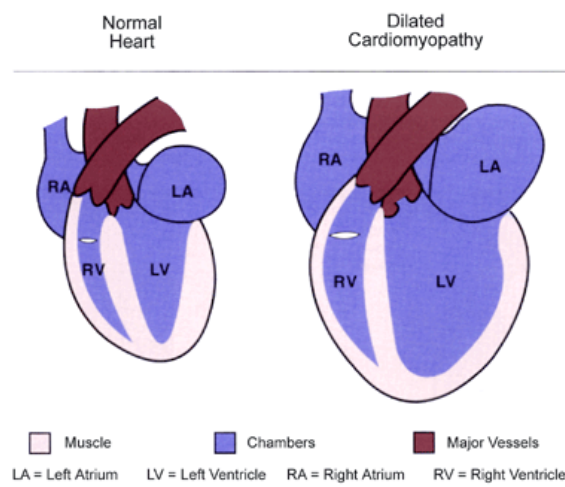
Οι ιοί Coxsackie A μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες όπως η νόσος των άκρων του σώματος και του στόματος (Herpangina) (Εικόνα 5.2), επιπεφυκίτιδα (Εικόνα 5.3), dermatomyositis (DM), πολυμυοσίτιδα (PM), διατακτική μυοκαρδιοπάθεια (DCM) (Εικόνα 5.4) και διαβήτη.



Εικόνα 5.2



Εικόνα 5.3



Εικόνα 5.4 : Σχηματική αναπαράσταση και υπερηχογράφημα της καρδιάς με DCM

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Κλινικά δείγματα

Τα πρότυπα στελέχη εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία προέρχονται από το Ινστιτούτο Pasteur Παρισίων, από τον οργανισμό ATCC (Rockville, Maryland, USA) και από το Εθνικό Κέντρο Επιδημιολογίας Bela Johan, στη Βουδαπέστη (Division of Virology, 'Bela Johan' National Center of Epidemiology, Budapest, Hungary). Τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 ελήφθησαν από το NIBSC (National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom). Αρχικά πραγματοποιήσαμε εκχύλιση RNA (RNA extraction) από κλινικά δείγματα τα οποία προβάλλονται στον πίνακα 1, από τα οποία ακολούθως πραγματοποιήθηκε εργαστηριακά αντίστροφη μεταγραφή (RT), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ηλεκτροφόρηση, για να ταυτοποιήσουμε και να συλλέξουμε τα θετικά δείγματα. Οι ορότυποι των Coxsackie A αναφέρονται ως CAV.

Ορότυπος	Accession number
CAV1	AF499635
CAV11	AF499636
CAV13	AF465511
CAV15	AF499638
CAV17	AF499639
CAV18	AF499640
CAV20	AF499642
CAV21	AF546702
CAV24	D90457

Πίνακας 1: Προβολή των οροτύπων από τα οποία πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση

.Για να ελέγξουμε την σύνδεση των εκκινητών στον κάθε ορότυπο, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα βιοπληροφορικής clustalw, το οποίο επιτρέπει την στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και την εύρεση τυχόν ομοιοτήτων ή διαφορών. Στην παρούσα εργασία ελέγξαμε την ικανότητα πρόσδεσης των εκκινητών στους οροτύπους του πίνακα 1 με χρήση του προγράμματος clustalw, ώστε να ξεχωρίσουμε τους εκκινητές οι οποίοι στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθούν στις PCR.

Για την PCR αρχικά χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών (primers) UG52/UC53 το οποίο στοχεύει στην συντηρημένη 5'-UTR και επιτρέπει την ανίχνευση όλων των εντεροϊών

2. Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas. Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (4×10^3 μg/ml) (-20 °C) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ανάδευση του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά ανάδευση του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g (4 °C) και

απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρωση για 10 λεπτά στα 14000g (4°C). Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Τα eppendorf παρέμειναν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

3. Αντίστροφη μεταγραφή (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των Coxsackie A ιών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει.

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Takara) (50nmol/ μl) (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρωση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε ειδικό μηχάνημα. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first strand Buffer (4μl/tube), 0,1M DTT (2μl/tube) και RNase out (40units/μl) (1μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 7μl του δευτέρου μίγματος σε κάθε eppendorf και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρωση και επώαση των eppendorf στους 37 °C για 2 λεπτά. Τέλος σε κάθε eppendorf προστέθηκε 1μl MMLV-RT (200units/μl) (Invitrogen) και ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 2μl διαλύματος MgCl₂ 50mM (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Paq Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2 Units ενζύμου Paq πολυμεράσης (Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος. Οι PCR εκτελέστηκαν με στόχο όλες τις περιοχές του γένοματος των ιών Coxsackie A. Μαζί με τα δείγματα των Coxsackie A ιών χρησιμοποιήθηκαν και τα στελέχη SABIN 1,2,3, Echo13 και Coxsackie B1. Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR παρατίθενται στον ακόλουθο πίνακα 2

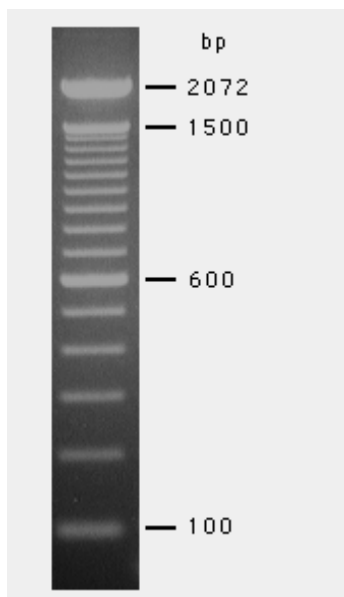
Εκκινητές (Primers) Sense/Antisense	PCR προϊόν (bp)	Tm (°C)	Θέση πρόσδεξης των εκκινητών
ENV-FLAP f/ENV- FLAP r	56	55	5'UTR
AMTH/GDCL	1500	42	VP3-2A
ENV-2/ENV-1	147	53	5'UTR
HEV2AB.d/HEV2C3A.c	1297	45	2A-2C
HEV3C.d1/HEV3D.c2	1300	46	3C-3D
UG52 FLAP/UC53 FLAP	438	63	5'UTR
ENV-FLAP f/HEV-C-9	147	53	5'UTR
O11/O12	436	40	VP1-2A

AN89/AN88	375	60	VP1
CHR5/CHR6	765	50	3D
ENV-FLAP f/HEV-C-11	402	50	5'UTR
EUG3b/EUC2b	1502	43	VP1-2C
O11/O40	406	37	VP1-2A
CHR1/CHR2	800	47	2C
EUG3a EUG3b EUG3c/EUC2 EUC2a EUC2b	1502	45	VP1-2C
UG23/UC15	796	45	2C
CHR3/CHR4	813	40	2C-3C
HEV-B-6/1200R	738	49	5'UTR-VP4
UG1/UC1	473	43	VP1
71925/EUC2b	1242	39	VP1-2C
HEV-C-10/1200R	697	50	5'UTR-VP4
UG52/HEV-C-11	652	50	5'UTR
HEV-C-8/HEV-C-9	352	47	5'UTR
UG16/UC12	595	47	3C-3D
72437/HEV-C-11	820	46	5'UTR
TS1/HEV-C-11	750	47	5'UTR
TS2/1200R	593	43	5'UTR-VP4
92369/294022	98	45	3D

Πίνακας 2: Τα ζεύγη των primers σε αντιστοιχία με το PCR product, το Tm και την περιοχή πρ

5. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των PCR

Τα προϊόντα των PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA). Επίσης προστέθηκαν 100μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl) το οποίο είναι απαραίτητο καθώς προσδένεται στο DNA και το καθιστά έτσι εμφανές σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώνουμε 10μl από κάθε PCR προϊόν, αναμειγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής ώστε να μπορούμε να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 4-6 μl μάρτυρα μοριακού βάρους (Εικόνα 5.1) για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων. Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση 120 Volts. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων.



Εικόνα 5.1: Μάρτυρας μοριακού βάρους 100bp DNA ladder Invitrogen UK που χρησιμοποιήθηκε στις ηλεκτροφορήσεις

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προαναφέραμε πραγματοποιήθηκαν οι PCR του πίνακα 2 και τα αποτελέσματα παρατίθενται στους ακόλουθους πίνακες όπου παρουσιάζονται τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων και η περιοχή όπου δεσμεύονται στο γονιδίωμα των οροτύπων. Οι περιοχές που ενισχύθηκαν με τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων ήταν οι 5'-UTR, VP4, VP1, 2A, 2B, 2C, 3C και 3D. Με (+) συμβολίζονται οι έντονες ζώνες κατά την ηλεκτροφόρηση. Ταυτόχρονα μαζί με τους ορότυπους των Coxsackie A, ηλεκτροφορήθηκαν και τα στελέχη Sabin 1,2,3 ,Coxsackie B1 και Echo 13 για να ελεγχθεί η πιθανότητα σύνδεσης των εκκινητών και σε αυτά τα στελέχη.

Ορότυποι	UG52/UC53 (5' UTR) (168-606)	AMTH/GDCL (VP3-2A) (2204-3714)	ENV1/ENV2 (5'UTR) (451-598)	HEV2AB.d/HEV2C3A.c (2A-2C) (3809-5106)
CAV1	+	-	+	-
CAV11	+	-	+	-
CAV13	+	-	+	-
CAV15	+	-	+	-
CAV17	+	-	+	-
CAV18	+	-	+	-
CAV20	+	-	+	-
CAV21	+	-	+	-
CAV24	+	-	+	-
COXB1		-	+	-
SABIN 1		-	+	-
SABIN 2			+	-
SABIN 3				
ECHO 13		-		

Ορότυποι	ENV-FLAPf /ENV-FLAP r (5'UTR) (418-474)	HEV3C.d1/HEV3D.c2 (3C-3D) (5666-6966)	UG52 FLAP/UC53 FLAP (5'UTR) (168-606)

CAV1	αχνό	-	+
CAV11	+	-	+
CAV13	+	-	+
CAV15	+	-	+
CAV17	+	-	+
CAV18	+	-	+
CAV20	+	-	+
CAV21	+	-	+
CAV24	+	-	+
COXB1			
SABIN 1			
SABIN 2		-	
SABIN 3			
ECHO 13			

Ορότυποι	ENV-FLAP f /HEV-C-9 (5'UTR) (418-553)	O11/O12 (VP1-2A) (2875-3311)	AN89/AN88 (VP1) (2602-2977)	CHR5/CHR6 (3D) (6485-7250)
CAV1	+	-	+	-
CAV11	+	-	+	-
CAV13	+	-	-	-
CAV15	+	-	+	αχνό
CAV17	+	-	+	-
CAV18	+	-	+	-
CAV20	+	-	+	Πολύ αχνό
CAV21	+	-	+	-
CAV24	+	-	αχνό	αχνό
COXB1		-	+	αχνό
SABIN 1		-	+	-
SABIN 2				
SABIN 3				
ECHO 13		-	+	αχνό

Ορότυποι	ENV-FLAP f /HEV-C-11 (5'UTR) (418-820)	EUG3b/EUC2b (VP1-2C) (2946-4448)	O40/O11 (VP1-2A) (2905-3311)	CHR1/CHR2 (2C) (4284-5084)
CAV1	+	-	-	+
CAV11	+	+	-	-
CAV13	Πολύ αγνό	-	-	-
CAV15	+	+	-	+
CAV17	+	Πολύ αγνό	-	-
CAV18	Πολύ αγνό	-	-	-
CAV20	+	-	-	-
CAV21	+	-	-	-
CAV24	Πολύ αγνό	Πολύ αγνό	-	-
COXB1	+	-	-	+
SABIN 1			-	-
SABIN 2				
SABIN 3	+	+		
ECHO 13	+	-	-	+

Ορότυποι	EUG3a,EUG3b,EUG3c/ EUC2,EUC2a,EUC2b (VP1-2C) (2946-4448)	CHR3/CHR4 (2C-3C) (5047-5860)	UG1/UC1 (VP1) (2399- 2872)	71935/EUC2b (VP1-2C) (3206-4448)
CAV1	Πολύ αγνό	-	-	-
CAV11	Πολύ αγνό	-	-	-
CAV13	-	-	-	-
CAV15	Πολύ αγνό	-	-	-
CAV17	Πολύ αγνό	-	Πολύ αγνό	-
CAV18	-	-	-	-
CAV20	-	-	-	-
CAV21	-	-	-	-
CAV24	-	-	-	-
COXB1	Πολύ αγνό	-	-	-
SABIN 1	-		+	Πολύ αγνό
SABIN 2				
SABIN 3				
ECHO 13	-	-	-	-

Ορότυποι	HEV-C-10 /1200R (5'UTR-VP4) (449-1196)	UG52 /HEV-C-11 (5'UTR) (168-820)	HEV-C-8 /HEV-C-9 (5'UTR) (201-553)	UG16/UC12 (3C-3D) (5921-6516)
CAV1	-	+	-	-
CAV11	-	+	Αχνό	Πολύ αχνό
CAV13	-	-	-	+
CAV15	+	+	+	Πολύ αχνό
CAV17	+	+	+	+
CAV18	-	-	-	Πολύ αχνό
CAV20	+	+	+	-
CAV21	+	+	+	+
CAV24	-	-	αχνό	+
COXB1	-	+	Πολύ αχνό	-
SABIN 1	Πολύ αχνό	-	-	+
SABIN 2				+
SABIN 3				+
ECHO 13	-	+	αχνό	-

Ορότυποι	72437 /HEV-C-11 (5'UTR) (1-820)	TS1 /HEV-C-11 (5'UTR) (70-820)	TS2/1200R (5'UTR-VP4) (603-1196)	92369/294022 (3D) (6827-6925)
CAV1	-	+	+	-
CAV11	300bp	+	+	-
CAV13	-	-	-	-
CAV15	300bp	+	+	-
CAV17	300bp	+	+	-
CAV18	-	-	-	-
CAV20	+	+	+	-
CAV21	+	+	+	-
CAV24	300bp	-	-	-
COXB1	-	+	+	-
SABIN 1	300bp	-	+	-
SABIN 2	300bp(αχνό)		+	-
SABIN 3	300bp		-	-
ECHO 13	300bp(αχνό)	+	+	-

Ορότυποι	HEVB6/1200R (5'UTR-VP4) (458-1196)	UG23/UC15 (2C) (4169-4965)
CAV1	+	-
CAV11	+	+
CAV13	-	-
CAV15	+	-
CAV17	+	+
CAV18	-	-
CAV20	+	-
CAV21	+	-
CAV24	-	-
COXB1	+	-
SABIN 1	+	+
SABIN 2		+
SABIN 3		+
ECHO 13	+	-

Το κόκκινο χρώμα στους πίνακες αντιπροσωπεύει τα στελέχη των εντεροϊών στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε PCR στο κάθε ζεύγος εκκινητών. Με βάση τα αποτελέσματα των PCR μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι οι περισσότεροι εκκινητές προσδένονται ισχυρά και στους περισσότερους ορότυπους στην 5'-UTR περιοχή. Στους ακόλουθους πίνακες 3 α,β, μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων που είχαν την ισχυρότερη πρόσδεση στους περισσότερους οροτύπους των Coxsackie A.

Ορότυποι	UG52/UC53 (5' UTR) (168-606)	ENV1/ENV2 (5'UTR) (451-598)	ENV- FLAPf /ENV- FLAP r (5'UTR) (418-474)	UG52 FLAP/UC53 FLAP (5'UTR) (168-606)	HEV-C- 8 /HEV- C-9 (5'UTR) (201- 553)
CAV1	+	+	αχνό	+	-
CAV11	+	+	+	+	Αχνό

CAV13	+	+	+	+	-
CAV15	+	+	+	+	+
CAV17	+	+	+	+	+
CAV18	+	+	+	+	-
CAV20	+	+	+	+	+
CAV21	+	+	+	+	+
CAV24	+	+	+	+	αχνό

Πίνακας 3 α

Ορότυποι	ENV-FLAP f /HEV-C-9 (5'UTR) (418-553)	AN89/AN88 (VP1) (2602-2977)	ENV-FLAP f /HEV-C-11 (5'UTR) (418-820)	UG52 /HEV-C-11 (5'UTR) (168-820)
CAV1	+	+	+	+
CAV11	+	+	+	+
CAV13	+	-	Πολύ αχνό	-
CAV15	+	+	+	+
CAV17	+	+	+	+
CAV18	+	+	Πολύ αχνό	-
CAV20	+	+	+	+
CAV21	+	+	+	+
CAV24	+	αχνό	Πολύ αχνό	-
Ορότυποι	TS1 /HEV-C-11 (5'UTR) (70-820)	TS2/1200R (5'UTR-VP4) (603-1196)	HEVB6/1200R (5'UTR-VP4) (458-1196)	
CAV1	+	+	+	
CAV11	+	+	+	
CAV13	-	-	-	
CAV15	+	+	+	
CAV17	+	+	+	
CAV18	-	-	-	
CAV20	+	+	+	
CAV21	+	+	+	
CAV24	-	-	-	

Πίνακας 3 β

Σύμφωνα με τον πίνακα 3 α,β μπορούμε να ομαδοποιήσουμε τα αποτελέσματα μας ανάλογα με τον κάθε ορότυπο των Coxsackie A ιών. Συγκεκριμένα οι ορότυποι CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17, CAV18, CAV20, CAV21, CAV24 ενισχυθήκαν από τα ζεύγη primers UG52/UC53, ENV1 / ENV2, ENV-FLAPf/ENV-FLAP r, UG52 FLAP/UC53 FLAP, ENV-FLAP f/HEV-C-9 και ENV- FLAP f/ HEVC-11 στην 5'-UTR περιοχή. Το ζεύγος AN89/AN88 που προσδένεται στη VP1 περιοχή ενισχύει όλους τους ορότυπους εκτός του CAV13. Τα ζεύγη εκκινητών UG52/HEV-C-11 και TS1/HEV-C-11 ενισχύουν την 5'-UTR σε όλους τους ορότυπους εκτός των CAV13, CAV18, CAV24. Οι primers HEV-C-8/HEV-C-9 ενισχύουν την 5'-UTR περιοχή σε όλους τους ορότυπους εκτός των CAV1, CAV11, CAV18. Τέλος οι primers TS2/1200R και HEVB6/1200R ενισχύουν σε όλους τους ορότυπους την 5'-UTR εκτός των CAV13, CAV18, CAV24. Εκτός από τους primers οι οποίοι προσδένονται στην συντηρημένη 5'-UTR περιοχή υπήρχαν και εκκινητές οι οποίοι στόχευαν την περιοχή του γονιδιώματος του ιού που κωδικοποιεί τις καψιδιακές πρωτεΐνες(VP1, VP2, VP3, VP4). Επίσης πραγματοποιήθηκαν και PCR στις περιοχές που κωδικοποιούν τις μη δομικές πρωτεΐνες του ιού(2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D). Τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων παρουσιάζονται στον πίνακα 4 α,β.

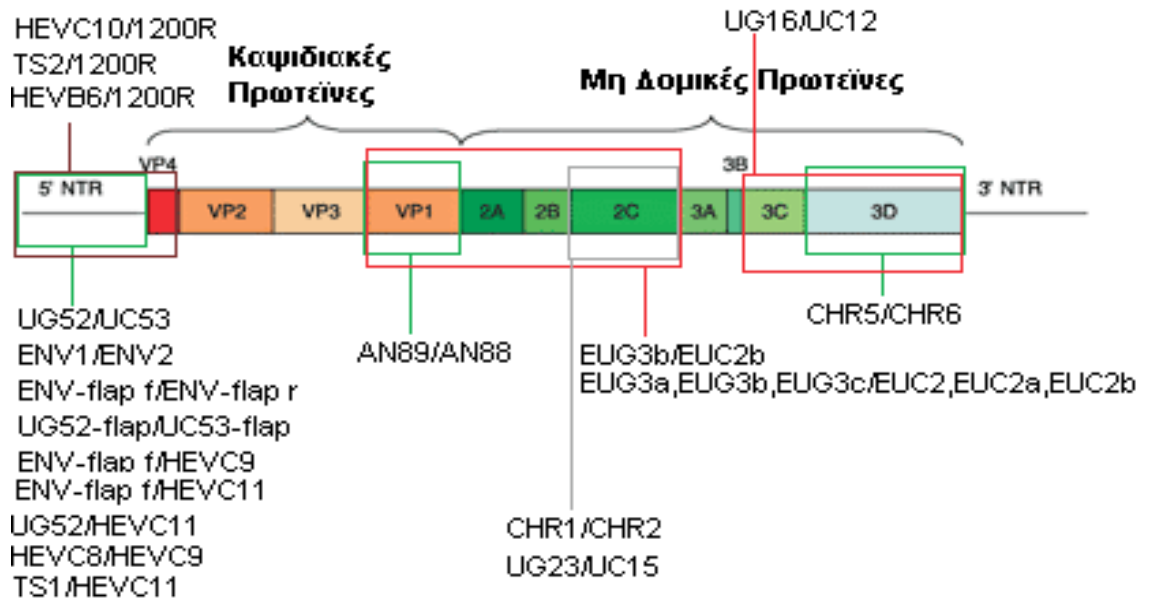
Ορότυποι	AN89/AN88 (VP1) (2602- 2977)	EUG3b/EUC2b (VP1-2C) (2946-4448)	CHR1/CHR2 (2C) (4284- 5084)	UG16/UC12 (3C-3D) (5921- 6516)	TS2/1200R (5'UTR- VP4) (603- 1196)
CAV1	+	-	+	-	+
CAV11	+	+	-	Πολύ αχνό	+
CAV13	-	-	-	+	-
CAV15	+	+	+	Πολύ αχνό	+
CAV17	+	Πολύ αχνό	-	+	+
CAV18	+	-	-	Πολύ αχνό	-
CAV20	+	-	-	-	+
CAV21	+	-	-	+	+
CAV24	αχνό	Πολύ αχνό	-	+	-

Πίνακας 4 α

Ορότυποι	UG23/UC15 (2C) (4169-4965)	HEVB6/1200R (5'UTR-VP4) (458-1196)
CAV1	-	+
CAV11	+	+
CAV13	-	-
CAV15	-	+
CAV17	+	+
CAV18	-	-
CAV20	-	+
CAV21	-	+
CAV24	-	-

Πίνακας 4 β

Εξετάζοντας τα δεδομένα του πίνακα 4 α, β παρατηρούμε ότι στις περιοχές του γονιδιώματος του ιού εκτός της 5'-UTR έχουμε περιορισμένη ενίσχυση από τα ζεύγη των εκκινητών. Συγκεκριμένα, το ζεύγος AN89/AN88 που στοχεύει τη VP1 περιοχή ενισχύει όλους τους ορότυπους των Coxsackie A. Οι primers EUG3b/EUC2b που στοχεύουν την περιοχή VP1-2C, ενισχύουν μόνο τους ορότυπους CAV11, CAV15, CAV17 και CAV24. Οι εκκινητές CHR1/CHR2 οι οποίοι στοχεύουν την C2 περιοχή ενισχύει μόνο του ορότυπους CAV1 και CAV15. Οι primers UG16/UC12 της 3C-3D περιοχής ενίσχυσαν όλους τους ορότυπους εκτός των CAV1 και CAV20. Οι εκκινητές UG23/UC15 ενισχύουν την 2C μόνο στους ορότυπους CAV11 και CAV17. Τέλος τα ζεύγη primers TS2/1200R και HEVB6/1200R τα οποία στοχεύουν την περιοχή 5'-UTR-VP4 ενισχύουν όλους τους ορότυπους εκτός από τους CAV13, CAV18, CAV24. Με βάση τους παραπάνω πίνακες μπορούμε να προσδιορίσουμε σχηματικά τα θετικά αποτελέσματα πάνω στις διάφορες περιοχές του γονιδιώματος των Coxsackie A ιών (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Παρουσίαση του γονιδιώματος των Coxsackie A ιών και των περιοχών όπου προσδένονται οι διάφοροι εκκινητές

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει κάποιο ζεύγος εκκινητών που να έχει αποκλειστική ειδικότητα στους Coxsackie A ιούς. Αυτό προκύπτει από τα αρνητικά control που χρησιμοποιήσαμε (Coxsackie B, Sabin και Echo ιούς) καθώς παρατηρείται πρόσδεση και σε αυτούς, με τους συγκεκριμένους primers. Μόνο το ζεύγος HEV-C-10/1200R που προσδένεται στην 5'-UTR-VP4 περιοχή δείχνει μία ειδικότητα στους Coxsackie A.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιοί Coxsackie A ανήκουν στην κατηγορία των RNA ιών κατά Baltimore και μπορούν να προκαλέσουν αναπνευστικές ή εντερικές μολύνσεις. Αν και ο ιός δεν είναι θανατηφόρος (εκτός σπάνιων πολύ σοβαρών περιπτώσεων) στατιστικά έχει σημειωθεί ότι στο 20% του πληθυσμού που προσβάλλει, προκαλεί μόνιμες καρδιακές παθήσεις. Ο ιός προκαλεί δύο κοινές αλλά δυσάρεστες παιδικές ασθένειες: το σύνδρομο χεριών, ποδιών και στόματος, και μια σοβαρή μορφή έρπη (herpangina). Ο ιός εξαπλώνεται εύκολα και συνήθως προσβάλλει τα παιδιά ηλικίας 6 μηνών μέχρι και 10 χρόνων. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η χρήση μοριακών τεχνικών, οι οποίες θα μπορούν να ανιχνεύσουν σε σύντομο χρονικό διάστημα διάφορους ορότυπους των Coxsackie A ιών. Μία από αυτές τις τεχνικές με μεγάλη ευαισθησία και επαναληψιμότητα είναι η RT-PCR. Επομένως σκοπός της εργασίας είναι η χρήση της μεθόδου RT-PCR για την ανίχνευση διαφορετικών οροτύπων του ιού αυτού σε κλινικά δείγματα. Για το σκοπό αυτό σχεδιάσαμε μια σειρά εκκινητικών μορίων που ενισχύουν τμήματα των περιοχών 5'-UTR, VP4, VP1, 2A, 2B, 2C, 3C και 3D. Με βάση τα εκκινητικά μόρια τα οποία σχεδιάστηκαν στην παρούσα εργασία, έγινε δυνατή η ανίχνευση σχεδόν όλων των οροτύπων Coxsackie A στην 5'-UTR.

Στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια για να ενισχύσουν συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος του ιού. Στη συνέχεια με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πολλαπλασιάσαμε την περιοχή στόχο που μας ενδιαφέρει να ενισχύσουμε με κάθε ζεύγος εκκινητών. Μετά την ολοκλήρωση των πειραμάτων συνοψίσαμε τα αποτελέσματα σε πίνακες, ώστε να ομαδοποιήσουμε και να αξιολογήσουμε την περιοχή και την ικανότητα πρόσδεσης αντίστοιχα του κάθε ζεύγους primers στον κάθε ορότυπο. Παράλληλα ελέγξαμε και την ικανότητα πρόσδεσης των εκκινητικών μορίων και σε Sabin, Echo και Coxsackie B ιούς για να ανιχνευθεί αν πραγματοποιείται υβριδισμός των εκκινητικών μορίων στα στελέχη αυτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκαν μια σειρά εκκινητών οι οποίοι δεν υβριδίζονται με την ίδια συγγένεια μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων των ιών Coxsackie A. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκαν εκκινητές, που ενισχύουν τμήματα της 5'-UTR, οι οποίοι δίνουν σήμα ενίσχυσης σε όλους τους ορότυπους που μελετήθηκαν

στην παρούσα εργασία. Όλα τα αποτελέσματα της εργασίας συνοψίζονται αναλυτικά στους πίνακες 3 α, 3β, 4 α, 4β.

Μετά την πραγματοποίηση των PCR, εντοπίστηκαν μια σειρά εκκινητικών μορίων τα οποία δείχνουν μεγάλη ευαισθησία στους περισσότερους ορότυπους Coxsackie A που εξετάστηκαν. Πιο συγκεκριμένα 9 ζεύγη εκκινητικών μορίων που ενισχύουν διαφορετικές περιοχές της 5'-UTR, 2 ζεύγη που ενισχύουν την 5'UTR-VP4 περιοχή και 1 ζεύγος που ενισχύει την VP1. Τα ζεύγη εκκινητών παρατίθενται στον πίνακα 5. Τα εκκινητικά μόρια επιλέχθηκαν ώστε να ενισχύουν τους περισσότερους ορότυπους των Coxsackie A ιών. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι το ζεύγος AN89/AN88 που στοχεύει στην περιοχή VP1 δεν υβριδίζεται με τον ορότυπο CAV13. Επίσης τα ζεύγη UG52/HEV-C-11 (5' UTR περιοχή), TS2/1200R (5'UTR-VP4 περιοχή), HEVB6/1200R (5'UTR-VP4 περιοχή) και TS1/HEV-C-11 (5'UTR περιοχή) δεν υβριδίζονται με τους ορότυπους CAV13, CAV18,CAV24. Τέλος οι primers HEV-C-8/HEV-C-9 οι οποίοι ενισχύουν περιοχή της 5'-UTR δεν υβριδίζονται με τους ορότυπους CAV1, CAV11, CAV18. Επίσης παρατηρήθηκε ότι σε κάποια ζεύγη εκκινητών, συγκεκριμένα στους primers TS1/HEV-C-11, AN89/AN88, HEV-B-6/1200R, ENV-FLAP-f/HEV-C-11 παρουσιάστηκε υβριδισμός με τα στελέχη Coxsackie B1(CB1), Sabin(1,2,3) και Echo13. Ενώ στους εκκινητές UG52/HEV-C-11, TS1/HEV-C-11 και HEV-C-8/HEV-C-9 υβριδίζονται τα στελέχη CB1 και Echo13. Τέλος με το ζεύγος ENV1/ENV2 υβριδίζονται μόνο τα στελέχη Sabin.

Ζεύγος εκκινητών	Περιοχή πρόσδεσης
UG52/UC53	5' UTR
ENV1/ENV2	5' UTR
ENV-FLAPf /ENV-FLAP r	5' UTR
UG52 FLAP/UC53 FLAP	5' UTR
ENV-FLAP f /HEV-C-9	5' UTR
AN89/AN88	VP1
ENV-FLAP f /HEV-C-11	5' UTR
UG52	5' UTR

/HEV-C-11	
TS1 /HEV-C-11	5' UTR
TS2/1200R	5'UTR-VP4
HEVB6/1200R	5'UTR-VP4
HEV-C-8 /HEV-C-9	5' UTR

Πίνακας 5: Παρουσιάζονται τα ζεύγη των primers οι οποίοι είχαν, βάσει των πειραμάτων την μεγαλύτερη και ισχυρότερη ικανότητα πρόσδεσης με τους περισσότερους οροτύπους των ιών Coxsackie A

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των πειραμάτων προκύπτει ένα ζεύγος εκκινητών να παρουσιάζει ειδικότητα μόνο για τους Coxsackie A ιούς. Το ζεύγος HEV-C-10/1200R το οποίο ενισχύει την περιοχή 5'UTR-VP4, υβριδίζεται μόνο με συγκεκριμένους ορότυπους Coxsackie A (CAV15, CAV17, CAV20,CAV21) και με κανένα άλλο ιό από αυτούς που χρησιμοποιήσαμε ως αρνητικό control (Coxsackie B1, Sabin1,2,3 και Echo13). Αυτό το ζεύγος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των Coxsackie A λόγω της ειδικότητας που παρουσιάζει. Οι εκκινητές οι οποίοι δεν εφαρμόστηκαν στους ιούς Coxsackie B, Sabin και Echo θα πρέπει να ελεγχθούν με σκοπό να ταυτοποιηθούν primers οι οποίοι ανιχνεύουν μόνο Coxsackie A.

Μετά την ομαδοποίηση των αποτελεσμάτων και την σχηματική απεικόνιση μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι ισχυρότερη σύνδεση με τους περισσότερους ορότυπους Coxsackie A ιών παρουσιάζουν οι εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν στην 5'-UTR καθώς η περιοχή αυτή είναι σχετικά συντηρημένη λόγω των δευτεροταγών δομών τις οποίες φέρει.

Αντίθετα η περιοχή του καψιδιού είναι αρκετά ευμετάβλητη καθώς αυτή καθορίζει τους διαφορετικούς οροτύπους και φέρει τις αντιγονικές θέσεις οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων.

Η ανωτέρω εργασία μέσω της δημιουργίας PCR μικροσυστοιχειών είναι ένα πρώτο βήμα για την μοριακή ανίχνευση και γενωμική ανάλυση των ιών Coxsackie A.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) **A comparative amplification of five different genomic regions on Coxsackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics.** Eugenia Bolanaki, Christine Kottaridi, Panayotis Markoulatos, Lucas Margaritis, Thodoros Katsorchis. *Molecular and Cellular Probes* 19 (2005)127-135.
- 2) **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- 3) **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly:structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. *Protein Sci.* 3:1651-1669.
- 4) **Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin. 1998.** Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
- 5) **Colonna RJ, Contra JH, Mizutani S, et al.** Evidence for the direct involvement of the rhinovirus canyon in receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5449
- 6) **Colston EM, Racaniello VR.** Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* 1995;69:4823
- 7) **Complete Genomic Sequencing Shows that Polioviruses and Members of Human Enterovirus Species C Are Closely Related in the Noncapsid**

Coding Region. Betty Brown, M. Steven Oberste, Kaija Maher, and Mark a. Pallansh. Aug. 2003

- 8) **Devaney MA, Vakharia VN, Lloyd RE, et al.** Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the capsid binding protein complex. *J Virol* 1988;62:4407
- 9) **Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses.** Mark Pallansh, Raymond Roos.2007
- 10) **Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis.** Nidia H De Jesus. 10 July 2007
- 11) **Fox G, Parry NR, Barnett PV, et al.** The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* 1989;70:625
- 12) **Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al.** Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* 1995;214:559
- 13) **Health.howstuffworks.com/medicine/modern/light-virus.** Jacob Silverman
- 14) **Hogle, J. M., 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- 15) **Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism.** J. Lindsay Whitton, Christopher T. Cornell & Ralph Feuer. *Nature Reviews Microbiology* 3, 765-776 (October 2005).doi:10.1038/nrmicro1284
- 16) **Hughes PJ, Horsnell C, Hyypia T, et all.** The coxsackievirus A9 RGD motif is not essential for virus viability. *J Virol* 1995;69:8035

- 17) Hyypia, T., T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway. 1997.** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1-11.
- 18) Jackson T, Clark S, Berryman S, et al.** Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparin sulfate. *J Virol* 1996;70:5282
- 19) Joachims M, Van Breugel PC, Lloyd RE.** Cleavage of poly(A)-binding protein by enterovirus proteases concurrent with inhibition of translation in vitro. *J Virology* 1999;73:718
- 20) Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, et al.** Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shutoff? *J Virology* 1999;73:709
- 21) Kirchweger R, Ziegler E, Lamphear BJ, et al.** Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* 1994;68:11705
- 22) Klein M, Hadaschik D, Zimmermann H, et al.** The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. *J Gen Virol* 2000;81:895
- 23) Krausslich H. G., C. Holscher, Q. Reuer, J. Harber, and E. Wimmer. 1990.** Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity. *J. Virol.* 64:2433-2436.
- 24) Kuyumcu-Martinez NM, Joachims M, Lloyd RE.** Efficient cleavage of ribosome-associated poly(A)-binding protein by enterovirus 3C protease. *J Virology* 2002;76:2062
- 25) Loeffler F, Frosch P.** Report of the Commission for Research on foot-and-mouth disease. In: Hahon N, ed Selected Papers on Virology. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1964:64

- 26) Mason PW, Rieder E, Baxt B.** RGD sequence of foot-mouth-disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:1932
- 27) Moffat K, Howell G, Knox C et al.** Effects of foot-and-mouth disease virus nonstructural proteins on the structure and function of the early secretory pathway: 2BC but not 3A blocks endoplasmic reticulum-to-Golgi transport. J Virol 2005;79:4382
- 28) Molecular Evolution of the Human Enteroviruses: Correlation of Serotype with VP1 Sequence and Application to Picornavirus Classification.** M. Steven Oberste, Kaija Maher, David R. Kilpatrick and Mark A. Pallansch. Journal of Virology.p 1941-1948. Mar. 1999
- 29) Molecular Classification of Coxsackie A Viruses on the Basis of the 5'-UTR Structural and Evolutionary Aspects.** Nikolaos Siafakis, Panayotis Markoulatos, Glyn Stanway.2002
- 30) Moscufo N, Chow M.** Myristate-protein interactions in poliovirus: interaction of VP4 Threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. J Virol 1992;66:6849
- 31) Nucleotide Analysis and Phylogenetic Study of the Homology Boundaries of Coxsackie A and B Viruses.** Eugenia Bolanaki, Christine Kottaridi, Panayotis Markoulatos, Lukas Margaritis & Theodoros Katsorichis. Virus Genes 31:3 307-320.2005
- 32) Nunez JI, Baranowski E, Molina N, et al.** A simple amino acid substitution in nonstructural protein 3A can mediate adaptation of foot-and-mouth disease virus to the guinea pig. J Virol 2001;75:3977

- 33) **Perez L, Carrasco L.** Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol* 1993;67:4543
- 34) **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999.** Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.
- 35) **Picornaviridae: The Viruses and their Replication.** Vincent R. Racaniello.2007
- 36) **Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease.** Philip D. Minor. *Nature Reviews Microbiology* 2,473-482 (June 2004)
doi:10.1038/nrmicro906
- 37) **Rose JK, Trachsel H, Leong K, et al.** Inhibition of translathion by poliovirus: inactivation of a specific initiation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978;75:2732
- 38) **Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587
- 39) **Rossmann MG, Arnold E, Erickson JW, et al.** Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature* 1985;317:145
- 40) **Ryan MD, Drew J.** Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *EMBO J* 1994;13:928
- 41) **Simmonds P, Welch J.** Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol* 2006;80:483
- 42) **Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993.** Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.

- 43) Van Vlijmen HW, Curry S, Schaefer M, et al.** Titration calculation of foot-mouth-disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* 1998;275:295
- 44) Williams CH, Kajander T, Hyypia T, et al.** Integrin alpha v beta 6 is an RGD-dependent receptor for coxsackievirus A9. *J Virol* 2004;78:6967
- 45) Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- 46) Xiao C, Bator-Kelly CM, Rieder E, et al.** The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure* 2005;13:1019