



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ
ΜΕ ΑΣΗΠΤΕΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΕΣ**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΔΑΣΤΑΜΑΝΗ ΜΕΤΑΞΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ, 2011

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας
με έμφαση στη Βιοτεχνολογία
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ:

Ειδικό Ερευνητικό και Διδακτικό Προσωπικό (ΕΕΔΙΠ)
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Β. ΠΛΙΑΚΑ:

Διδάσκουσα ΠΔ 407/80
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από τον Οκτώβριο του 2010 έως τον Μάιο του 2011.

Αρχικά, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ, στον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Μαρκουλάτο τόσο για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας όσο και για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της.

Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ Πλιάκα Βάια για την καθοδήγηση και την βοήθεια κατά την διάρκεια των πειραμάτων, την συμπαράσταση σε όποιες δυσκολίες παρουσιάστηκαν κατά την τέλεση τους καθώς και για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή. Ακόμη ένα θερμό ευχαριστώ στην Δρ Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα για τη συμμετοχή της στην τριμελή επιτροπή, τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθειά της.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Μικροβιολογίας – Ιολογίας: Γκορτζίλα Πασχάλη, Δαρμή Φραγκίσκο, Δημητρίου Τηλέμαχο, Καραγιάννη Άννα, Μπλέτσα Μάγδα, Παπαδή Γωγώ, Ρούτερ Ειρήνη, Τόσκα Ελένη και Τσακογιάννη Δημήτρη, τόσο για την βοήθεια και συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae και οι ανθρώπινοι εντεροϊοί χωρίζονται σε τέσσερα είδη (HEV A-D). Πρόκειται για μικρούς ιούς με ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας το οποίο περικλείεται από ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γένωμα των εντεροϊών έχει μήκος 7.500 βάσεις περίπου και αποτελείται από τρεις διακριτές περιοχές: την 5' αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), την κωδική περιοχή (ORF), και την 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR). Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού. Συγκεκριμένα, εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στο λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος. Ακολουθεί μικρού βαθμού αιμία η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επινέμηση των διαφόρων οργάνων-στόχων από τον ιό, όπως την καρδιά, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, το δέρμα και τους βλεννογόνους. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του στα διάφορα όργανα, ο ιός εισέρχεται πάλι στην κυκλοφορία. Η δεύτερη μεγάλου βαθμού αιμία έχει συχνά ως αποτέλεσμα την είσοδο του ιού στο ΚΝΣ. Γενικά, οι εντεροϊοί μολύνουν συχνά το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) και προκαλούν νευρολογικές ασθένειες όπως είναι η άσηπτη μηνιγγίτιδα.

Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν 51 δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY) ασθενών με πιθανή άσηπτη μηνιγγίτιδα προκειμένου να διαπιστωθεί η παρουσία κάποιου εντεροϊού. Με την τεχνική της RT-PCR διαπιστώθηκε η παρουσία εντεροϊών σε 8 από τα 51 δείγματα ενισχύοντας μία περιοχή της 5' UTR η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών. Στη συνέχεια, ακολούθησε κλωνοποίηση και αλληλούχιση δύο δειγμάτων (ενδεικτικά) και μετά από ανάλυση βρέθηκε ότι η αλληλουχία τους παρουσιάζει ομολογία με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2. Τέλος, συγκρίθηκαν οι αλληλουχίες των δύο δειγμάτων με την πρότυπη αλληλουχία του προτύπου στελέχους Sabin 2 και εντοπίστηκαν νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις.

Αναμφίβολα τα αποτελέσματά μας προκαλούν ενδιαφέρον καθώς σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις κάποιος πολιοϊός ευθύνεται για την εκδήλωση άσηπτης μηνιγγίτιδας. Ωστόσο δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για την σύνδεση αυτή καθώς όλοι οι εντεροϊοί συγκλίνουν στην 5' αμετάφραστη περιοχή η οποία και γι' αυτό το λόγο προσφέρεται για ανίχνευση εντεροϊών αλλά όχι για ταυτοποίηση οροτύπου. Επιπλέον, οι νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις οι οποίες εντοπίστηκαν δεν έχουν βρεθεί μέχρι στιγμής σε νευρομολυσματικά στελέχη πολιοϊών αν και υπήρχε μία κοινή μετάλλαξη και στα δύο δείγματα στη θέση 362. Για τον λόγο αυτό επιβάλλεται στο μέλλον η ενίσχυση και αλληλούχιση των θετικών αυτών δειγμάτων σε όλο το γονιδίωμα τους ή τουλάχιστον στην κωδική περιοχή (VP1, VP2, VP3 και VP4) προκειμένου να διαπιστωθεί ακριβώς ο ορότυπος αυτών των ιών και να διερευνηθούν τυχόν μεταλλάξεις καθώς και γεγονότα ανασυνδυασμού.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Η ασθένεια της μηνιγγίτιδας	2
1.2	Ταξινόμηση των εντεροϊών	4
1.3	Δομή των εντεροϊών	5
1.3.1	Δομή του καψιδίου	5
1.3.2	Η οργάνωση του ιϊκού γενώματος	7
1.4	Υποδοχείς των εντεροϊών	9
1.5	Κύκλος ζωής των εντεροϊών	11
1.5.1	Είσοδος στο κύτταρο ξενιστή	12
1.5.2	Μετάφραση και πρωτεολυτική επεξεργασία	13
1.5.3	Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος	15
1.5.4	Καψιδίωση και απελευθέρωση ιϊκών σωματιδίων	17
1.6	Πορεία εισόδου εντεροϊών στο ΚΝΣ	18
1.7	Εντεροϊοί και αυτοφαγία	20
1.8	Επαγωγή του τερματισμού της μετάφρασης στο κύτταρο ξενιστή	21
1.9	Μοριακές παραλλαγές ή quaspecies των εντεροϊών	22
1.10	Τροπισμός εντεροϊών	23
1.11	Ανοσοαποκρίσεις κατά των εντεροϊών	26
1.12	Εμμένουσα λοίμωξη των εντεροϊών	26
1.13	Επιδημιολογία	27
1.14	Απομόνωση εντεροϊών	27
1.15	Κλινικοεργαστηριακά ευρήματα	28
1.15.1	Κλινική εικόνα	28
1.15.2	Εργαστηριακά ευρήματα	29
1.16	Εργαστηριακή διάγνωση	31
1.17	Εξέλιξη των εντεροϊών	31
1.17.1	Μεταλλάξεις	32
1.17.2	Ανασυνδυασμός	33
1.18	Εμβολιοσυνδεόμενα νευρομολυσματικά στελέχη	35
1.19	Στόχος εργασίας	38
2.	ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	39
2.1	Δείγματα	39
2.1.1	Πρότυπα δείγματα	39
2.1.2	Κλινικά δείγματα	39
2.2	Εκχύλιση RNA	42
2.3	Εκκινητικά μόρια	43
2.4	Αντίστροφη μεταγραφή	44
2.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	45
2.5.1	PCR	45
2.5.2	Autonested PCR	48
2.6	Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR	49
2.7	Καθαρισμός προϊόντων PCR	49
2.8	Μοριακή κλωνοποίηση προϊόντων PCR	50
2.9	Αλληλούχιση	54
2.10	Ανάλυση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	54

3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	55
3.1	Αποτελέσματα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης	55
3.2	Αποτελέσματα ανάλυσης νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	56
3.3	Εντοπισμός μεταλλάξεων στην 5' περιοχή του ιϊκού γενώματος	59
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	62
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	65

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ιστορία της μηνιγγίτιδας ξεκινάει από την αρχαία Ελλάδα με τον Ιπποκράτη τον «πατέρα της Ιατρικής». Πιστεύεται πως γύρω στο 460πΧ-370πΧ ο Ιπποκράτης αναγνώρισε την ύπαρξη αυτής της ασθένειας. Η περιγραφή της μηνιγγίτιδας που τότε ονομαζόταν «οίδημα στον εγκέφαλο», αποδίδεται συχνά στο γιατρό Sir Robert Whytt το 1768, αν και η σύνδεση της ασθένειας με το παθογόνο που την προκαλεί έγινε τον επόμενο αιώνα. Η αναγνώριση ότι οι ιοί μπορεί να προκαλέσουν μηνιγγίτιδα είναι μια σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη (Wallgren 1925). Στις αρχές αυτού του αιώνα, η φλεγμονή των μηνίγγων αποδιδόταν στην παραλυτική πολιομυελίτιδα και στην επιδημική παρωτίτιδα. Τελικά, στη δεκαετία του 1930 απομονώθηκαν ιοί από το ΚΝΣ των ασθενών με άσηπτη μηνιγγίτιδα (ιός της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας) (Rivers and Scott 1936). Αργότερα το 1949, ο ιός Coxsackie ήταν ο πρώτος εντεροϊός που σχετίστηκε με περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας από τον Melnick και τους συνεργάτες του, με τον εντεροϊό 70 να ακολουθεί το 1974 (Schmidt et al., 1974).

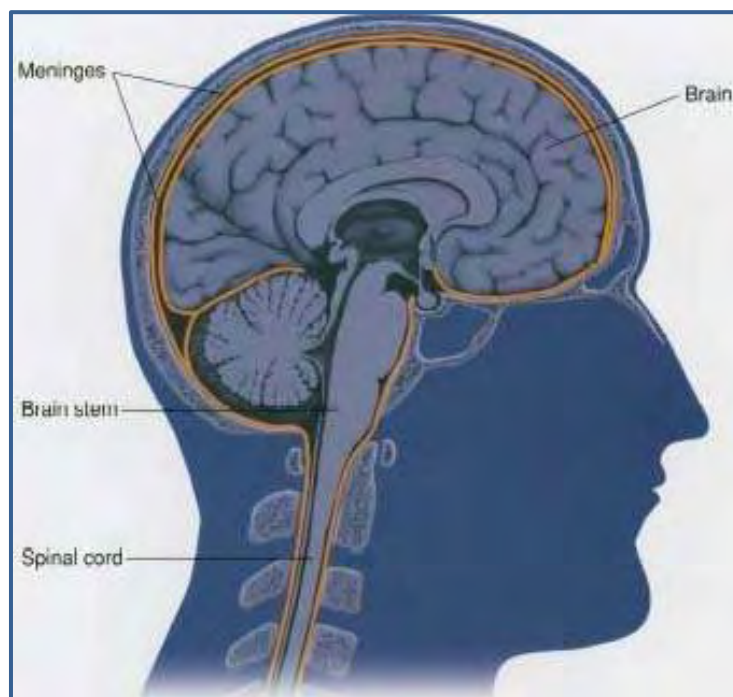
Οι περισσότερες περιπτώσεις μηνιγγίτιδας οφείλονται σε ιογενή λοίμωξη, με τα βακτήρια, τους μύκητες και τα παράσιτα να αποτελούν τα επόμενα σε συχνότητα αίτια. Στους ιούς που μπορούν να προκαλέσουν άσηπτη μηνιγγίτιδα περιλαμβάνονται πλέον οι εντεροϊοί, οι ιοί του απλού έρπητα τύπου 2 (και λιγότερο συχνά τύπου 1), ο ιός της ανεμευλογιάς - έρπητα ζωστήρα, ο ιός της παρωτίτιδας, ο HIV και ο ιός της λεμφοκυτταρικής χοριομηνιγγίτιδας κ.α. Ωστόσο οι εντεροϊοί αποτελούν τη πιο κοινή αναγνωρίσιμη αιτία πρόκλησης άσηπτης μηνιγγίτιδας καθώς ευθύνονται για το 75-90% των περιπτώσεων.

Το γένος των εντεροϊών αποτελεί μέλος της οικογένειας των Picorna ιών. Η οικογένεια των Picorna ιών όπως υποδηλώνει και το όνομά της (μικρός+RNA) αποτελεί μία μεγάλη οικογένεια μικρών RNA ιών θετικής πολικότητας. Αυτοί οι μικροί ιοί έχουν διάμετρο περίπου 30nm και δε διαθέτουν έλυτρο αλλά ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Στο γένος των εντεροϊών μπορούμε να διακρίνουμε τους πολιοϊούς, τους εντεροϊούς, τους Coxsackie και τους Echo ιούς. Οι echo ιοί αποτελούν τη συνηθέστερη αιτία εμφάνισης άσηπτης μηνιγγίτιδας με τους coxsackie ιούς να ακολουθούν. Νευρομολυσματικά στελέχη πολιοϊών έχουν συσχετιστεί με μη παραλυτικές πολιομυελίτιδες αλλά η συχνότητα εμφάνισης τους σε άσηπτες μηνιγγίτιδες είναι πολύ μικρή. Μέχρι στιγμής, έχουν αναγνωριστεί περίπου 68 ορότυποι εντεροϊών που σχετίζονται με μολύνσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος και ορισμένοι είναι

περισσότερο νευροτρόποι από άλλους, όπως οι ιοί Echo 7,9,11 και 30, ο ιός Coxsackie B5 και ο εντεροϊός71.

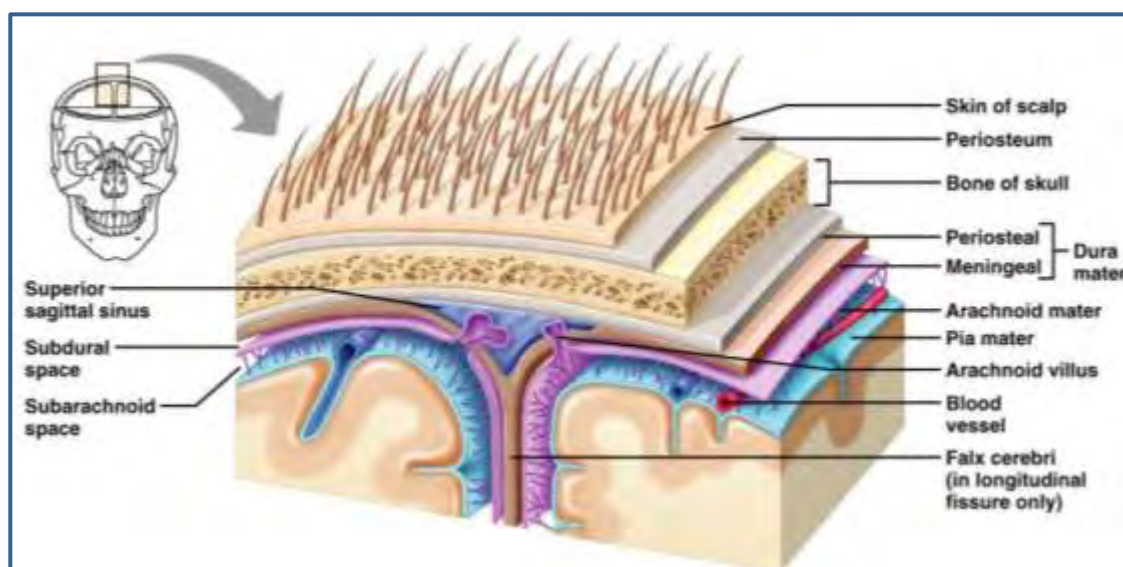
1.1 Η ΑΣΘΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΜΗΝΙΓΓΙΤΙΔΑΣ

Ως μηνιγγίτιδα περιγράφεται η φλεγμονή των προστατευτικών μεμβρανών που περιβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και συνολικά είναι γνωστές ως μήνιγγες (εικόνα 1.1). Οι μήνιγγες περιλαμβάνουν τρεις μεμβράνες που, μαζί με το εγκεφαλονωτιαίο υγρό, περικλείουν και προστατεύουν τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό (το κεντρικό νευρικό σύστημα). Η χοριοειδής μήνιγγα είναι μία λεπτή, αδιαπέραστη μεμβράνη, η οποία βρίσκεται σε άμεση επαφή με την επιφάνεια του εγκεφάλου, ακολουθώντας το ακριβές περίγραμμα των ελίκων του. Η αραχνοειδής μήνιγγα (που ονομάστηκε έτσι λόγω της ομοιότητας της με ιστό αράχνης) είναι ένας χαλαρός θύλακας πάνω από τη χοριοειδή μήνιγγα. Ο υπαραχνοειδής χώρος διαχωρίζει την αραχνοειδή και τη χοριοειδή μήνιγγα και περιέχει το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η εξωτερική μεμβράνη, η σκληρά μήνιγγα, είναι μία παχεία, ανθεκτική μεμβράνη, που προσφύεται τόσο στην αραχνοειδή μήνιγγα όσο και στο κρανίο (εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.1: Δομή εγκεφάλου, οβελιαία τομή.

Όπως αναφέρθηκε, η μηνιγγίτιδα μπορεί να οφείλεται σε βακτήρια, παράσιτα, μη λοιμώδη αίτια και σε ιούς που εμφανίζονται πιο συχνά. Γενικά, εμφανίζονται δύο μεγάλες κατηγορίες μηνιγγίτιδας, οι άσηπτες και οι μικροβιακές. Πρέπει να διευκρινιστεί πως ο όρος άσηπτη μηνιγγίτιδα αναφέρεται άτυπα σε όλες τις περιπτώσεις μηνιγγίτιδας που δεν μπορεί να αποδειχθεί μικροβιακή λοίμωξη. Αυτή συνήθως οφείλεται σε ιούς, αλλά μπορεί και να οφείλεται σε μικροβιακή λοίμωξη που έχει ήδη μερικώς αντιμετωπιστεί, με εξάλειψη των μικροβίων από τις μήνιγγες, ή σε λοίμωξη σε παρακείμενη στις μήνιγγες περιοχή. Ωστόσο, συχνά χρησιμοποιείται αντικαθιστώντας τον όρο ιογενή μηνιγγίτιδα (μηνιγγίτιδα προκαλούμενη αποκλειστικά από ιούς) καθώς σχεδόν όλες οι περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας οφείλονται σε ιούς.



Εικόνα 1.2: Διάταξη των μεμβρανών των μηνίγγων.

Στη συγκεκριμένη εργασία ασχοληθήκαμε με τη συσχέτιση των εντεροϊών με άσηπτες μηνιγγίτιδες. Προκειμένου να κατανοήσουμε τη σχέση των εντεροϊών με μια λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) κρίνεται απαραίτητη η παρουσίαση της μοριακής βιολογίας και του τρόπου δράσης των εντεροϊών.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι Picorna ιοί όπως φαίνεται στον πίνακα 1.1 διαχωρίζονται σε 9 γένη με βάση ομοιότητες στις φυσικές ιδιότητες του ιοσωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας και της οργάνωσης του γονιδιώματος. Κάθε γένος αποτελείται από διακριτά ως προς την αντιγονικότητα στελέχη και μέχρι πρόσφατα έχουν αναγνωρισθεί περίπου 230 ορότυποι Picorna ιών.

Οικογένεια	Γένος
Picornaviridae	Arthovirus
	Cardiovirus
	Enterovirus
	Erbovirus
	Hepatovirus
	Kobuvirus
	Parechovirus
	Rhinovirus
	Teschovirus

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας Picornaviridae.

Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί περισσότεροι από 80 ορότυποι εντεροϊών. Σύμφωνα με το πιο σύγχρονο μοντέλο ταξινόμησης οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ταξινομούνται ως εξής:

- **Είδος A (HEV A) :**

Coxsackie ιοί (CV): A1-A8, A10, A12, A14, A16

Εντεροϊοί: EV71, EV76, EV89-EV91

- **Είδος B (HEVB):**

Coxsackie ιοί (CV): B1-B6, A9

Echo ιοί: E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33

Εντεροϊοί: EV69, EV73-EV75, EV77-EV88, EV93, EV97, EV98, EV100, EV101, EV106, EV107

- **Είδος C (HEVC):**

Πολιοϊοί: PV1-PV3

Coxsackie ιοί: A1, A11, A13, A17, A19-A22, A24

Εντεροϊοί: EV95, EV96, EV99, EV102, EV104, EV105

- **Είδος D (HEVD):**

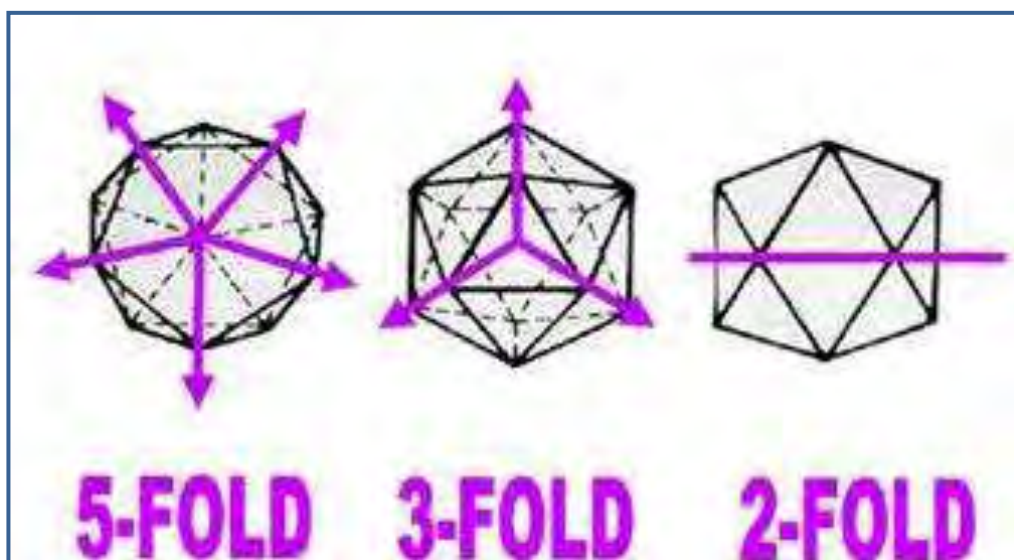
Εντεροϊοί: EV68, EV70, EV94

1.3 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.3.1 Δομή του καψιδίου

Τα ιϊκά σωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά διαμέτρου περίπου 30 nm και περιβάλλονται από καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Τα συνηθισμένα εικοσαέδρα έχουν επιφάνειες που αποτελούνται από ισόπλευρα τρίγωνα (εικόνα 1.3.). Για την κατασκευή ενός εικοσαέδρου οι κανόνες βασίζονται στη περιστρεφόμενη συμμετρία, η οποία έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

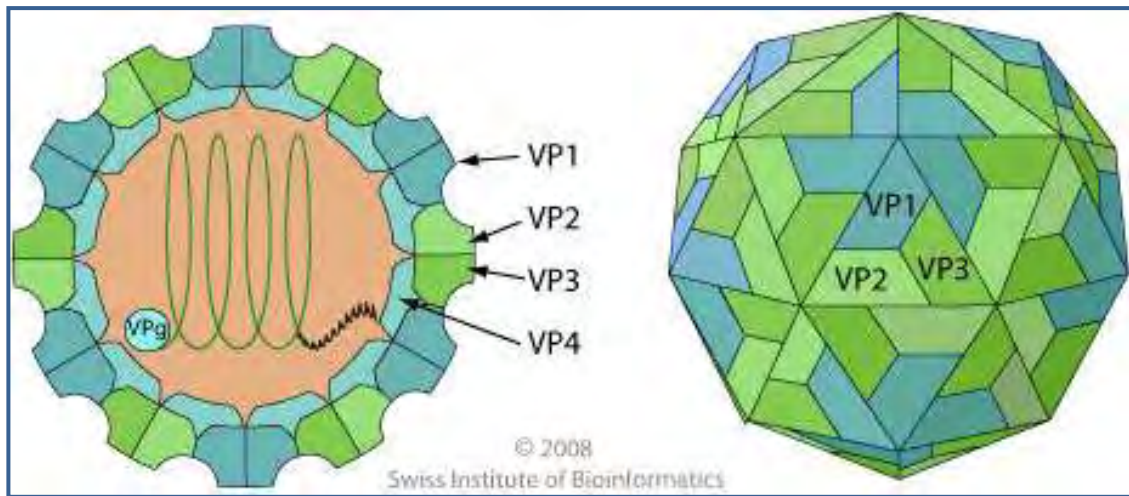
- Ένας άξονας της δίπλευρης περιστρεφόμενης συμμετρίας κατά μήκος του κέντρου της κάθε πλευράς
- Ένας άξονας της τρίπλευρης συμμετρίας κατά μήκος του κέντρου της κάθε επιφάνειας
- Ένας άξονας της πεντάπλευρης περιστρεφόμενης συμμετρίας κατά μήκος του κέντρου της κάθε γωνίας



Εικόνα.1.3: Οι τρεις άξονες συμμετρίας ενός συνηθισμένου εικοσαέδρου.

Το καψίδιο των εντεροϊών αποτελείται από 60 αντίγραφα καθεμίας από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 οι οποίες αποτελούν προϊόντα πρωτεόλυσης της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Pfister et al., 1999). Κατά την πρωτεόλυση η πρόδρομος πρωτεΐνη P1 των δομικών πρωτεϊνών διαχωρίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3, VP1). Έπειτα τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)₅]. Τέλος, δώδεκα από τα πενταμερή αυτά συναρμολογούνται έτσι ώστε να

σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3,VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA πακετάρεται στα ιϊκά σωματίδια, πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2. Το ιϊκό σωματίδιο είναι πλέον ώριμο και παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα. Όσον αφορά το σχηματισμό των τριών αξόνων συμμετρίας πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου (εικόνα 1.4) (Blondel et al., 1998).



Εικόνα 1.4: Παρουσίαση της οργάνωσης του καψιδίου ενός εντεροϊού.

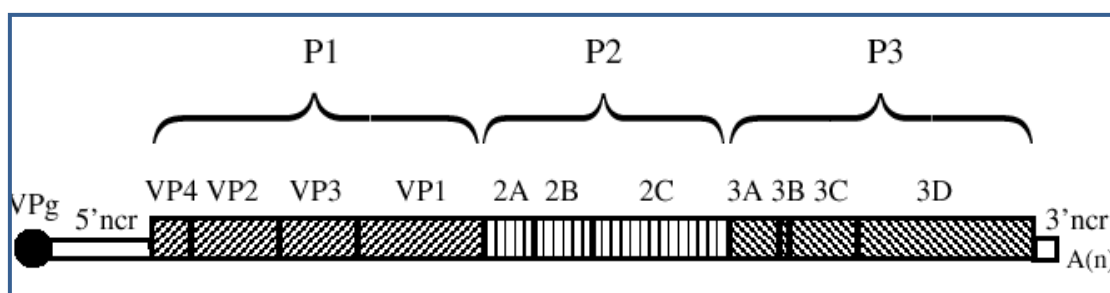
Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Αυτές οι περιοχές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων, παρέχοντας έτσι το ρόλο της αντιγονικής ποικιλίας στους εντεροϊούς (Minor et al., 1986).

Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4. Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδιακή πρωτεΐνη και βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ. Γενικά, η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις. Μια βαθιά αυλάκωση η λεγόμενη canyon, η οποία διαμορφώνεται στην σύνδεση της VP1 με την VP3 και περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας, είναι ιδιαίτερα σημαντική για τρεις κυρίως λόγους. Πρώτον, φέρει στο εσωτερικό της, κατάλληλες περιοχές που μπορούν να συνδεθούν με υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή και έτσι μπορεί ο ιός να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Blondel et al., 1998). Δεύτερον, λόγω του

μικρού της μεγέθους, δεν επιτρέπει την αναγνώριση των εσωτερικών περιοχών της από τα ογκώδη αντισώματα και έτσι προσφέρει στον ιό μια στρατηγική για την αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης από τον ξενιστή (Stanway, 1990).

1.3.2 Οργάνωση του ιϊκού γενώματος

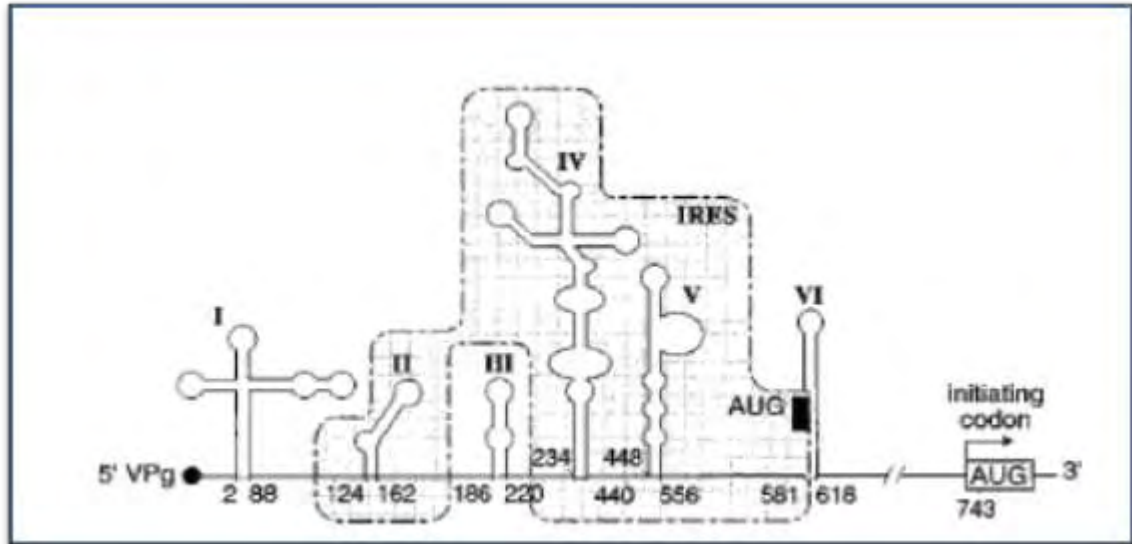
Το γένωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας το μήκος του οποίου είναι περίπου 7.500 νουκλεοτίδια. Το ιϊκό αυτό RNA είναι μολυσματικό καθώς αμέσως μετά την είσοδο του στο κύτταρο υπόκειται σε μετάφραση και παράγει όλες εκείνες τις ιϊκές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του ιού. Στο γένωμα του ιού διακρίνουμε τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR) που αποτελεί το 10-12% του ιϊκού γενώματος και έχει μήκος περίπου 750 νουκλεοτίδια, το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης και την 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR).



Εικόνα 1.5: Οργάνωση του ιϊκού γενώματος των εντεροϊών.

Στο άκρο της 5' μη κωδικής περιοχής αντί της συνηθισμένης μεθυλιωμένης καλύπτρας είναι προσδεσμένη μια μικρή ιϊκή πρωτεΐνη, η λεγόμενη VPg. Αναλυτικότερα η σύνδεση αυτή επιτυγχάνεται με το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 5'-τελικής μονοφωσφορικής ομάδας του ιϊκού γενώματος με το τελικό νουκλεοτίδιο ουρακίλης του RNA και με ένα κατάλοιπο τυροσίνης της ιϊκής πρωτεΐνης VPg (Wimmer et al. 1993). Γενικά, η 5' αμετάφραστη περιοχή διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της αντιγραφής και της μετάφρασης καθώς περιέχει συντηρημένα τμήματα δευτεροταγών δομών. Συγκεκριμένα παίζει ρόλο στον εγκλεισμό του ιού στο καψίδιο καθώς και στον πολλαπλασιασμό του. Η 5' περιοχή των εντεροϊών αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία και διαιρείται σε τρία επιμέρους τμήματα (φουρκέτες): την περιοχή cloverleaf (domain I), την περιοχή IRES (Internal Ribosomal Entry Site-Εσωτερική Θέση Πρόσδεσης του Ριβοσώματος) και την περιοχή που περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης. Η δομή σχήματος τριφυλλιού cloverleaf (domain I) είναι ένα γενετικό στοιχείο με cis-δραστικότητα και εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής

πολικότητας. Το IRES είναι ένα στοιχείο με *cis*-δραστικότητα, περιλαμβάνει διακριτές περιοχές (domain II-VI) και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της μετάφρασης. Αυτό συμβαίνει καθώς το ριβόσωμα προσδένεται απευθείας σε αυτή την εσωτερική περιοχή του γενώματος του ιού και ξεκινάει τη μετάφραση.



Εικόνα 1.6: Διάγραμμα της δευτεροταγούς δομής της 5'UTR των εντεροϊών.

Όσον αφορά τη λειτουργία του τελευταίου τμήματος της 5' μη κωδικής περιοχής η ακριβής λειτουργία του είναι υπό διερεύνηση. Ωστόσο είναι γνωστό πως σε αυτό περιέχεται το κωδικόνιο AUG υπεύθυνο για την έναρξη της μετάφρασης (Witwer et al., 2001).

Το mRNA των εντεροϊών κωδικοποιεί ένα μόνο μεγάλο πολυπεπτίδιο από το οποίο μέσω μιας διαδικασίας πρωτεολύσεως θα προκύψουν οι απαραίτητες πρωτεΐνες του ιού. Πιο συγκεκριμένα η κωδική περιοχή του ιϊκού RNA μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη μοριακού βάρους 247 kDa, η οποία αποτελείται από δύο κύριες περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Κατόπιν πρωτεολύσεως της πολυπρωτεΐνης θα προκύψουν τα πρόδρομα πολυπεπτίδια P1, P2 και P3. Η περιοχή P1 η οποία αντιστοιχεί στη δομική περιοχή του πολυπεπτιδίου κωδικοποιεί τα δομικά στοιχεία του καψιδίου, δηλαδή τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι περιοχές P2 και P3 που αντιστοιχούν στη λειτουργική περιοχή του πολυπεπτιδίου κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D και τα λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD).

Τέλος, η 3' μη κωδική περιοχή ποικίλει μεταξύ των μελών αυτής της οικογένειας. Σε αυτήν περιλαμβάνεται μία χαρακτηριστική RNA δευτεροταγή δομή θηλιάς, η οποία πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην αντιγραφή του ιϊκού γενώματος (Jacobson et al., 1993).

Στο τέλος αυτής της περιοχής υπάρχει μια πολύ αδενυλιωμένη ουρά μήκους περίπου 60 νουκλεοτιδίων, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο το ιϊκό RNA και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής και μετάφρασης του ιϊκού γενώματος (Fields Virology, 2007).

1.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μία μεγάλη ποικιλία υποδοχέων και μηχανισμών εισόδου προκειμένου να εισβάλουν στο κύτταρο ξενιστή. Ο υποδοχέας ICAM 1 (intracellular adhesion molecule 1) έχει βρεθεί ότι συνδέεται με τον Coxsackie A21 (Z-Xiao et al., 2001).

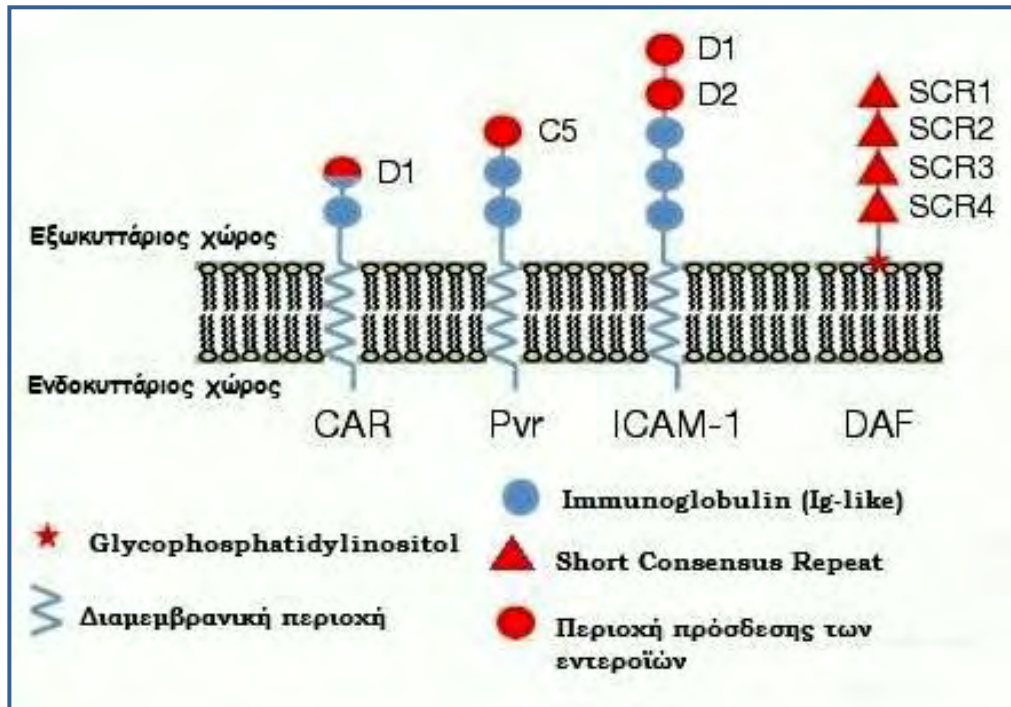
Οι ιοί CBV μπορούν να χρησιμοποιήσουν τόσο τον παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης, DAF (Human Decay Accelerating Factor) όσο και τον υποδοχέα CAR (Coxsackie-Adenovirus Receptor) για την είσοδο τους, ανάλογα με το κύτταρο στόχο.

Οι πολιοϊοί, σε αντίθεση με μερικούς εντεροϊούς οι οποίοι είναι ικανοί να χρησιμοποιούν πολλαπλούς υποδοχείς, χρησιμοποιούν μόνο έναν, τον CD155, ένα προσκολλώμενο μόριο γνωστό ως ανθρώπινος υποδοχέας πολιοϊών (hPVR). Σε ένα *in vitro* μοντέλο αιματο-εγκεφαλικού φραγμού, ο πολιοϊός βρέθηκε να εισέρχεται στα μικροαγγεία των ενδοθηλιακών κυττάρων του ανθρώπινου εγκεφάλου (hBMECs) με έναν caveolin + dynamin εξαρτώμενο τρόπο.

Ωστόσο, όταν χρησιμοποιήθηκαν κυτταρικές σειρές από κύτταρα που δεν ανήκουν στο ΚΝΣ, η είσοδος του πολιοϊού βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητη της caveolin. Και οι δύο έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως οι κινάσες τυροσίνης είναι απαραίτητες για την είσοδο. Αυτές οι μελέτες απεικονίζουν την σημαντικότητα του χαρακτηρισμού της εισόδου σε πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους του ΚΝΣ.

Αναμφισβήτητα, η έκφραση του υποδοχέα σε πιθανά κύτταρα στόχους καθορίζει τον πρώτο φραγμό στην είσοδο του ιού. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε μια σύνδεση μεταξύ της μειωμένης έκφρασης του CAR σε διαφοροποιημένους πρωτογενείς νευρώνες και της μείωσης της μόλυνσης από τον CVB3, προτείνοντας ότι η ευαισθησία στη μόλυνση μπορεί να ελαττωθεί καθώς μειώνεται το επίπεδο των υποδοχέων κατά τη διαδικασία της διαφοροποίησης. Αν και μερικοί υποδοχείς εντεροϊών μπορεί να εκφράζονται σε εύρος ιστών που συμπεριλαμβάνονται στο ΚΝΣ, πρόσθετοι κυτταρικοί καθοριστές μπορεί τελικά να ελέγχουν τον τροπισμό. Για παράδειγμα, η έκφραση του CAR είναι σχετικά εκτεταμένη στο ΚΝΣ νεογνού ποντικού και χρησιμοποιείται από τον αδενοϊό – ένα DNA ιό με σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον τροπισμό σε σχέση με τον CVB3. Μέχρι στιγμής, η

αρχική μόλυνση με CVB3 είναι περιορισμένη σε μεγάλο βαθμό στα πρόδρομα νευρικά και στα αρχέγονα κύτταρα (NPSCs) ή στα διηθούμενα μυελοειδή κύτταρα κατά την αρχική μόλυνση. Η πληθυσμιακή κατάσταση αυτών των κυττάρων ίσως να παρέχει ένα επιπλέον επίπεδο ευαισθησίας στην μόλυνση.



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση κυτταρικών υποδοχέων των εντεροϊών.

Μερικοί εντεροϊοί χρειάζονται και την ύπαρξη ενός συνυποδοχέα προκειμένου να συνδεθούν αποτελεσματικά στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται συγκεντρωτικά υποδοχείς και συνυποδοχείς (όπου χρειάζονται) των εντεροϊών.

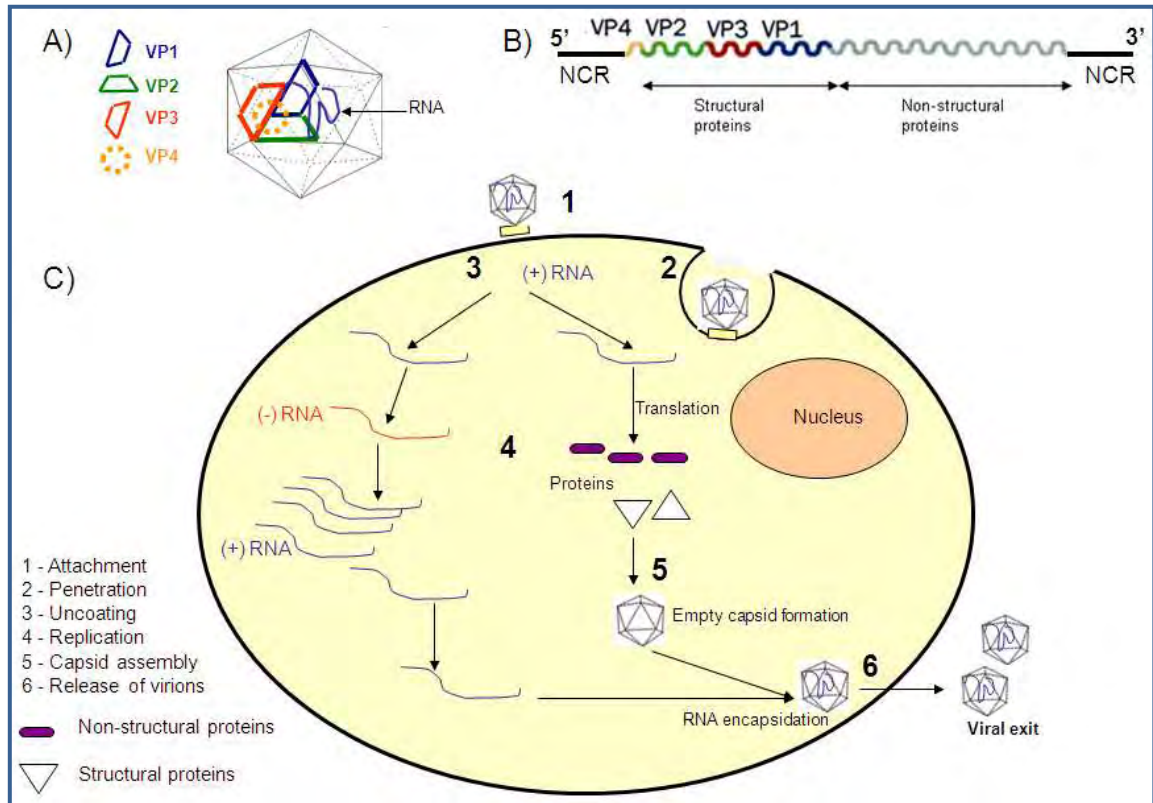
Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Coxsackie A13, A18,A21	PVR	Ig-like	
Enterovirus 70	Icam-1	Ig-like	
Coxsackie A21	CD55	SCR-like	Icam-1
Coxsackie B1, B3,B5	CD55	SCR-like	ανβ6-Integrin
Echo 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	CD55	SCR-like	β2-Microglobulin
Echo 1, 8	α2β1-Integrin	Integrin	β2-Microglobulin
Coxsackie B1-B6	CAR	Ig-like	

Πίνακας 1.2: Κυτταρικοί υποδοχείς εντεροϊών.

1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Τα κύρια στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών είναι κοινά με αυτά των υπολοίπων θετικής πολικότητας RNA ιών. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.8 διακρίνονται έξι βασικά στάδια:

1. Πρόσδεση του ιοσωματίου στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος στο κύτταρο ξενιστή με τη διαδικασία της ενδοκύττωσης.
2. Απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα.
3. Μετάφραση του ιϊκού RNA και παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών.
4. Αντιγραφή του ιϊκού RNA μέσω του κοινού μονοπατιού RNA(+) \rightarrow RNA(-) \rightarrow RNA (+) η οποία λαμβάνει χώρα σε ειδικές μεμβρανικές δομές του κυττάρου ξενιστή.
5. Διαδικασία ωρίμανσης των ιϊκών πρωτεϊνών και συναρμολόγηση των νέων ιοσωματίων.
6. Απελευθέρωση των νέων ιοσωματίων με λύση του κυττάρου ξενιστή.



Εικόνα 1.8: Απεικόνιση του κύκλου ζωής των εντεροϊών.

1.5.1 Είσοδος στο κύτταρο ξενιστή

Προκειμένου ο ιός να εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή πρέπει να συνδεθεί με τον υποδοχέα του (ή και τον συνυποδοχέα του). Στην προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκαν διάφορες κατηγορίες υποδοχέων των εντεροϊών. Οι περισσότεροι κυτταρικοί υποδοχείς συνδέονται με θέσεις αλληλεπίδρασης οι οποίες εντοπίζονται στις αύλακες των εντεροϊών. Συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP4 στη σχηματιζόμενη αύλακα (Rossmann, 1994) συνδέονται με υποδοχείς που έχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών (Rossmann, 1994). Μετά την πρόσδεση ακολουθούν αλλαγές στη δομή του καψιδίου προκειμένου να απελευθερωθεί το ιϊκό RNA στο κυτταρόπλασμα του κυτάρου ξενιστή. Σημειώνεται πως σε μερικές περιπτώσεις οι αλλαγές αυτές επάγονται από τον ίδιο τον υποδοχέα. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα.

1.5.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA και πρωτεολυτική επεξεργασία

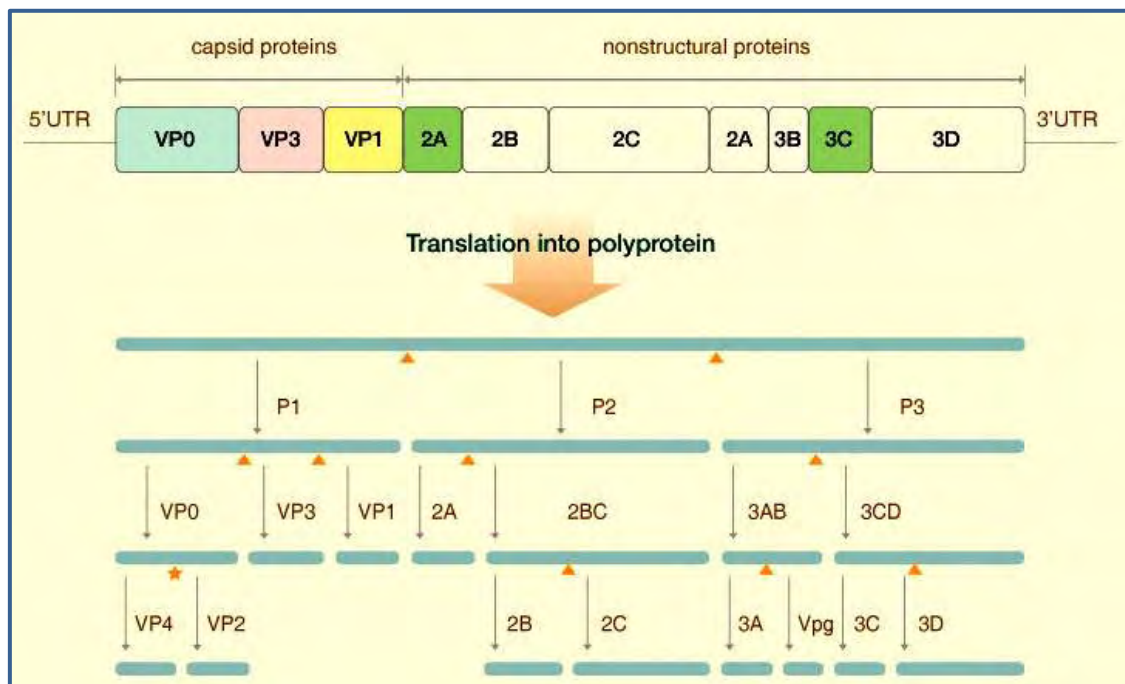
Το γένωμα των εντεροϊών είναι RNA θετικής πολικότητας και συνεπώς μεταφράζεται κατευθείαν μετά την απελευθέρωσή του στο κύτταρο ξενιστή. Το γένωμα των εντεροϊών δεν μπορεί να αναγνωρισθεί από τα ριβοσώματα κατά το συνήθη τρόπο καθώς φέρει την πρωτεΐνη VPg στο 5' άκρο αντί της καλύπτρας. Το πρώτο πράγμα που συμβαίνει μετά την απελευθέρωση του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα είναι η απομάκρυνση της VPg από το 5' άκρο του ιϊκού γενώματος από μια κυτταρική πρωτεάση και ακολουθεί η μετάφραση από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Κανονικά η μετάφραση των mRNAs ξεκινάει με την αναγνώριση της καλύπτρας στο 5' άκρο του mRNA από τα ριβοσώματα, τα οποία σαρώνουν κατά μήκος τη νουκλεοτιδική αλληλουχία μέχρι να φτάσουν σε ένα κωδικόνιο έναρξης AUG. Όμως το γένωμα των εντεροϊών δε μεταφράζεται κατ' αυτόν τον τρόπο καθώς το 5' άκρο του RNA δεν φέρει καλύπτρα αλλά την πρωτεΐνη VPg και ως εκ τούτου δεν μπορεί να αναγνωρισθεί από τα ριβοσώματα κατά το συνήθη τρόπο. Στα μολυσμένα από ιό κύτταρα, τα ριβοσώματα και συγκεκριμένα η 40S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στην περιοχή IRES και έτσι ξεκινά εσωτερικώς η μετάφραση.

Κατά την έναρξη της μετάφρασης στους εντεροϊούς, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα κατευθύνεται σε μία μικρή περιοχή του IRES, πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για την μετάφραση του ιϊκού RNA σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs) είναι απαραίτητοι, με μοναδική εξαίρεση τον παράγοντα eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδένεται στην καλύπτρα (cap). Στους εντεροϊούς η θέση πρόσδεσης των eIFs δεν είναι ακόμα γνωστή. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η πρόσδεσή τους γίνεται κυρίως στην περιοχή V του στοιχείου IRES καθώς κάθε μετάλλαξη που επηρεάζει τη δομή της καθιστά το IRES στοιχείο μη-λειτουργικό (Kerstin Ochs et al., 2002). Συνεπώς έχει προταθεί ότι κατά την μετάφραση του ιϊκού RNA, ο παράγοντας eIF4G1 αλληλεπιδρά απευθείας με το mRNA στην περιοχή IRES και κατόπιν συνδέεται με τον παράγοντα eIF4A προάγοντας την συναρμολόγηση του 48S συμπλόκου. Τελικά, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αφού προσδεθεί στο mRNA κινείται με κατεύθυνση 5'-3' κατά μήκος του ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Deborah Prevot et al., 2003).

Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο IRES στοιχείο των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν την μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιϊκού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί trans-acting παράγοντες (ITAFs), εκ των οποίων οι τέσσερις είναι πρωτεΐνες

πρόσδεσης στο RNA: PTB (polypyrimidine tract-binding protein), PCBP2 [poly(rC)-binding protein 2], το αυτοαντιγόνο La και η Uhr η οποία κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ανοδικά του N-ras. Τέλος, ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅, μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Kerstin Ochs et al., 2002; Oreda Boussadia et al., 2002).

Το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο μεταφράζεται ώστε να παράγει αρχικά μία 247 KDa πολυπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ιϊκές πρωτεάσες (2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro}) και έτσι προκύπτουν οι λειτουργικές ιϊκές πρωτεΐνες. Η πρωτεόλυση από τις 3C^{pro} και 3CD^{pro} συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly ενώ από την 2A^{pro} σε δεσμούς Tyr-Gly. Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης συμβαίνει σε τρία στάδια μόλις ολοκληρωθεί η μετάφραση. Αρχικά η 2A^{pro} πραγματοποιεί μία cis-διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο δικό της N-τελικό άκρο και οδηγεί στην απελευθέρωση της πρόδρομης πρωτεΐνης του καψιδίου P1. Το δεύτερο στάδιο είναι η απελευθέρωση της P3 από το πρόδρομο πολυπεπίδιο P2- P3. Αυτό πραγματοποιείται μέσω cis-διάσπασης από την 3CD^{pro}. Σε μία αλληλουχία γεγονότων trans-διάσπασης από την 3CD^{pro}, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ιϊκών σωματιδίων και γι' αυτό αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης (Pfister et al., 1999).



Εικόνα 1.9: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης των εντεροϊών. Τα τρίγωνα δείχνουν τα σημεία πρωτεόλυσης.

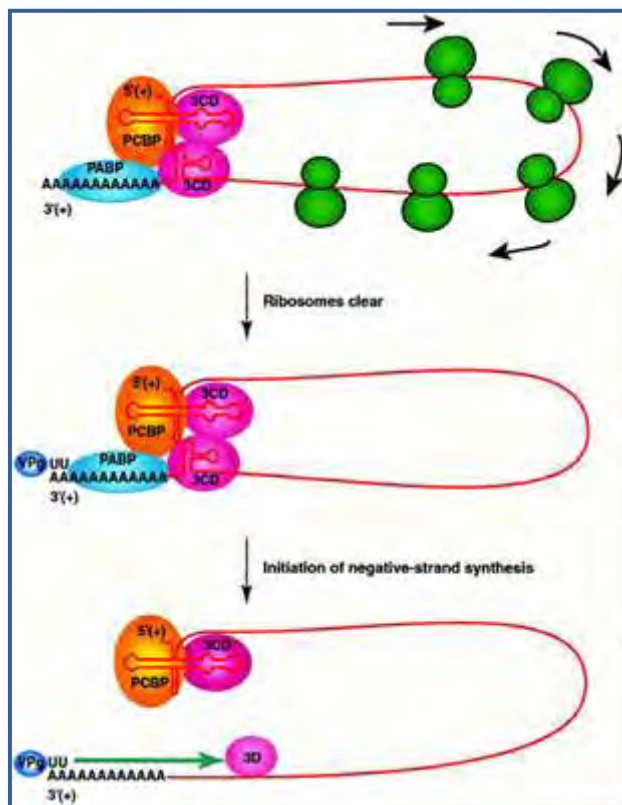
1.5.3 Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος

Η αντιγραφή του ιϊκού RNA προχωράει μέσω του ακόλουθου μονοπατιού: εισερχόμενο ιϊκό RNA(+)→σύνθεση RNA(-)→RF→ σύνθεση RNA(+)-RI→ RNA(+) όπου RF (replicative form) το οποίο είναι δίκλωνο RNA και RI σημαίνει (replicative intermediate) το οποίο είναι ένας κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+) (Wimmer et al., 1993). Στην ουσία η διαδικασία της αντιγραφής είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη και πραγματοποιείται στα μεμβρανικά κυστίδια του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου ξενιστή.

Κυρίαρχο ένζυμο αυτής της διαδικασίας είναι η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ($3D^{pol}$). Η $3D^{pol}$ η οποία εξαρτάται από την παρουσία ενός εκκινητικού μορίου και καταλύει τόσο τη σύνθεση των κλώνων RNA(-) όσο και τη σύνθεση των RNA(+). Εμφανίζει δύο τύπους καταλυτικής δραστηριότητας, καθώς από τη μια επιμηκύνει τους RNA κλώνους πάνω σε ένα κατάλληλο εκμαγείο και από την άλλη καταλύει την ουριδιλίωση της VPg (Paul et al., 1998). Η μικρή πρωτεΐνη VPg (3B) λειτουργεί ως εκκινητής αφού πρώτα ουριδιλιωθεί σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης ώστε να προκύψει η μορφή VPg-ρU- ρU, γεγονός το οποίο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύνθεσης τόσο του RNA(+) όσο και του RNA(-).

Σημαντική πρόοδος στην κατανόηση αυτής της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε με την ανακάλυψη μιας εσωτερικής δομής φουρκέτας στο RNA γνωστή ως *cre* (cis-replicating element). Αρχικά ανακαλύφθηκε στην VP1 κωδική περιοχή του HRV14 (human rhinovirus 14) και αργότερα βρέθηκε ότι στους πολιοϊούς το *cre* περιέχεται στην 2C κωδική περιοχή (Goodfellow et al., 2000; Goodfellow et al., 2003). Μετά την ανακάλυψη του *cre* γενετικού στοιχείου, αποδείχτηκε ότι μία συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXA}^{14}$ η οποία βρίσκεται στη θηλιά της φουρκέτας αντιπροσωπεύει το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg. Πιο συγκεκριμένα, η A-5 χρησιμοποιείται για την προσθήκη και των δύο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο -OH της τυροσίνης της VPg από την 3D^{pol} (Paul et al. 2003). Αυτή η αντίδραση ενισχύεται σημαντικά σε ένα *in vitro* σύστημα ουριδιλίωσης από την 3CD^{pro} , και πιθανόν εξαρτάται από αυτήν και *in vivo* (Murray et al., 2003). Πιστεύεται ότι η 3CD^{pro} παρέχει την απαραίτητη εξειδίκευση σε αυτήν την αντίδραση *in vivo*. Πρόσφατα έχει προταθεί ότι η *cre* εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στην σύνθεση του RNA(+) και όχι του RNA(-) (Morasco et al., 2003; Murray et al., 2003).

Παραδόξως, η ουριδιλίωση της VPg και η σύνθεση του RNA(-) απαιτούν ανέπαφη τη δομή cloverleaf του 5' άκρου του ιϊκού RNA (Lyons et al., 2001). Αυτή η άποψη υποστηρίζεται επίσης από τους Herold και Andino σύμφωνα με τους οποίους η 5' cloverleaf και η πολύ-A ουρά αλληλεπιδρούν κατά τη μετάβαση από τη μετάφραση στη σύνθεση του RNA(-), με αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του γενώματος. Η παρατήρησή τους ότι η 3CD^{pro} μπορεί να προσδεθεί στην κυτταρική πρωτεΐνη PABP (poly(A) binding protein) δείχνει ότι το ιϊκό RNA(+) πιθανόν κυκλοποιείται μέσω αλληλεπίδρασης του $3\text{AB}/3\text{CD}^{\text{pro}}/\text{PCBP2}$ ριβονουκλεοπρωτεϊνικού (RNP) συμπλόκου του 5' cloverleaf και της PABP της πολύ-A ουράς (εικόνα 1.10) (Herold and Andino 2001). Η συναρμολόγηση του RNP συμπλόκου στο 5' cloverleaf και η επακόλουθη κυκλοποίηση του ιϊκού RNA είναι πιθανόν ότι εμποδίζουν την πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι τη μετάβαση από τη μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al., 1993). Επιπλέον, αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής εξασφαλίζει ότι μόνο τα ανέπαφα RNA (πλήρους μήκους) θα αποτελέσουν εκμαγεία για την 3D^{pol} .



Εικόνα 1.10: Μοντέλο κυκλοποίησης του ιϊκού RNA κατά την σύνθεση του RNA(-).

Πολύ λίγα είναι γνωστά όσον αφορά τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην σύνθεση του RNA(+), με εξαίρεση ότι απαιτείται cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg . Στο μολυσμένο κύτταρο υπάρχουν 50 φορές περισσότεροι κλώνοι RNA(+) σε σύγκριση με τους κλώνους RNA(-). Αυτό είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης αντιγραφής κατά την οποία είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνθεση πολλαπλών κλώνων RNA(+) από έναν μόνο κλώνο RNA(-). Η μοριακή βάση της ασύμμετρης αντιγραφής βρίσκεται στην ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την ουριδιλίωση της VPg κατά την σύνθεση του RNA(-) (εξαρτώμενη από την πολύ(A) ουρά) και του RNA(+) (cre-εξαρτώμενη) (Morasco et al., 2003).

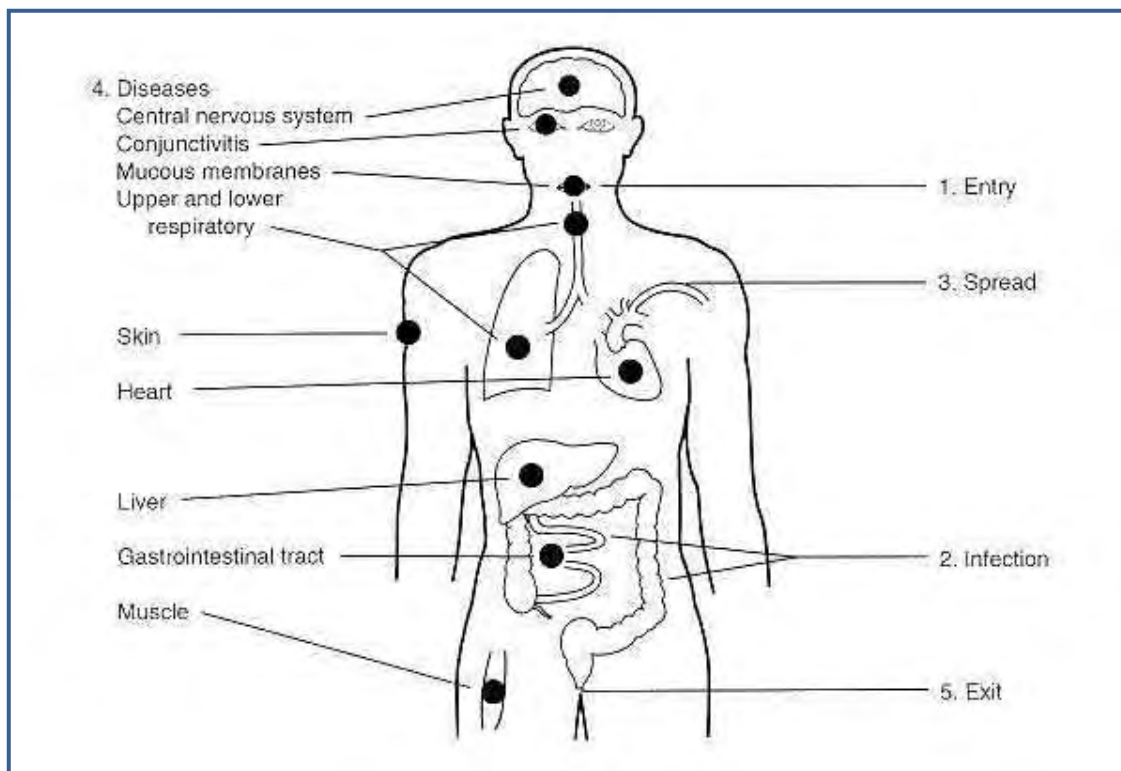
1.5.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση ιϊκών σωματιδίων

Καψιδίωση και αντιγραφή είναι συζευγμένα. Συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi et al., 1996). Η διαδικασία δημιουργίας του ιϊκού καψιδίου ξεκινάει με τη διάσπαση του P1 πρόδρομου πολυπεπτιδίου από την 3CD^{pro} και την παραγωγή των πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3. Οι VP0, VP1 και VP3 αλληλεπιδρούν ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομέρες. Πέντε πρωτομερή συνδυάζονται ώστε να σχηματίσουν ένα

πενταμερές και τελικά 12 πενταμερή συνδέονται μεταξύ τους και δίνουν το προκαψίδιο (Pfister et al., 1999). Τελικά η καψιδίωση του ιϊκού RNA (+) πραγματοποιείται είτε με τη συσσωμάτωση των πενταμερών γύρω από το ιϊκό RNA (Pfister et al., 1995) είτε με είσοδο του ιϊκού RNA μέσα στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου (Jacobson and Baltimore, 1968). Η διάσπαση της VP0 στις πρωτεΐνες VP2 και VP4, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ολοκληρώνει την συναρμολόγηση των ιϊκών σωματιδίων σταθεροποιώντας το καψίδιο και μετατρέποντας το προκαψίδιο σε ένα ώριμο, μολυσματικό ιοσωμάτιο (Hogle 2002).

1.6 ΠΟΡΕΙΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΟ ΚΝΣ

Δεδομένου ότι οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού προκειμένου να εμφανιστεί μόλυνση, η λεπτομερής κατανόηση του τρόπου με τον οποίο ο ιός ταξιδεύει από το έντερο στον εγκέφαλο είναι απαραίτητη. Οι εντεροϊοί εισέρχονται από τη στοματική κοιλότητα ή το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα και στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται στο λεμφικό ιστό του αναπνευστικού και του πεπτικού συστήματος (αμυγδαλές, τραχηλικούς αδένες, μεσεντέριους λεμφαδένες, πλάκες Peyer). Ακολουθεί μικρού βαθμού ιαιμία που προβάλλει κλινικά με κακουχία, πυρετό και φαρυγγαλγία και έχει ως αποτέλεσμα την επινέμηση των διαφόρων οργάνων-στόχων από τον ιό, όπως την καρδιά, το ήπαρ, το πάγκρεας, τα επινεφρίδια, το δέρμα και τους βλεννογόνους. Μετά από τον πολλαπλασιασμό του στα διάφορα όργανα, ο ιός εισέρχεται πάλι στην κυκλοφορία. Η δεύτερη μεγάλου βαθμού ιαιμία έχει συχνά ως αποτέλεσμα την είσοδο του ιού στο ΚΝΣ.



Εικόνα 1.11: Πορεία της μόλυνσης των εντεροϊών.

Παρά την εκτεταμένη έρευνα που έχει πραγματοποιηθεί για να κατανοήσουμε την εισβολή στο ΚΝΣ, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Πιστεύεται ότι στην πραγματικότητα συμμετέχουν πολλαπλά μονοπάτια σε συνδυασμό, προκειμένου να ολοκληρωθεί η εισβολή στο ΚΝΣ. Τα δύο κύρια μοντέλα που αφορούν την είσοδο των πολιοϊών στο ΚΝΣ περιλαμβάνουν καιμιά, αφού ο ιός έχει αντιγραφεί στους λεμφοειδείς ιστούς του γαστρεντερικού σωλήνα όπως περιγράφηκε παραπάνω. Το πρώτο μοντέλο πολύ απλά προτείνει την απευθείας κίνηση του ιού διαμέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού με έναν εξαρτώμενο του hPVR (human Poliovirus Receptor) τρόπου (Yang et al., 1997). Ίσως, η άμεση είσοδος δια μέσου του αιματοεγκεφαλικού φραγμού κατά την αρχική μόλυνση με πολιοϊό των ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων του μυελού των οστών (-hBMECs -human bone marrow endothelial cells) μπορεί να συμβαίνει στα πρώτα στάδια, και κατά συνέπεια να εξασθενεί ή να εκθέτει (σε κίνδυνο) τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να επιτρέπει στον «δευτερογενή ιό» να εισέλθει στο ΚΝΣ ανεξάρτητα από την έκφραση ενός συγκεκριμένου υποδοχέα. Ένα δεύτερο μοντέλο για την είσοδο των εντεροϊών προτείνει τη διασπορά των πολιοϊών από κάποιον μυ στο ΚΝΣ κατά μήκος νευρικών μονοπατιών (Ren and Racaniello, 1992). Αυτά τα νευρικά μονοπάτια καθορίστηκαν σαφέστερα από τους Gromeier και Wimmer το 1998 ως ανεπισσώμενης αξονικής μεταφοράς του ιού από το μυ που έχει υποστεί φθορά στο ΚΝΣ. Από τότε που το τραύμα στο μυ βρέθηκε να προκαλεί νευρολογική μόλυνση με πολιοϊό, το μοντέλο

χαρακτηριστικά αναφέρεται ως <pronocation poliomyelitis>. Αρχικά, είχε προταθεί ότι ο hPVR ήταν απαραίτητος για την ανεμισσόμενη αξονική μεταφορά κατά μήκος των μικροσωληνίσκων. Ωστόσο, πιο πρόσφατα, η ανεμισσόμενη μεταφορά βρέθηκε να πραγματοποιείται ανεξάρτητα από τον hPVR.

Ένα άλλο αναδυόμενο μοντέλο της εισόδου των εντεροϊών στο ΚΝΣ περιλαμβάνει τη χρήση ανοσοκυττάρων μολυσμένων με εντεροϊό τα οποία εισβάλουν στο ΚΝΣ με έναν τρόπο τύπου <Δούρειος Ίππος>. Ο <Δούρειος Ίππος> αποτελεί μία παρομοίωση για τη μεταφορά των εντεροϊών στο ΚΝΣ με την κάλυψη/βοήθεια των ανοσοκυττάρων. Σημειωτέον, βρέθηκε ότι οι πολιοϊοί μπορούν να μολύνουν μονοκύτταρα, μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα με έναν hPVR-εξαρτώμενο τρόπο. Επιπλέον, τα λεμφοκύτταρα μπορεί να παίζουν κάποιο ρόλο στη μόλυνση των μονοκυττάρων επάγοντας την ενεργοποίησή τους και διευκολύνοντας τον ιϊκό πολλαπλασιασμό (Eberle et al., 1995). Περεταίρω διερεύνηση αποκάλυψε μία πιθανή σύνδεση μεταξύ της παθογένεσης των πολιοϊών στο ΚΝΣ και της μόλυνσης των μονοκυττάρων, καθώς νευροπαθογόνα στελέχη βρέθηκαν να πολλαπλασιάζονται πιο αποδοτικά στα μονοκύτταρα (Freistadt and Eberle, 1996). Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, ο CVB3 καθώς και ο EV-71 βρέθηκαν να αντιγράφονται στα ανοσοκύτταρα, στα Β- και Τ-λεμφοκύτταρα και σε κύτταρα της μυελοειδούς γενιάς (Haddad et al., 2004; Vuorinen et al., 1996). Σε μία πρόσφατη έρευνα αποκαλύφθηκε η γρήγορη διήθηση ενός πληθυσμού nestin + myeloid κυττάρων στο ΚΝΣ νεογνού μετά από μόλυνση με CVB3 (Tabor-Godwin et al., 2010). Αυτά τα κύτταρα προτιμώνται για τη μόλυνση του ιού καθώς μετακινούνται στο παρέγχυμα του εγκεφάλου σταδιακά, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διασπορά των ιών.

1.7 ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΚΑΙ ΑΥΤΟΦΑΓΙΑ

Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι εντεροϊοί προκαλούν την κατάπτωση του κυττάρου ξενιστή, μια διαδικασία γνωστή ως αυτοφαγία (Huang et al., 2009, Suhy et al., 2000, Wong et al., 2008). Βάσει αυτής της λογικής οι εντεροϊοί πιστεύεται πως χρησιμοποιούν την μεμβράνη του αυτοφαγοσώματος ως σκαλωσιά για την αντιγραφή τους. Μια πρόσφατη δημοσίευση έδειξε αυξημένη ιϊκή αντιγραφή συνδεδεμένη με την αυτοφαγία που παρατηρείται κατά τη διάρκεια μόλυνσης με Coxsackie ιούς σε νευρώνες ποντικού (Yoon et al., 2008). Σημειώνεται πως γενικά η αυτοφαγία παίζει σημαντικό ρόλο στην αποφυγή κυτταρικής καταστροφής στους νευρώνες. Ωστόσο μένει να καθοριστεί εάν οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν τη διαδικασία της αυτοφαγίας σε όλους τους κυτταρικούς τύπους του ΚΝΣ. Για παράδειγμα, δεδομένου του μοναδικού και κρίσιμου ρόλου τους στην ανάπτυξη και στην κυτταρική ομοίωση του ΚΝΣ, τα νευρικά βλαστοκύτταρα ίσως

ανταποκρίνονται διαφορετικά και μοναδικά σε κάθε μόλυνση. Επιπλέον, θα ήταν ενδιαφέρον να ξεκαθαριστεί εάν η αυτοφαγία έχει κάποιο ρόλο στην εγκαθίδρυση της λοίμωξης των εντεροϊών στο ΚΝΣ. Η επαγωγή ή καταστολή αυτοφαγίας στα κύτταρα που αγκυροβολεί το ιϊκό υλικό μπορεί να μεταβάλει την λοίμωξη των εντεροϊών (Jackson et al., 2005).

1.8 ΕΠΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΤΕΡΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΕΝΤΕΡΟΪΟ

Μετά από μόλυνση με εντεροϊό συχνά επάγεται τερματισμός της μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή. Πολλές από τις ιϊκές πρωτεΐνες έχουν έντονες επιδράσεις στο κύτταρο ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης ρυθμίζοντας την κυτταρική μεταγραφή, τη μετάφραση καθώς και την έκκριση των πρωτεϊνών. Η μεταγραφή του κυττάρου ξενιστή καταστέλλεται από την ιϊκή πρωτεάση 3C, η οποία μεταφέρεται στον πυρήνα από ένα σήμα εντοπισμού στον πυρήνα το οποίο εντοπίζεται στην περιοχή της 3D στην πρόδρομη μορφή της (Sharma et al., 2004). Επιπλέον, η 3C πρωτεΐνη του EV-71 βρέθηκε πρόσφατα ότι μπλοκάρει την πολυαδενυλίωση του mRNA του ξενιστή καθώς εμπλέκεται στη διάσπαση ενός σημαντικού παράγοντα ο οποίος είναι απαραίτητος για αυτή τη διαδικασία (Weng et al., 2009). Με τη σειρά της, η ιϊκή πρωτεάση 2A διακόπτει την εξαρτώμενη από την καλύπτρα μετάφραση του κυττάρου ξενιστή διασπώντας τον παράγοντα eIF4G, ενισχύει τη μετάφραση του ιϊκού mRNA σταθεροποιώντας τα πολυσώματα (Etchison et al., 1982; Kempf and Barton, 2008). Επίσης, οι ιϊκές πρωτεΐνες 2B και 3A αναστέλλουν την έκκριση πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή, καθώς η πλασματική μεμβράνη και οι μεταφορείς των εκκριτικών πρωτεϊνών παρεμποδίζονται να επιτελέσουν τη λειτουργία τους (Doedens and Kirkegaard, 1995).

Γενικά, το κύτταρο του ξενιστή έρχεται αντιμέτωπο με μια αναπόφευκτη καταστροφή εξαιτίας της κυτταρολυτικής φύσης των εντεροϊών. Η ιϊκή πρωτεΐνη 2B είναι μια ιϊκή πορίνη η οποία μπορεί να διασπάσει τόσο τη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή που προσβάλλει ο ιός όσο και των διπλανών κυττάρων (Madan et al., 2010). Ωστόσο, τα μονοπάτια που ενεργοποιούνται στο κύτταρο (από τον ιό) κατά τη διάρκεια της μόλυνσης μπορεί να είναι κατά κάποιο τρόπο αντικρουόμενα. Και αυτό πιστεύεται πως είναι μια προσπάθεια από τον ιό να κρατήσει το κύτταρο ζωντανό για μεγάλο χρονικό διάστημα προκειμένου να ολοκληρώσει την αντιγραφή του και τελικά να καταφέρει να ξεφύγει από τον κυτταρικό εγκλεισμό. Έτσι, οι εντεροϊοί προκαλούν τόσο αντι-αποπτωτικά (3A και 2B πρωτεΐνες) όσο και προ-αποπτωτικά γεγονότα (VP2, 2A και 3C πρωτεΐνες) στο κύτταρο ξενιστή (Whitton et al., 2005). Μάλιστα, έχει αποδειχτεί πως η σύνθεση ιϊκών πρωτεϊνών,

η οποία προάγεται από την 2A, είναι απαραίτητη για την απόπτωση (Shih et al., 2008). Καθώς υπάρχουν πολλές αναφορές που υποστηρίζουν την απόπτωση των νευρώνων μετά από μόλυνση με εντεροϊό, και τον ρόλο της 2A στον έλεγχο της μετάφρασης, είναι ενδιαφέρον να υποθέσουμε ότι η διακοπή της μετάφρασης του κυττάρου ξενιστή από κάποιον εντεροϊό μπορεί να οδηγήσει απευθείας τους νευρώνες σε κυτταρικό θάνατο. Μάλιστα, έχει αποδειχθεί ότι ο CVB3 επάγει την απόπτωση στους πυραμιδικούς νευρώνες στον ιππόκαμπο (Feuer et al., 2003).

1.9 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ Ή QUASISPECIES ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο ιός άγριου τύπου στην πραγματικότητα αποτελεί μια παροδική πλειοψηφία η οποία κυριαρχεί στον συνολικό πληθυσμό των γενωμάτων του ιού. Αυτά τα μίγματα των μοριακών παραλλαγών (variants) είναι γνωστά ως quasispecies. Δηλαδή, όπως λέει και το όνομά τους, τα quasispecies είναι το σύνολο των σχετικών στοιχείων που συμπεριφέρονται σχεδόν (quasi) σαν ένα τύπο μορίου (species). Η ύπαρξη των quasispecies ή των γενοτυπικών παραλλαγών στους ιικούς πληθυσμούς, εξαιτίας των λαθών που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιού, αποτελεί έναν ακόμη βασικό παράγοντα όσον αφορά την εισβολή στο ΚΝΣ. Λάθη προκύπτουν από τη χαμηλή πιστότητα της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, μέσω της οποίας τουλάχιστον ένα λάθος νουκλεοτίδιο ενσωματώνεται ανά γονιδιακό διπλασιασμό καθώς και από άλλους παράγοντες που εμπλέκονται με την ιική αντιγραφή. Για παράδειγμα, μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα *in vitro* με την 3D^{Po1} των πολιοϊών έδειξε ότι η πιστότητα της αντιγραφής είναι ενδεχομένως σχετικά υψηλή· ωστόσο άλλα γεγονότα κατά την αντιγραφή όπως η αλλαγή μήτρας, ίσως να είναι αυτά που πραγματικά συνεισφέρουν στα λάθη που εντοπίζονται στο γένωμα (Freistadt et al., 2007).

Ανεξάρτητα της φύσης του ρυθμού μετάλλαξης, η ύπαρξη ενός πληθυσμού ιικών παραλλαγών, ή ένα πλήθος quasispecies, έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει στην εξάπλωση των εντεροϊών στο ΚΝΣ. Κατά τη διάρκεια μιας πρόσφατης έρευνας, χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή πολιοϊού ο οποίος κωδικοποιούσε μια μεταλλαγμένη 3D^{Po1} που απομονώθηκε κατά τη διάρκεια σειριακών περασμάτων παρουσία ριμπαβιρίνης (στέλεχος G64S). Με αυτή την έρευνα αποκαλύφθηκε η κρίσιμη φύση των ιικών quasispecies όσον αφορά την εισβολή των εντεροϊών στο ΚΝΣ. Ο απομονωθέν πολιοϊός βρέθηκε να αυξάνει την πιστότητα της ιικής πολυμεράσης και να μειώνει την ποικιλία των quasispecies. Το στέλεχος G64S ήταν λιγότερο νευρομολυσματικό απ' ότι ο ιός άγριου τύπου, και η εισβολή στο ΚΝΣ απέτυχε να συμβεί εκτός εάν το απομονωθέν στέλεχος συν-εμβολιαζόταν σε συνδυασμό με ένα ποικιλόμορφο πληθυσμό quasispecies

(Vignuzzi et al., 2006). Αυτά τα αξιοπερίεργα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι η συνεργασία/αλληλεπίδραση μεταξύ των παραλλαγών μέσα σε έναν ιικό πληθυσμό είναι απαραίτητη για την εισβολή στο ΚΝΣ και την επερχόμενη νευροπαθολογία. Η συνεργασία των ιικών γενοτύπων μπορεί να πραγματοποιείται για αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης και ταυτόχρονη εισβολή στο ΚΝΣ.

Γενετικά ανασχετικά γεγονότα, παρατηρήθηκαν και καθώς τα παραλλάγματα των ιών εισέβαλαν στο ΚΝΣ. Καθώς οι πρώτοι ελάχιστοι ιοί διαπερνούν τις οδούς για το ΚΝΣ, οι αποκρίσεις έναντι των ιών ξεκινούν με το μπλοκάρισμα της εισόδου για τα εναπομείναντα παραλλάγματα ιών (Pfeiffer and Kirkegaard, 2006). Αυτό το γενετικό ανασχετικό γεγονός γνωστό ως μοντέλο “φλεγόμενη γέφυρα” (“burned bridge”), ενδεχομένως συνεισφέρει στη σποραδική μεταφορά των πολιοϊών στο ΚΝΣ το οποίο συμβαίνει στο 1-2% των περιπτώσεων (Gromeier and Wimmer, 1998). Μετέπειτα μελέτες πρόσθεσαν στο μοντέλο “φλεγόμενη γέφυρα” (“burned bridge”) την πιθανότητα ύπαρξης πολλαπλών φραγμών οι οποίοι ίσως συνεισφέρουν στα φαινόμενα γενετικής ανασχεσης των *quasispecies*. Αυτοί οι φραγμοί οι οποίοι ίσως περιορίζουν τη νευρομολυσματικότητα περιλαμβάνουν την ακεραιότητα (*integrity*) του εντέρου, την έναρξη μιας προστατευτικής εγγενούς ανοσολογικής απόκρισης και καθιστούν ανίκανη τη νευρονική μεταφορά του ιού (Kuss et al., 2008; Lancaster and Pfeiffer, 2010). Συνεπώς, η είσοδος των εντεροϊών στον εγκέφαλο φαίνεται να είναι μία μπερδεμένη αλληλεπίδραση, όχι μόνο μεταξύ του ιού και του ξενιστή, αλλά και μεταξύ των παραλλαγών του ιού μέσα στον πληθυσμό των *quasispecies*.

1.10 ΤΡΟΠΙΣΜΟΣ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί είναι συνήθως νευροτρόποι ιοί, ωστόσο κάθε μέλος του γένους των εντεροϊών στοχεύει διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ. Σε μία πρόσφατη *in vivo* μελέτη από τους Nagata et al. ερευνήθηκε ο εντοπισμός του πολιοϊού και του EV-71 μετά από ενδοφλέβια μόλυνση πιθήκων (με στελέχη αυτών). Οι ερευνητές ταυτοποίησαν κακώσεις επαγώμενες από τον πολιοϊό στην πυραμιδική οδό του ΚΝΣ, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα ολική απώλεια των κινητικών νευρώνων στο πρόσθιο κέρατο της σπονδυλικής στήλης. Εν αντιθέσει, ο EV-71 προκάλεσε περιορισμένη καταστροφή τόσο στις εξαπυριμδικές όσο και στις πυραμιδικές οδούς, αφήνοντας πολλούς κινητικούς νευρώνες στο πρόσθιο κέρατο της σπονδυλικής στήλης άθικτους (Nagata et al., 2004). Επιπλέον, οι ερευνητές κατάφεραν να απομονώσουν πολιοϊούς από ολόκληρο το ΚΝΣ, συμπεριλαμβανομένων της ραχιαίας ρίζας και του τρίδymου νεύρου. Από την άλλη πλευρά, ο EV-71 δεν ήταν δυνατόν να απομονωθεί από καμία από τις δύο αυτές

περιοχές του ΚΝΣ. Αυτά τα αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη του μεγάλου εύρους των νευρωνικών κυττάρων που αποτελούν στόχο για τον πολιοϊό σε σύγκριση με τους πιο περιορισμένους νευρωνικούς στόχους του EV-71.

Σε ένα ακόμη παράδειγμα νευρωνικού στόχου των εντεροϊών, ο Echo-ϊός τύπου 1 βρέθηκε ότι προκαλεί κυτταρικές νεκρωτικές κακώσεις στον φλοιό του εγκεφάλου διαγονιδιακού ποντικού ο οποίος εξέφραζε ανθρώπινη ιντεγκρίνη, οδηγώντας σε παράλυση και εξάντληση (Hughes et al., 2003). Σε αντίθεση, η αρχική μόλυνση με CBV3 εντοπίστηκε σε συγκεκριμένες νευρογενείς περιοχές του εγκεφάλου, συμπεριλαμβανομένης της υποκοιλιακής ζώνης (SVZ) (Feuer et al., 2005). Κάθε μέλος του γένους των εντεροϊών προτιμάει διαφορετικές περιοχές του ΚΝΣ. Όμως, ποιοί παράγοντες καθορίζουν τον επιλεκτικό τροπισμό σε κυτταρικό επίπεδο; Μπορούμε να δούμε τον τροπισμό σε κυτταρικό επίπεδο ως μία αλληλεπίδραση μεταξύ τριών τουλάχιστον γενικών παραγόντων: την ικανότητα του ιού να μολύνει και να αντιγράφεται σε συγκεκριμένους ιστούς του ξενιστή· την ικανότητα του κυττάρου ξενιστή να απομακρύνει τον ιό· και την ικανότητα του ιού να αποφεύγει την απομάκρυνση από τον ξενιστή. Πιθανές διαφορές στην απόκριση της ιντερφερόνης α/β μπορεί να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό τον τροπισμό των πολιοϊών στους ιστούς (Ida-Hosonuma et al., 2005; Yoshikawa et al., 2006).

Ο τροπισμός των πολιοϊών στους νευρώνες έχει βρεθεί ότι καθορίζεται και από τις περιοχές IRES των πολιοϊών (Kauder and Racaniello, 2004). Οι Kauder et al. αρχικά ανακάλυψαν ότι ο τροπισμός των πολιοϊών ως προς τους νευρικούς ιστούς δεν ήταν δυνατόν να εξηγηθεί πλήρως από συγκεκριμένες διαφορές μεταξύ των οργάνων όσον αφορά τη μεσολαβούμενη από την IRES μετάφραση σε δείγματα ίδιας ηλικίας. Ανακαλύφθηκαν αλλαγές στον τροπισμό των πολιοϊών δημιουργώντας ανασυνδυασμένους ιούς οι οποίοι περιείχαν IRES από τον ανθρώπινο rhinovirus (Kauder et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο, οι ερευνητές παρατήρησαν μεσολαβούμενες από το IRES, οργανο-συγκεκριμένες διαφορές στη μετάφραση μεταξύ της μόλυνσης ενός ενήλικα και ενός νεογνού. Συμπέραναν ότι αυτές οι διαφορές ίσως αποδίδονται στους παράγοντες ITAFs (παράγοντες με trans δράση στην περιοχή IRES) οι οποίοι εκφράζονται με διαφορετικό πρότυπο σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων και των νευρώνων. Οι παράγοντες ITAFs έχουν ένα ρόλο κλειδί στην αρχή της IRES-εξαρτώμενης μετάφρασης των εντεροϊών όπως αναλύθηκε ανωτέρω. Μερικές περιοχές IRES απαιτούν συγκεκριμένους παράγοντες ITAFs, ενώ άλλες απαιτούν μερικές ακόμα επιπρόσθετες πρωτεΐνες (Fitzgerald and Semler, 2009). Συνεπώς, παράγοντες ITAFs οι οποίοι υπάρχουν σε κάποιο συγκεκριμένο ιστό ίσως βοηθούν στο να εξηγήσουμε τον

τροπισμό των εντεροϊών σε συγκεκριμένους τύπους ιστών. Οι νευρώνες μπορεί να είναι πιο ευπαθείς στη μόλυνση καθώς διαθέτουν συγκεκριμένους παράγοντες ITAFS που χρειάζονται προκειμένου να ξεκινήσει η IRES-εξαρτώμενη μετάφραση. Διερεύνηση των IRES των TMEV και FMDV πρότεινε ότι διαφορές συγκεκριμένων κυττάρων σε σχέση με τα ITAFS ίσως δίνει μία εξήγηση στο γιατί μερικοί ιοί είναι ικανοί να αντιγράφονται στους νευρώνες ενώ άλλοι δεν είναι σε θέση (Piliipenko et al., 2000). Επιπρόσθετα, η έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης διαφορετικών εντεροϊών ίσως εξαρτάται τόσο από τον συνδυασμό διαφορετικών ITAFs όσο και από τα επίπεδα αφθονίας αυτών των παραγόντων (Boussadia et al., 2003). Πρόσφατα μάλιστα η Far Upstream Element (FUSE) προσδενόμενη πρωτεΐνη ανακαλύφθηκε ως ένας κρίσιμος παράγοντας ITAF σε σχέση με τη μόλυνση του EV-71 (Lin et al., 2009a).

Ενώ τα ITAFs και IRES έχουν συσχετιστεί σε μεγάλο βαθμό με την ιϊκή αντιγραφή στους νευρώνες, οι εντεροϊοί είναι ικανοί να μολύνουν και άλλους κυτταρικούς τύπους στο ΚΝΣ. Για παράδειγμα, οι πολιοϊοί μπορούν να μολύνουν αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα (Couderc et al., 2002).

Ιός	Περιοχή ΚΝΣ	Κυτταρικός τύπος-οξεία μόλυνση	Επίμονη μόλυνση
Πολιοϊός	Ολόκληρο	Νευρώνες, αστροκύτταρα και ολιγοδενδροκύτταρα	Νευρώνες
Εντεροϊός 71	ΚΝΣ-εκτός από γάγγλια ραχαίας ρίζας	Νευρώνες και αστροκύτταρα	Τεκμηριωμένη εμμένουσα λοίμωξη σε άγνωστη περιοχή
Coxsackie (A & B)	Χοριοειδές πλέγμα, νευρογενείς περιοχές, ιππόκαμπος, φλοιός	Νεστίνη + μυελοειδή κύτταρα, NPSCs και νευρώνες	NPSCs (σε καλλιέργεια)

Πίνακας 1.3 : Τροπισμός των εντεροϊών στο ΚΝΣ.

1.11 ΑΝΟΣΟΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η ανοσολογική απόκριση διαδραματίζει κύριο ρόλο στην προστασία του ξενιστή από ιικά παθογόνα τόσο με τη ρύθμιση της απελευθέρωσης των χημειοκινών και των κυτταροκινών για τη στρατολόγηση των λευκοκυττάρων όσο και για την άμεση αντιμετώπιση της μόλυνσης μέσω της απόκρισης των ιντερφερονών. Πρόσφατα μάλιστα δημοσιεύτηκε μία έρευνα σχετικά με την επαγωγή των χημοκινών ως απόκριση σε νευρότροπες μολύνσεις (Hosking and Lane 2010). Αυτά τα χημειοελκτικά μόρια μπορεί να είναι εξαιρετικά κρίσιμα στον αγώνα έναντι των μικροβίων μέσα σε περιοχές, όπως είναι το ΚΝΣ. Υποστηρίζεται η επαγωγή πολυάριθμων χημειοκινών στο ΚΝΣ μετά από μόλυνση με CVB3. Μία συγκεκριμένη χημειοκίνη, η CCL12, ενδεχομένως να έχει έναν βασικό ρόλο στη στρατολόγηση nestin+myeloid κυττάρων τα οποία υφίστανται διήθηση κατά μήκος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μολύνονται μετά την είσοδό τους στο χοριοειδές πλέγμα (Tabor-Godwin et al., 2010).

1.12 ΕΜΜΕΝΟΥΣΑ ΛΟΙΜΩΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Αν και οι εντεροϊοί διαθέτουν πολλούς μηχανισμούς προκειμένου να αποφύγουν την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, η επιτυχία τους δεν είναι απόλυτη, και ο αγώνας μεταξύ του ξενιστή και του ιού μπορεί να διαρκέσει για μεγάλο χρονικό διάστημα. Κάτω από τις επιλεκτικές πιέσεις που παράγονται από μια επιτυχημένη ανοσολογική απάντηση, μερικές φορές η καλύτερη άμυνα του ιού είναι η μετάλλαξη. Όπως περιγράφηκε ανωτέρω, λάθη κατά την αντιγραφή των εντεροϊών μπορεί να οδηγήσουν στην ύπαρξη των quasispecies (Domingo et al., 2008) τα οποία μπορεί να διευρύνουν τον τροπισμό των εντεροϊών (Vignuzzi et al., 2006), να βοηθήσουν στη διαφυγή από την ανοσολογική απόκριση και στην εμμένουσα λοίμωξη. Συνεπώς δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να εγκαθιδρύσουν μία εμμένουσα λοίμωξη στο ΚΝΣ και να αποφύγουν την απομάκρυνσή τους από τον ξενιστή.

Πολλοί εντεροϊοί όπως πχ ο EV-71, ο PV και ο CBV3 διαθέτουν μηχανισμούς προκειμένου να μετριάσουν την εγγενή ανοσολογική αντίδραση (Han et al., 2010).

1.13 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι εντεροϊοί μεταδίδονται μέσω της εντεροστοματικής οδού και ο άνθρωπος αποτελεί το μοναδικό ξενιστή. Έχουν αναγνωριστεί περισσότεροι από 68 ορότυποι και ορισμένοι είναι περισσότερο νευροτρόποι από άλλους, όπως οι ιοί Echo 7,9,11 και 30, Coxsackie B5 και ο εντεροϊός 71. Οι ιοί αποτελούν το συχνότερο αίτιο μηνιγγίτιδας, με μεγαλύτερη επίπτωση στη βρεφική και την παιδική ηλικία λόγω απουσίας της επίκτητης ανοσίας. Από μελέτη της Α΄ Παιδιατρικής Κλινικής Αθηνών βρέθηκε ότι η ετήσια επίπτωση της ιογενούς μηνιγγίτιδας είναι 17/100.000 παιδιά 1-14 ετών, ενώ είναι μεγαλύτερη σε παιδιά <5 ετών (25/100.000 παιδιά). Σε ποσοστό >80%, η ιογενής μηνιγγίτιδα οφείλεται σε εντεροϊούς και συνεπώς ο όρος άσηπτη (ιογενής) μηνιγγίτιδα αφορά κυρίως σε λοίμωξη από εντεροϊούς. Τα κρούσματα μπορεί να εμφανίζονται σποραδικά ή με τη μορφή επιδημίας.

Η μικροβιακή μηνιγγίτιδα εμφανίζεται σε 3 άτομα στα 100.000 ετησίως στις δυτικές χώρες. Πληθυσμιακές μελέτες έχουν δείξει ότι η ιογενής μηνιγγίτιδα είναι πιο συχνή, στα 10,9 ανά 100.000 άτομα. Μηνιαία, η ιϊκή μηνιγγίτιδα εμφανίζεται περίπου σε ένα στα 100.000 άτομα σε εύκρατα κλίματα. Τα δηλωμένα περιστατικά είναι υψηλότερα κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και αρχές φθινοπώρου. Όλες οι καταστάσεις είναι δύσκολο να καταγραφούν καθώς πολλές περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας δε δηλώνονται καν στις αρμόδιες υπηρεσίες υγείας. Πολλές περιπτώσεις δεν υφίστανται καν διάγνωση γιατί αυτή η «αυτοπεριοριζόμενη» διαταραχή συνήθως λύνεται χωρίς την πρόοδο των συμπτωμάτων. Γενικά, περιοχές με πολύ φτωχή παροχή υπηρεσιών υγείας και φτωχή υγιεινή αντιμετωπίζουν υψηλό ποσοστό κρουσμάτων (100-800 περιπτώσεις ανά 100.000 κατοίκους).

1.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η απομόνωση των εντεροϊών μπορεί να γίνει από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), από τα κόπρανα και από άλλα βιολογικά υλικά όπως π.χ. το δάκρυ. Από μια συγκριτική μελέτη που έγινε από τη L. Kurila και τους συνεργάτες της, το 2005 όσον αφορά τη διάγνωση της εντεροϊκής μηνιγγίτιδας με τη χρήση της PCR σε δείγματα ασθενών ENY, κοπράνων και ορού αποδείχθηκε ότι η πιο αξιόπιστη εξέταση για τη διάγνωση ή τον αποκλεισμό μηνιγγίτιδας είναι η ανάλυση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY). Βέβαια πρέπει να σημειωθεί πως το δείγμα ENY πρέπει να ληφθεί από τον ασθενή στα αρχικά στάδια της νόσου και συγκεκριμένα δύο ημέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Η εξέταση σε δείγματα κοπράνων παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία και μπορεί να γίνει

με λήψη δείγματος από τον ασθενή ακόμα και μέρες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων. Αν και η εξέταση δειγμάτων κοπράνων έχει μεγαλύτερη ευαισθησία η εξέταση δειγμάτων ENY παρουσιάζει μεγαλύτερη ειδικότητα. Γενικά, η εξέταση δειγμάτων ENY έχει μεγαλύτερη ειδικότητα καθώς σε ανάλογες έρευνες σε κανέναν ασθενή με μηνιγγίτιδα από κάποια άλλη μη εντεροϊική καθορισμένη αιτιολογία, δεν ανιχνεύτηκε κάποιος εντεροϊός στο ENY. Όσον αφορά τα δείγματα κοπράνων, σημειώνεται πως η αντιγραφή του ιού στο γαστροεντερικό επιθήλιο μπορεί να επιμείνει για αρκετές εβδομάδες μετά από μια κλινική λοίμωξη ακόμα και χωρίς κλινική εκδήλωση. Ωστόσο, ο εντοπισμός του γενετικού υλικού του ιού σε δείγματα κοπράνων δεν επιβεβαιώνει ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της μηνιγγίτιδας είναι ο εντεροϊός, αν και αυτά τα ευρήματα συνηγορούν ότι αυτή η αιτιολογία είναι υψηλή. Στην μελέτη που έγινε, σε ένα πολύ μικρό ποσοστό ασθενών με μηνιγγίτιδα οφειλόμενη σε κάποια άλλη διαγνωσμένη αιτία, ανιχνεύτηκε γενετικό υλικό εντεροϊών στα κόπρανα (σοβαρή ένδειξη μείωσης της ειδικότητας). Τα ευρήματα αυτά συνηγορούν υπέρ της χρησιμοποίησης δείγματος ENY από τον ασθενή για την ανίχνευση εντεροϊών σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας.

Η οσφυονωτιαία παρακέντηση προκειμένου να ληφθεί το ENY πραγματοποιείται τοποθετώντας τον ασθενή συνήθως ξαπλωμένο στο πλάι, εφαρμόζοντας τοπική αναισθησία και εισάγοντας μία βελόνα στον υποσκληρίδιο χώρο για τη συλλογή του εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Αφού επιτευχθεί αυτό μετράται η πίεση διάνοιξης του ENY με ένα μανόμετρο. Η πίεση αυτή φυσιολογικά κυμαίνεται μεταξύ 6 και 18 cm H₂O. Η μακροσκοπική εμφάνιση του υγρού μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη φύση της λοίμωξης: θολρότητα υποδεικνύει υψηλά επίπεδα πρωτεϊνών, λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια ή/και βακτήρια, γεγονός το οποίο μπορεί να υποδηλώνει μικροβιακή μηνιγγίτιδα.

1.15 ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΕΥΡΗΜΑΤΑ

1.15.1 Κλινική εικόνα

Τα συνηθέστερα συμπτώματα σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας είναι: κεφαλαλγία, πυρετός >38°C, έμετοι, αυχενική δυσκαμψία, μυαλγίες, κακουχία, ρίγος, πονόλαιμος, κοιλιακά άλγη, ναυτία, φωτοφοβία και υπνηλία. Ασθενείς με μηνιγγίτιδα οφειλόμενη σε εντεροϊό συχνά παρουσιάζουν συμπτώματα παρόμοια με αυτά της γρίπης.

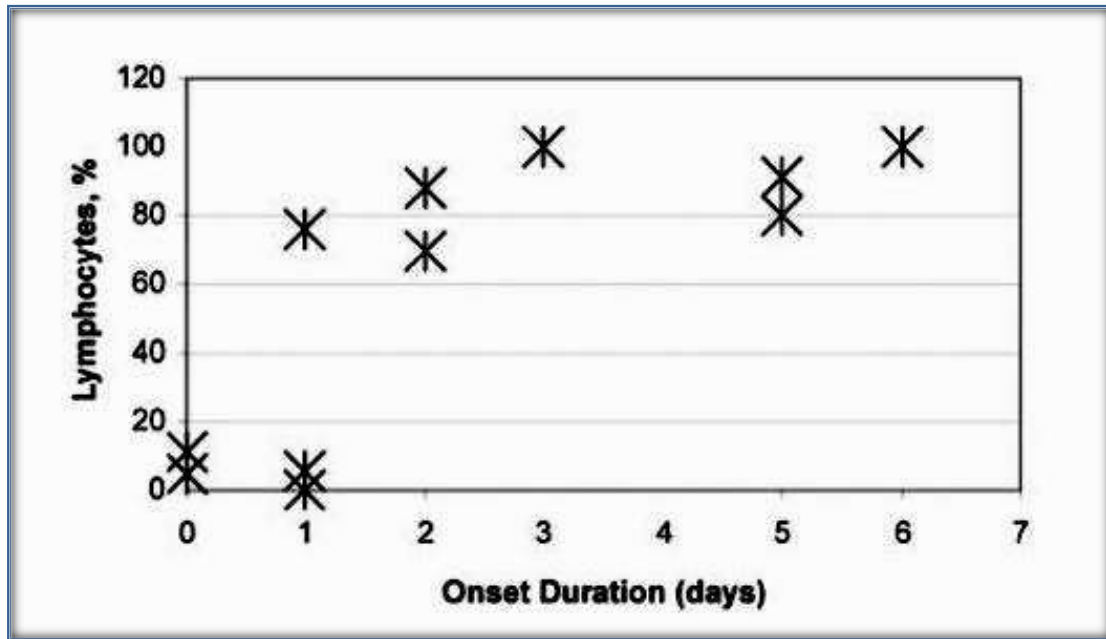
Η πορεία της νόσου είναι μέσης βαρύτητας και καλοήθης. Γενικά η άσηπτη μηνιγγίτιδα θεωρείται αυτοπεριοριζόμενη νόσος με χαμηλή θνησιμότητα. Η πλήρης αποθεραπεία υπολογίζεται σε 5-14 ημέρες, αν και κακουχία, ναυτία και αδυναμία μπορεί να υπάρχουν για μήνες στους ασθενείς.

1.15.2 Εργαστηριακά ευρήματα

Εργαστηριακά ευρήματα από τη γενική εξέταση του εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ENY), που συνηγορούν υπέρ της άσηπτης (ιογενούς) μηνιγγίτιδας, περιλαμβάνουν μέτρια σχετικά αύξηση των λευκών (συνήθως <2.000 κύτταρα) με λεμφοκυτταρικό τύπο, φυσιολογική γλυκόζη και μέτρια αυξημένο λεύκωμα. Παράλληλα η χρώση κατά Gram, η αναζήτηση μικροβιακών αντιγόνων και η καλλιέργεια του ENY είναι αρνητικές. Όμως στην κλινική πράξη, συχνά, όταν γίνεται οσφυονωτιαία παρακέντηση τα πρώτα 24ωρα της νόσου ανευρίσκεται πολυμορφοπυρηνικός τύπος λευκών στο ENY. Πρόσφατη μελέτη από τους Negini et al., έδειξε ότι το 57% των παιδιών με ιογενή μηνιγγίτιδα, που παρακεντήθηκαν κατά τα πρώτα 24ωρα της νόσου, είχαν πολυμορφοπυρηνικό τύπο λευκών στη γενική εξέταση του ENY. Επομένως η διαφορική διάγνωση μεταξύ μικροβιακής και ιογενούς μηνιγγίτιδας δεν μπορεί να στηριχθεί στον αριθμό ή τον τύπο των λευκοκυττάρων. Πρέπει να σημειωθεί, όμως, ότι λεύκωμα μεγαλύτερο από 120 mg/dl και σάκχαρο μικρότερο του 25mg/dl συνηγορούν υπέρ της μικροβιακής μηνιγγίτιδας.

Γενικά, υποψία μόλυνσης από ιό αποτελεί η ένδειξη ύπαρξης στο ENY αριθμού λευκοκυττάρων (WBC-White Blood Cells) μεγαλύτερου από 1κύτταρο/cm³. Οι αρχές του Harrison προτείνουν ότι, στην ιϊκή μηνιγγίτιδα “το τυπικό προφίλ περιλαμβάνει λεμφοκυτταρική πλειοκύττωση (25-500 cells/μl), φυσιολογική ή ελάχιστα αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης (0,2-0,8g/L [20-80mg/dL]), μία φυσιολογική συγκέντρωση γλυκόζης και μια φυσιολογική ή ελαφρώς αυξημένη πίεση (100-300 mm H₂O)”. (BIBL) Ωστόσο αυτές οι αρχές δεν ισχύουν πάντοτε στις ιϊκές μηνιγγίτιδες.

Σε μια πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε ότι η διαφοροποίηση των λευκοκυττάρων στο ENY από πολυμορφοπύρηννα σε λεμφοκύτταρα μπορεί να εξελιχθεί κατά τη διάρκεια των 48 πρώτων ωρών της μόλυνσης του ΚΝΣ (Ihekwa et al., 2008). Μια τέτοια κατάσταση παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις ασθενών μολυσμένων από εντεροϊό όπως φαίνεται στην εικόνα 1.12, όπου παρουσιάζεται μια σύγκριση μεταξύ της διάρκειας έναρξης των συμπτωμάτων και του βαθμού λεμφοκυττάρωσης (αύξηση του αριθμού των λεμφοκυττάρων) σε δείγματα ENY από ασθενείς με μόλυνση από εντεροϊό (n=15). Σημειώνεται μάλιστα πως στις ημέρες 3 και 6, βρέθηκαν 3 ασθενείς με 100% λεμφοκύτταρα.



Εικόνα 1.12: Σύγκριση μεταξύ της διάρκειας έναρξης των συμπτωμάτων και του βαθμού λεμφοκυττάρωσης.

Στην ίδια μελέτη προσδιοριστήκαν όπως φαίνεται στην εικόνα 1.13 κάποια εργαστηριακά ευρήματα που σχετίζονται με μολύνσεις από εντεροϊούς, τον VSV (Varicella Zoster Virus) και τους δύο τύπους του HSV (Herpes Simplex Virus) ούτως ώστε να είναι ευκολότερος ο καθορισμός της πιθανής αιτίας μιας άσηπτης μηνιγγίτιδας.

Laboratory result	Patients with enterovirus infection (n = 22)	Patients with HSV-2 infection (n = 8)	Patients with VZV infection (n = 8)
CSF			
Leukocyte count, $\times 10^6$ leukocytes/L ^a	51 (0–1298)	240 (180–2200)	207 (6–450)
Lymphocyte percentage ^b	91 (5–100)	100 (80–100)	100 (90–100)
Protein level, mg/L ^c	640 (100–875)	1205 (611–3704)	974 (581–2616)
CSF:serum glucose ratio ^d	0.6 (0.26–0.76)	0.48 (0.47–0.67)	0.55 (0.4–0.73)
Peripheral blood			
Leukocyte count, $\times 10^9$ leukocytes/L ^e	6.6 (3.6–12.2)	7.9 (5.5–13.9)	7.7 (5.6–15.6)
C-reactive protein level, mg/L ^f	15 (2.1–112.3)	4.6 (2–28)	6.2 (2–22.9)

NOTE. Data are median value (range).

^a $P < .01$ for the comparison between patients with enterovirus and patients with HSV-2 by 2-tailed Mann-Whitney U test.

^b Data are for 15 patients with enterovirus infection and 7 patients with VZV infection.

^c $P < .001$ for the comparison between patients with enterovirus infection and patients with HSV-2 infection, and $P < .01$ for the comparison between patients with enterovirus infection and patients with VZV infection, by 2-tailed Mann-Whitney U test.

^d Data are for 16 patients with enterovirus infection and 6 patients with VZV infection.

^e Data are for 21 patients with enterovirus infection and 7 patients with HSV-2 infection.

^f Data are for 7 patients with HSV-2 infection.

Εικόνα 1.13: Παρουσίαση εργαστηριακών ευρημάτων που σχετίζονται με μολύνσεις από εντεροϊούς.

1.15 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Έχει χρησιμοποιηθεί ένα πλήθος διαφορετικών τεχνικών για την εργαστηριακή διάγνωση μολύνσεων του ΚΝΣ από εντεροϊούς. Η διάγνωση μέσω επιλεκτικής καλλιέργειας χρησιμοποιώντας διαγονιδιακές κυτταρικές σειρές είναι περιορισμένη. Το κύριο πρόβλημα αυτής της μεθόδου είναι η έλλειψη κυτταρικών σειρών που να υποστηρίζουν την αντιγραφή συγκεκριμένων στελεχών (Leland and Ginocchio, 2007). Εν αντιθέσει, μοριακές τεχνικές, όπως η RT-PCR, αντιπροσωπεύουν μία ευαίσθητη και ακριβή μεθοδολογία για την ταυτοποίηση της μόλυνσης του ΚΝΣ με εντεροϊό. Εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY) από νοσούντα άτομα είναι η προτιμώμενη πηγή κλινικών δειγμάτων στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν αυτές οι τεχνικές. Η γενωμική ανάλυση χρησιμοποιώντας RT και PCR μπορεί να ολοκληρωθεί μέσα σε 24 ώρες από τη συλλογή των δειγμάτων (Romero, 1999). Η διάγνωση με RT-PCR της μηνιγγίτιδας οφειλόμενης σε εντεροϊό έχει πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας εκκινητές που αναγνωρίζουν μία συντηρημένη περιοχή μέσα στην 5' αμετάφραστη περιοχή. Η ταυτοποίηση σε επίπεδο γένους των εντεροϊών είναι κλινικά ουσιώδης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να χορηγηθούν αντιϊκές αγωγές ενώ σε πολλές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η γενотύπιση για τον καθορισμό του ακριβούς στελέχους. Ο χαρακτηρισμός με τη χρήση της RT-PCR της VP1 περιοχής έχει οδηγήσει σε φυλογενετική ανάλυση συγκεκριμένων στελεχών (Mirand et al., 2008). Η αλληλούχηση των περιοχών VP2 και VP4 έχει πραγματοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου η μοριακή αποτύπωση της VP1 περιοχής ήταν αναποτελεσματική. Αυτές οι μελέτες υποδεικνύουν ότι η RT-PCR είναι αποτελεσματική και κλινικά υλοποιήσιμη σε κλινικά δείγματα ENY (Dierssen et al., 2008). Η ποσοτική Real Time-PCR (qRT-PCR) αποτελεί μια πιο εκλεπτυσμένη μοριακή μέθοδο και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του αριθμού των αντιγράφων των εντεροϊών σε κλινικά δείγματα ENY.

1.17 ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ

Υπάρχουν δύο βασικά φαινόμενα τα οποία ευθύνονται για την εξέλιξη των εντεροϊών: οι μεταλλάξεις και ο ανασυνδυασμός.

1.17.1 Μεταλλάξεις

Στο χώρο της Βιολογίας, με τον όρο μετάλλαξη ή μεταλλαγή (mutation), χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε μεταβολή που μπορεί να συμβεί στο γενετικό υλικό. Η εμφάνιση μεταλλάξεων είναι αρκετά πιο συχνή στους RNA ιούς σε σχέση με τους DNA ιούς. Αυτή η αυξημένη τάση συσσώρευσης μεταλλάξεων στους RNA ιούς οφείλεται σε δύο πολύ βασικούς λόγους: στη χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Η χαμηλή πιστότητα αντιγραφής της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης οδηγεί σε συχνή ενσωμάτωση λάθος νουκλεοτιδίων κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου κλώνου. Μάλιστα η συχνότητα λάθους υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής (Ward et al., 1992)! Αυτά τα λάθη που δημιουργούνται κατά την αντιγραφή του ιού δεν μπορούν να διορθωθούν λόγω απουσίας των κατάλληλων επιδιορθωτικών μηχανισμών. Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων οδηγεί στη δημιουργία των quasi-species τα οποία αναλύθηκαν ανωτέρω.

Στο γονιδίωμα των εντεροϊών παρατηρούνται πολύ συχνά σημειακές μεταλλάξεις. Οι σημειακές μεταλλάξεις διακρίνονται σε δύο τύπους ανάλογα με τη φύση της αλλαγής που συμβαίνει από την αντικατάσταση μιας βάσης από μια άλλη. Ο πρώτος τύπος, είναι η μετάπτωση (transition) κατά την οποία μια πυριμιδίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πυριμιδίνη, ή μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια άλλη πουρίνη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός ζεύγους G-C με ένα ζεύγος A-T και αντίστροφα. Ο δεύτερος τύπος είναι η μεταστροφή (transversion) κατά την οποία μια πουρίνη αντικαθίσταται από μια πυριμιδίνη και αντίστροφα, έτσι ώστε ένα ζεύγος A-T να μετατρέπεται σε T-A ή C-G. Οι μεταπτώσεις αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ οι μεταστροφές το υπόλοιπο 20%. Στους πολιοϊούς η πιο συχνά παρατηρούμενη μετάλλαξη είναι A→G ενώ μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι σπάνιες (Figlerowicz et al., 2003). Γενικά οι λυτικοί ιοί εμφανίζουν έναν υψηλό ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων ο οποίος για παράδειγμα στους πολιοϊούς φτάνει τις $6,3 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής (Wimmer et al., 1993). Υπάρχουν δύο μηχανισμοί για την επικράτηση της μετάλλαξης: η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή. Συνήθως οι μεταλλάξεις που φέρουν κάποιο εξελικτικό πλεονέκτημα επικρατούν στα πλαίσια της φυσικής επιλογής. Οι κανόνες που ελέγχουν την εγκαθίδρυση των μεταλλάξεων σε έναν ιικό πληθυσμό είναι λιγότερο κατανοητοί. Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη.

Ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του ιικού RNA (Lukashev et al., 2003). Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών όπως για παράδειγμα στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της υψηλής αντιγονικής πίεσης που υφίστανται (Chakravarty et al., 2005; Yakovenko et al., 2006). Επίσης, δευτεροταγείς δομές του ιικού RNA που εμπλέκονται στην ιϊκή αντιγραφή όπως οι δομές cloverleaf και CRE ή στην ιϊκή μετάφραση δομή IRES συσσωρεύουν ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Μάλιστα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariation) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους (Wimmer et al., 1993).

1.17.2 Ανασυνδυασμός

Ο ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα συν-μολυσμένα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου (homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό:

1) Αντιγραφικός μηχανισμός (replicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιϊκό RNA και ξαφνικά σταματά και ξανασυνεχίζεται πάνω σε ένα άλλο ιϊκό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός παρατηρείται στα περισσότερα βιώσιμα ανασυνδυασμένα στελέχη τα οποία έχουν ανασυνδυαστεί μέσα στην κωδική περιοχή τους. Αντίθετα, μία μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π. χ σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιικού γενώματος (Agol 2002). Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των RNA (-) κλώνων για δύο κυρίως λόγους : i) 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 μολυσμένο κύτταρο, ii) οι

RNA (-) βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία (Agol 1997).

Όσον αφορά τον αντιγραφικό μηχανισμό, πρέπει να υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που διευκολύνουν τον τερματισμό της RNA σύνθεσης πάνω στο πρώτο εκμαγείο, το διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου κλώνου (πιθανόν μαζί με την RNA πολυμεράση) και την αναγνώριση της σωστής θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο. Ο πρώιμος τερματισμός της RNA σύνθεσης είναι πιθανόν ότι προκαλείται από κάποιες δευτεροταγείς δομές του εκμαγείου ή/και από την ενσωμάτωση ενός μη-συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου. Ο εμπλουτισμός μιας RNA περιοχής με U (και πιθανόν A) είναι πιθανόν ότι διευκολύνει το διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου RNA κλώνου μετά τον πρώιμο τερματισμό (Agol 2002). Είναι πιθανόν ότι η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο εξασφαλίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του 3' άκρου του αναπτυσσόμενου κλώνου και της συμπληρωματικής περιοχής του δεύτερου εκμαγείου. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται πως εμπλέκει μόνο λίγα νουκλεοτίδια και έτσι η σύνδεση μπορεί εύκολα να είναι μη ακριβής λόγω των πολλαπλών μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ιικό RNA. Ένας παράγοντας που ενδεχομένως μπορεί να φέρει τις κατάλληλες περιοχές των δύο εκμαγείων κοντά είναι ο σχηματισμός ενός ετεροδιμερούς από ανεστραμμένες επαναλήψεις που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές φουρκετών (Agol 1997).

2) Μη-αντιγραφικός μηχανισμός (nonreplicative): Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από τη σύνδεση προσυντιθέμενων RNA τμημάτων προερχόμενων από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Θεωρητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκύπτουν αυτά τα RNA τμήματα: i) από την πρώιμη λήξη της μετάφρασης, ii) από την αποικοδόμηση του ιικού RNA από κυτταρικές RNases, iii) από δραστικότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA. Αν και το γένωμα των πολιοϊών φέρει απαραίτητα μοτίβα ολιγονουκλεοτιδίων, μία διαμόρφωση χαρακτηριστική των ριβοενζύμων (hammerhead) είναι απίθανη αλλά ακόμα δυνατή (Agol 2002). Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστικότητα ριβοενζύμου (Agol 1997).

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στη διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου, ii) συμβάλλει στη δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση και iii) επιταχύνει

την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Wimmer et al., 1993).

1.18 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΝΕΥΡΟΜΟΛΥΣΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα εμβόλια Salk και Sabin κατά των πολιοϊών ενισχύουν αποτελεσματικά την ανοσοποίηση προστατεύοντας τον ξενιστή από μολύνσεις των πολιοϊών. Το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ) ξεκίνησε το πρόγραμμα εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας, το οποίο αποσκοπούσε στην εξάλειψη των άγριων στελεχών πολιοϊών παγκοσμίως μέχρι το έτος 2000. Υπάρχουν δύο εμβόλια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κατά των πολιοϊών τα: IPV και OPV. Το IPV (inactivated polio vaccine) είναι ένα απενεργοποιημένο εμβόλιο που προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Το IPV είναι ασφαλές και επάγει μία προστατευτική ανοσολογική απόκριση στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον ο εμβολιασμός επαναλαμβάνεται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Δυστυχώς, το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία και για αυτό δεν είναι πλήρως αποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό (Blondel et al., 1998). Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A. Sabin ύστερα από καλλιέργεια πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo* κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευρομολυσματικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b) προήλθε από το άγριο νευρομολυσματικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Friedrich, 1996).

Το εμβόλιο που επιλέχθηκε από την Π.Ο.Υ. ήταν το OPV λόγω της ισχυρής ανοσοαπόκρισης που προκαλεί και λόγω του χαμηλού του κόστους. Η χρήση του OPV σε μαζικούς εμβολιασμούς οδήγησε σε σημαντική μείωση των περιστατικών πολιομυελίτιδας οφειλόμενες σε αγρίου τύπου πολιοϊούς. Ωστόσο, το OPV έχει ένα πάρα πολύ σημαντικό μειονέκτημα και αυτό είναι η γενετική αστάθεια του. Αυτό το χαρακτηριστικό του έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση περιπτώσεων εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: vaccine-associated paralytic poliomyelitis). Η εμβολιοσυνδεδεμένη

παραλυτική πολιομυελίτιδα συμβαίνει σπάνια (περίπου 1 περιστατικό ανά 750.000 εμβολιασμένα άτομα) είτε σε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε σε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Μεταλλάξεις οι οποίες συσσωρεύονται σε θέσεις καθοριστές του εξασθενημένου και θερμοευαίσθητου φαινοτύπου των Sabin στελεχών προκαλούν την εμφάνιση εμβολιοσυνδεόμενων στελεχών πολιοϊών (VDPVs: vaccine-derived polioviruses) με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Furione et al., 1993; Georgescu et al., 1997; Cherkasova et al., 2005). Μάλιστα είναι πιθανό να προκύψουν νευρομολυσματικά στελέχη τα οποία πέραν της πολιομυελίτιδας μπορεί να προκαλέσουν και μη παραλυτικές πολιομυελίτιδες όπως ασθένειες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος μηνιγγίτιδες και εγκεφαλίτιδες.

Γενικά έχει βρεθεί ότι νευρομολυσματικά στελέχη πολιοϊών μπορούν να προκύψουν τόσο από σημειακές μεταλλάξεις όσο και από φαινόμενα ανασυνδυασμού (Pliaka et al., 2010). Ο παθογόνος χαρακτήρας των νευρομολυσματικών στελεχών σχετίζεται γενικά με δύο ειδών μεταλλάξεις. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν τον εξασθενημένο φαινότυπο στα εμβολιακά στελέχη των πολιοϊών έχει βρεθεί ότι αντιστρέφονται (μέσω μεταλλάξεων στα σημεία που αποτελούν τους καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου) ή καταστέλλονται (μέσω μεταλλάξεων σε άλλα σημεία εκτός των καθοριστών του εξασθενημένου φαινότυπου). Η απομόνωση νευρομολυσματικών στελεχών από VAPP περιπτώσεις χωρίς επαναμεταλλάξεις σε σημαντικούς καθοριστές του εξασθενημένου φαινοτύπου έχει οδηγήσει στην άποψη ότι πιθανόν οι επαναμεταλλάξεις δεν είναι απαραίτητες για την εγκαθίδρυση της ασθένειας. Είναι πιθανόν ότι άλλες μεταλλάξεις (όπως μεταλλάξεις καταστολής ή μεταλλάξεις στις αντιγονικές θέσεις) θα μπορούσαν να αυξήσουν την νευρομολυσματικότητα ή να συμμετέχουν με κάποιο τρόπο στην εγκαθίδρυση της ασθένειας (F. Friedrich 1996).

Εμβολιοσυνδεόμενοι πολιοϊοί είναι δυνατόν να εξελιχθούν σε παθογόνα μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων τόσο σε δομικά στοιχεία της VP1 (αντιγονικές θέσεις, περιοχή πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα) όσο και σε καθοριστές της εξασθένησης των Sabin εμβολιακών στελεχών στις 5'-NCR και VP1 περιοχές (Pliaka et al., 2010). Σε πολλές περιπτώσεις νευρομολυσματικών στελεχών εντοπίζονται οι μεταλλάξεις A481G, U398C και U437C στην 5'μη κωδική περιοχή (Pliaka et al., 2007). Μάλιστα, η παρουσία της A στη θέση 481 αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένησης του Sabin 2 εμβολιακού στελέχους (Friedrich 1996). Έχει βρεθεί ότι στα εμβολιασμένα άτομα, η αδενίνη στη θέση 481 υφίσταται γρήγορα αναστροφή σε γουανίνη του αγρίου-τύπου προγονικού στελέχους. Ωστόσο, μόνο το 50% των εμβολιασμένων ατόμων απεκκρίνουν

ϊικά στελέχη Sabin 1 με αναστροφή στη θέση 480 η οποία αποτελεί έναν από τους κύριους καθοριστές της εξασθένισης του Sabin 1 εμβολιακού στελέχους (Minor 1999).

1.19 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η εργαστηριακή διερεύνηση της συσχέτισης των εντεροϊών με άσηπτες μηνιγγίτιδες.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

2.1.2 Πρότυπα δείγματα

Σε αυτή την εργασία ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος Sabin2. Το ίδιο στέλεχος χρησιμοποιήθηκε επίσης ως μάρτυρας ελέγχου ευαισθησίας των πειραματικών μεθόδων καθώς ήταν γνωστός ο ιϊκός τίτλος.

2.1.3 Κλινικά δείγματα

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού μέρους της εργασίας εξετάστηκαν 51 κλινικά δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού (ΕΝΥ) για την παρουσία εντεροϊών. Η λήψη όλων των δειγμάτων ΕΝΥ έγινε με οσφυονωτιαία παρακέντηση ασθενών στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων. Στους παρακάτω πίνακες, αναγράφονται πληροφορίες των κλινικών δειγμάτων.

Σημειώνεται πως για ορισμένα δείγματα δεν υπήρχαν διαθέσιμες ορισμένες πληροφορίες. Στον πίνακα 2.1 αναγράφονται πληροφορίες για το φύλο και την ηλικία των ασθενών καθώς και για την ημερομηνία δειγματοληψίας και την κλινική προέλευσης. Όσον αφορά την κλινική προέλευσης παρακάτω παρουσιάζεται η επεξήγηση των συντομογραφιών που φαίνονται στον πίνακα.

*Π/Δ-Παιδιατρική Κλινική

*Π/Θ- Παθολογική Κλινική

*Π/Ν-Πνευμονολογική Κλινική

*Ν/Κ-Νευρολογική Κλινική

*ΤΕΠ-Τμήμα Επειγόντων Περιστατικών

*ΜΕΘ-Μονάδα Εντατικής Θεραπείας

*Ν/Χ- Νευροχειρουργική Κλινική

Δείγμα	Γένος	Ηλικία	Ημ/νια δειγματοληψίας	Κλινική προέλευσης
LEV1	Θήλυ	-	24/6/2009	-
LEV2	-	-	-	-
LEV3	-	-	-	-
LEV4	Θήλυ	32	19/11/2009	N/K
LEV5	Άρρεν	-	17/1/2010	ΜΕΘ
LEV6	Άρρεν	47	3/12/2009	N/K
LEV7	Άρρεν	-	19/1/2010	Π/Δ
LEV8	Άρρεν	25	20/7/2010	ΤΕΠ
LEV9	Άρρεν	1	5/8/2009	Π/Δ
LEV10	Άρρεν	-	9/12/2009	Π/Θ
LEV11	Θήλυ	77	5/1/2010	Π/Θ
LEV12	Θήλυ	-	-	-
LEV13	Θήλυ	2	1/10/2009	Π/Δ
LEV14	Θήλυ	23	23/9/2009	N/K
LEV15	Άρρεν	71	3/2/2010	N/K
LEV16	Θήλυ	26	12/6/2009	N/K
LEV17	Θήλυ	30	5/1/2010	N/K
LEV18	Άρρεν	35	20/9/2009	ΤΕΠ
LEV19	Άρρεν	-	21/9/2009	N/K
LEV20	Άρρεν	28	19/2/2010	N/K
LEV21	Θήλυ	26	4/6/2010	N/K
LEV22	Άρρεν	-	-	Π/Δ
LEV23	Θήλυ	-	-	Π/Δ
LEV24	Θήλυ	40	24/8/2009	N/K
LEV25	Άρρεν	2	2/11/2009	Π/Δ
LEV26	Άρρεν	57	5/11/2009	N/K
LEV27	Άρρεν	13	1/8/2009	Π/Δ
LEV28	Θήλυ	28	9/12/2009	N/K
LEV29	Θήλυ	65	12/1/2010	N/K
LEV30	Θήλυ	36	22/6/2009	N/K
LEV31	Άρρεν	85	-	Π/Θ
LEV32	Άρρεν	48	9/7/2009	Π/N
LEV33	Θήλυ	72	-	N/X
LEV34	Θήλυ	86	11/11/2009	Π/Θ
LEV35	Άρρεν	81	24/1/2010	Π/Θ
LEV36	Άρρεν	71	19/8/2009	N/K
LEV37	Θήλυ	27	21/12/2009	N/K
LEV38	Θήλυ	36	14/7/2009	N/K
LEV39	Θήλυ	29	15/12/2009(2ο δείγμα)	N/K
LEV40	Άρρεν	34	20/11/2009	N/K
LEV41	Άρρεν	35	25/9/2009	ΤΕΠ
LEV42	Θήλυ	39	22/7/2009	N/K
LEV43	Θήλυ	74	18/12/2009	ΤΕΠ
LEV44	Θήλυ	-	8/1/2010	-
LEV45	Άρρεν	34	-	N/K
LEV46	Άρρεν	81	1/2/2010	Π/Θ
LEV47	Θήλυ	-	13/8/2009	-
LEV48	Άρρεν	2	12/12/2009	Π/Δ
LEV49	Άρρεν	31	17/9/2009	N/K
LEV50	Θήλυ	17	3/12/2009	Π/Δ
LEV51	Άρρεν	1	3/12/2010	Π/Δ

Πίνακας 2.1: Πληροφορίες κλινικών δειγμάτων ENY.

Δείγμα	Κύτταρα	Τύπος	Glu (ENY)	Pro (ENY)
LEV1	275	90% λεμφοκ	-	-
LEV2	-	-	-	-
LEV3	-	-	-	-
LEV4	7	Αδυνατος	77	24
LEV5	40	-	-	-
LEV6	40	80% λεμφοκ.	66	42
LEV7	7	70% λεμφοκ.		-
LEV8	7	Αδυνατος	75	34
LEV9	7	Αδυνατος	47	61
LEV10	7	Αδυνατος	-	-
LEV11	10	90% πολυμορφ	74	32
LEV12	12	-	-	-
LEV13	18	-	51	43
LEV14	10	Αδυνατος	58	24
LEV15	106	70% λεμφοκ.	63	85
LEV16	-	-	59	60
LEV17	18	70% λεμφοκ	61	28
LEV18	50	90% λεμφοκ	69	64
LEV19	15	100% λεμφοκ.	63	43
LEV20	27	100% λεμφοκ.	59	54
LEV21	80	80% λεμφοκ.	54	110
LEV22	10	85% Λεμφ	-	-
LEV23	65	-	-	-
LEV24	7	100% λεμφοκ	54	36
LEV25	7	70% λεμφοκ	75	20
LEV26	20	100% λεμφοκ	60	64
LEV27	975	80% λεμφοκ.	63	59
LEV28	115	90% λεμφοκ	68	29
LEV29	10	70%πολυμορφ	89	63
LEV30	15	80% λεμφοκ.	55	50
LEV31	12	λεμφοκ.	79	27
LEV32	10	100% Λεμφοκ.	75	66
LEV33	90	λεμφοκ.	44	46
LEV34	47	80% λεμφοκ.	87	81
LEV35	7	Αδυνατος	109	161
LEV36	7	Αδυνατος	75	46
LEV37	10	80% λεμφοκ.	49	25
LEV38	15	100% Λεμφοκ	56	38
LEV39	85	λεμφοκ.	54	55
LEV40	15	80% λεμφοκ	70	51
LEV41	155	95% Λεμφ	62	32
LEV42	8	-	72	21
LEV43	2782	100% Πολυμ	10	496
LEV44	680	97% λεμφοκ	54	160
LEV45	12	λεμφοκ.	65	44
LEV46	10	85% Λεμφ	88	54
LEV47	10	80% λεμφοκ	-	-
LEV48	12	78% λεμφοκ.	61	27
LEV49	7	Αδυνατος	60	47
LEV50	502	60% πολυμορφ	63	24
LEV51	32	65%λεμφοκ.	56	90

Πίνακας 2.2: Πληροφορίες κλινικών δειγμάτων ENY.

2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού, RNA, έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες του ΚΙΤ «QIAamp RNA kit» της Qiagen. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η εκχύλιση πραγματοποιήθηκαν με τη σειρά τα παρακάτω βήματα:

ΒΗΜΑ 1

Σε eppendorf των 2 ml προστέθηκαν 560μl προετοιμασμένου Buffer AVL το οποίο περιείχε carrier RNA.

ΒΗΜΑ 2

Προστέθηκαν 140μl κλινικού δείγματος ENY στο Buffer AVL- carrier RNA, ακολούθησε vortex για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (15-25 °C) για 10 λεπτά.

ΒΗΜΑ 3

Προστέθηκαν 560μl αιθανόλης (96-100%) και ακολούθησε ξανά vortex του δείγματος για 15 δευτερόλεπτα.

ΒΗΜΑ 4

Προστέθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή 630μl από το διάλυμα του προηγούμενου βήματος σε μια ειδική στήλη με ένα eppendorf συλλογής 2ml (QIAamp Mini spin column). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 8.000rpm και έπειτα τοποθέτηση της στήλης σε ένα νέο eppendorf και απομάκρυνση του eppendorf ,με το φιλτραρισμένο διάλυμα.

ΒΗΜΑ 5

Επαναλήφθηκε το βήμα 4.

ΒΗΜΑ 6

Προστέθηκαν 500μl Buffer AW1 στη στήλη και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 8.000rpm για ένα λεπτό. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό eppendorf των 2ml και απομακρύνθηκε το eppendorf, με το φιλτραρισμένο διάλυμα.

ΒΗΜΑ 7

Προστέθηκαν 500μl Buffer AW2 και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.

ΒΗΜΑ 8

Η στήλη τοποθετήθηκε σε ένα καθαρό eppendorf των 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 λεπτό.

ΒΗΜΑ 9

Η στήλη μεταφέρθηκε σε ένα νέο eppendorf και στη συνέχεια προστέθηκαν 60μl Buffer AVE. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 8.000rpm.

Τέλος, απομακρύνθηκε η στήλη και αποθηκεύτηκε το eppendorf στους -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο του πειράματός μας, αυτό της αντίστροφης μεταγραφής.

Παρατηρήσεις:

Το Buffer AVL περιέχει θειοκυανιούχο γουανιδίνη (guanidine thiocyanate) και προκαλεί τη λύση των κυττάρων του δείγματος καθώς δημιουργεί υψηλά αποδιατακτικές συνθήκες και έτσι παρεμποδίζεται η δράση των RNAασών και διασφαλίζεται η απομόνωση του άθικτου ιϊκού RNA. Προτού χρησιμοποιηθεί το Buffer AVL προστίθεται ποσότητα carrier RNA με σκοπό αφ' ενός να βελτιωθεί η επικείμενη πρόσδεση του ιϊκού RNA στην QIAamp μεμβράνη (σημαντικό ιδιαίτερα στις περιπτώσεις χαμηλού ιϊκού τίτλου του δείγματος όπως συμβαίνει στις μηνιγγίτιδες) και αφ' ετέρου προκειμένου να περιοριστεί η πιθανή αποδιάταξη του ιϊκού RNA από εναπομείνουσες RNAσες .

Το Buffer AW1 περιέχει άλατα υδροχλωριδίου γουανιδίνης (guanidine hydrochloride) και μαζί με το Buffer AW2 αποτελούν τα διαλύματα που απαιτούνται για την έκπλυση στη διαδικασία και πριν χρησιμοποιηθούν τοποθετείται ποσότητα αιθανόλης (96-100%). Η χρήση δύο διαφορετικών διαλυμάτων έκπλυσης βελτιώνει σημαντικά την καθαρότητα του εκλούόμενου RNA.

Η έκπλυση στο τέλος γίνεται με το Buffer AVE. Το Buffer AVE είναι ένα διάλυμα χωρίς RNAαση το οποίο περιέχει 0.04% αζίδιο του νατρίου (sodium azide) το οποίο αποσκοπεί στην παρεμπόδιση τυχόν μικροβιακής ανάπτυξης και επακόλουθης μόλυνσης με RNAσες. Το αζίδιο του νατρίου επηρεάζει την φασματοσκοπική απορρόφηση μεταξύ 220 και 280 nm αλλά δεν έχει καμία επίδραση σε μετέπειτα διαδικασίες, όπως είναι η RT-PCR.

2.3 ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται τα ζευγάρια εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι περιοχές με τις οποίες υβριδοποιούνται.

Όνομα	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Θέση	Βιβλιογραφική αναφορά
UG₅₂	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	166-188	Georgopoulou et al. (2000)
UC₅₃	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	588-606	Georgopoulou et al., 2000
UG₅₂ FLAP	AATAAATCATAACAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	168-188	*
UC₅₃ FLAP	AATAAATCATAATTGTCACCATAAGCAGCCA	Antisense	588-606	*
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	Sense	2602-2627	Nix et al., 2006
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Antisense	2977-2951	Nix et al., 2006
EUG3a	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Sense	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3b	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Sense	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3c	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Sense	2946-2965	Caro et al., 2001
EUC2	TTTGCACTTGAACGTATGTA	Antisense	4413-4433	Caro et al., 2001
EUC2a	GGTTC AATACGGCATTG	Antisense	4428-4448	Caro et al., 2001
EUC2b	GGTTC AATACGGTGTGTTGCT	Antisense	4428-4448	Caro et al., 2001

Πίνακας 2.3: Κατάλογος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν.

*Σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Τα ζεύγη των εκκινητών UG₅₂/UC₅₃, UG₅₂-FLAP/UC₅₃-FLAP υβριδοποιούνται στην 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR) και δίνουν προϊόν ενίσχυσης 439 βάσεων. Για την VP1 περιοχή, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88, το οποίο ενισχύει ένα τμήμα 376 βάσεων στην VP1 περιοχή. Τέλος, το ζευγάρι EUG3a,b,c/EUC2 ενισχύει ένα τμήμα 1488 βάσεων το οποίο αντιστοιχεί στο τέλος της VP1 περιοχής μέχρι και την αρχή της 2C γενωμικής περιοχής.

2.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription) επιτυγχάνεται η μετατροπή του RNA σε cDNA (complementary DNA) με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase). Επομένως, προκειμένου να ενισχύσουμε μια συγκεκριμένη περιοχή του γενετικού υλικού των εντεροϊών με PCR, εφ' όσον το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA πρέπει να πραγματοποιήσουμε τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής.

Η διαδικασία έχει ως εξής: Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει random primers d(N9) (Bioline) (50nmol/ μl) (1μl/tube), 40mM dNTPs (1μl/tube) και διπλά απιονισμένο νερό απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες (ddH₂O) (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (δείγμα που προέκυψε από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5min. 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 (20units/μl) (0,5μl/tube), RT (Invitrogen) (100units/μl) (0,5μl/tube) και ddH₂O (1μl/tube). Στη συνέχεια, προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή όπου παρέμειναν για 12 λεπτά στους 25 °C, για 50 λεπτά στους 42 °C και για 15 λεπτά στους 70 °C.

Στη διαδικασία που περιγράφηκε ανωτέρω χρησιμοποιήθηκαν τυχαίοι εκκινητές, δηλαδή εκκινητές που υβριδοποιούνται σε τυχαίες περιοχές του γενώματος. Ωστόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων της παρούσης εργασίας χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών EUC2-EUG3Aa,b,c τα οποία απαιτούν την πραγματοποίηση αντίστροφης μεταγραφής με τούς εκκινητές EUC2a και EUC2b. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον διαδικασία αντίστροφης μεταγραφής με τα αντικωδικά εκκινητικά μόρια EUC2a EUC2b σε συγκέντρωση 10pmol και σε θερμοκρασία επώασης 37 °C, αντί των 42 °C (Caro et al., 2001).

2.5. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.5.1 PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος και επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό αυτής της περιοχής μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους. Πρόκειται για μια in vitro διαδικασία η οποία είναι τόσο ευαίσθητη που μπορεί κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες να πολλαπλασιάσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA. Με τη χρήση συγκεκριμένων εκκινητικών μορίων (primers) μπορούμε να απομονώσουμε και να πολλαπλασιάσουμε μια επιθυμητή νουκλεοτιδική αλληλουχία.

Τα ζευγάρια των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν σε προηγούμενη ενότητα.

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: διάλυμα dNTPs 10mM , διάλυμα MgCl₂ (η τελική συγκέντρωση των dNTPs και του MgCl₂ σε κάθε πρωτόκολλο παρουσιάζεται στους πίνακες 2.4-2.7), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2,5 Units ενζύμου Taq πολυμεράσης (Paq.5000, Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος, σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA από κάθε δείγμα. Κάθε αντίδραση PCR καθορίζεται από τρία βασικά στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται (n) φορές ανάλογα με το πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται. Το πρώτο αφορά την αποδιάταξη του μορίου στόχου στους 95 °C για 5 λεπτά και ακολουθούν το στάδιο της υβριδοποίησης των εκκινητών και της επιμήκυνσης του νεοσυντιθέμενου κλώνου ο χρόνος και η θερμοκρασία των οποίων εξαρτάται από το ζευγάρι εκκινητών. Συγκεκριμένα, οι θερμοκρασίες τήξεως των δύο εκκινητών είναι παρόμοιες γι αυτό χρησιμοποιείται ο εξής κατά προσέγγιση υπολογισμός: 2 °C για κάθε A ή T και 4 °C για κάθε G ή C. Με αυτόν τον υπολογισμό είναι επιθυμητό η θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών να βρίσκεται μεταξύ 55 °C και 60 °C.

Χρησιμοποιήσαμε τους εκκινητές που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.3 καθώς επιθυμούσαμε να ενισχύσουμε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος των εντεροϊών. Ωστόσο πέραν του διαφορετικού πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήσαμε ανάλογα με το ζεύγος των εκκινητών δοκιμάσαμε διαφορετικά πρωτόκολλα επιπλέον για κάθε ζεύγος. Αυτό ήταν απαραίτητο καθώς τα υπό μελέτη δείγματα ENY αναμενόταν να έχουν ιδιαίτερα χαμηλό ιικό φορτίο και συνεπώς υπήρχε η ανάγκη εύρεσης ενός πρωτοκόλλου που θα επιτρέπει την δυνατή μεγαλύτερη ευαισθησία. Ο έλεγχος της ευαισθησίας των πρωτοκόλλων έγινε με τη βοήθεια του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 2. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαφορετικά πρωτόκολλα που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε ζεύγος εκκινητών στην κάθε PCR:

● Εκκινητές UG52/UC53

dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες PCR	
1 mM	2 mM	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	40 κύκλοι

Πίνακας 2.4: Συνθήκες αντίδρασης PCR

● Εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP

Τα στάδια της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης ήταν ίδια για όλα τα πρωτόκολλα:

Συνθήκες αποδιάταξης: 95 °C για 30sec

Συνθήκες επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec

Αντίδραση	dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες υβριδισμού	Αριθμός κύκλων
1	1 mM	2 mM	63 °C για 30sec	40
2	1,5mM	3mM	63 °C για 30sec	50
3	1,5mM	3mM	50 °C για 30sec	50
4	1,5mM	4mM	50 °C για 30sec	50

Πίνακας 2.5: Συνθήκες αντίδρασης PCR

● Εκκινητές AN89/AN898

Τα στάδια της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης ήταν ίδια για όλα τα πρωτόκολλα:

Συνθήκες αποδιάταξης: 95 °C για 30sec

Συνθήκες επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec

Αντίδραση	dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες υβριδισμού	Αριθμός κύκλων
1	1 mM	2 mM	65 °C για 30sec	40
2	1mM	2mM	50 °C για 30sec	50

Πίνακας 2.6: Συνθήκες αντίδρασης PCR

Εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2

dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες PCR	
1 mM	2 mM	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 42 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec	50 κύκλοι

Πίνακας 2.7: Συνθήκες αντίδρασης PCR

2.5.2 Autonested PCR

Επειδή, όπως προαναφέρθηκε το ιικό φορτίο στα υπό μελέτη δείγματα είναι χαμηλό υπήρξε η ανάγκη αύξησης της ειδικότητας της ενίσχυσης του γονιδιακού προϊόντος. Γι' αυτό το λόγο, το προϊόν της PCR με τα εκκινητικά μόρια UG52-FLAP/UC53-FLAP υποβλήθηκε σε μια δεύτερη PCR με τα ίδια εκκινητικά μόρια αλλά με διαφορετικές συνθήκες. Η δεύτερη PCR ονομάζεται autonested PCR. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3μl της απλής (πρώτης) PCR, 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2 Units ενζύμου Taq πολυμεράσης (Paq.5000, Stratagene) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl.

Εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP

Τα στάδια της αποδιάταξης και της επιμήκυνσης ήταν ίδια σε όλα τα πρωτόκολλα:

Συνθήκες αποδιάταξης: 95 °C για 30sec

Συνθήκες επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec

Αντίδραση	dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες υβριδισμού	Αριθμός κύκλων
PCR	1,5mM	3mM	63 °C για 30sec	50
1.Autonested PCR	1mM	2mM	63 °C για 30sec	25
2.Autonested PCR	1mM	2mM	63 °C για 30sec	30
3.Autonested PCR	1mM	2mM	63 °C για 30sec	35

Πίνακας 2.8: Συνθήκες αντίδρασης PCR

● Εκκινητές AN89/AN898

Τα στάδια της αποδιάταξης και του επιμήκυνσης ήταν ίδια σε όλα τα πρωτόκολλα:

Συνθήκες αποδιάταξης: 95 °C για 30sec

Συνθήκες επιμήκυνσης: 72 °C για 30sec

Αντίδραση	dNTPs	MgCl ₂	Συνθήκες υβριδισμού	Αριθμός κύκλων
PCR	1 mM	2 mM	65 °C για 30sec	40
Autonested PCR	1,5mM	3mM	65 °C για 30sec	40

Πίνακας 2.9: Συνθήκες αντίδρασης PCR

2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης. Το πήκτωμα αγαρόζης ήταν συγκέντρωσης 2%, αποτελούμενο από 1,2gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA) ή συγκέντρωσης 1%, αποτελούμενο από 0,6gr αγαρόζης σε 60ml TBE (Tris Boric EDTA) λόγω του μεγάλου μεγέθους του ενισχυμένου προϊόντος. Επίσης, προστέθηκαν 85μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl) το οποίο είναι απαραίτητο καθώς προσδένεται στο DNA και το καθιστά έτσι εμφανές σε υπεριώδη ακτινοβολία. Στα «πηγαδάκια» του πηκτώματος φορτώσαμε 10μl από κάθε PCR προϊόν αναμεμιγμένα με κατάλληλο διάλυμα χρωστικής ώστε να μπορούμε να παρακολουθούμε την πορεία της ηλεκτροφόρησης. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 5μl μάρτυρα μοριακού βάρους της εταιρίας INVITROGEN (100 bp DNA Ladder). Το πήκτωμα τοποθετείται σε κατάλληλη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE και τέλος εφαρμόζεται τάση 90-120V. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζεται σε κατάλληλη συσκευή υπεριωδών ακτίνων.

2.7 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Από το προϊόν της κάθε PCR, 40 μl ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Οι αντίστοιχες ζώνες των προϊόντων της PCR κόβονται από το πήκτωμα και μεταφέρονται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου errendorf των 2ml. Ακολουθεί καθαρισμός των PCR προϊόντων από το πήκτωμα αγαρόζης, με το PCR clean up Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συνοπτικά με τη χρήση του συγκεκριμένου kit επιτυγχάνεται η διάλυση της αγαρόζης και η δέσμευση του επιθυμητού

PCR προϊόντος σε ειδική στήλη, από την οποία λαμβάνεται μέσω έκλουσης μετά την προσθήκη διαλύματος χαμηλής ιοντικής ισχύος.

2.8 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR

Πριν τη μοριακή κλωνοποίηση των PCR προϊόντων των εντεροϊών είναι απαραίτητα τα εξής στάδια: i) ο καθαρισμός των PCR προϊόντων (με την διαδικασία που προαναφέρθηκε) για την απομόνωση των ειδικών ζωνών, ii) η πραγματοποίηση *autonested* PCR με την GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega, USA) η οποία επιτρέπει την προσθήκη συμπληρωματικών με την περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης πολύ (A) μονόκλωνων άκρων και iii) καθαρισμός των προϊόντων της *autonested* GoTaq PCR για την απομόνωση των ειδικών ζωνών. Το μίγμα της GoTaq PCR αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της απλής ή της *autonested* PCR το οποίο έχει καθαριστεί από το πήκτωμα αγαρόζης, 2μl των αντίστοιχων κάθε φορά εκκινητών (1μl από τον καθένα με συγκέντρωση 50pmol), 10μl 5x ρυθμιστικού διαλύματος (Colorless Go Taq FlexiBuffer), 5μl μίγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 1.25 units GoTaq Flexi DNA πολυμεράση (Promega, USA), 4μl MgCl₂ 25mM και ddH₂O ελεύθερου νουκλεασών (Sigma, USA) μέχρι τελικό όγκο 50μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95°C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης στους 95°C για 1 min, υβριδοποίησης για 30 sec (η θερμοκρασία εξαρτάται από το ζεύγος των εκκινητών) και επιμήκυνσης στους 72°C για 1 min, για 20 κύκλους. Το τελικό στάδιο περιλαμβάνει επώαση για 5 min στους 72°C. Μετά τον καθαρισμό των προϊόντων της *autonested* GoTaq PCR ακολούθησε η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης η οποία περιλαμβάνει τα ακόλουθα τέσσερα κύρια στάδια.

1° : Αντίδραση λιγάσης

Η αντίδραση αυτή επιτρέπει την ενσωμάτωση του ενισχυμένου γενωμικού τμήματος από τις αντιδράσεις PCR στο πλασμίδιο -φορέα κλωνοποίησης. Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pGEM®-T Easy Vector System (Promega, USA), ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση PCR προϊόντων (εικόνα 2.1). Ο φορέας αυτός περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη (polylinker) όπου υπάρχει η θέση ενσωμάτωσης με μονόκλωνες ουρές poly(T). Τα PCR προϊόντα που πρόκειται να κλωνοποιηθούν έχουν στα άκρα τους poly(A) μονόκλωνες ουρές (συμπληρωματικά άκρα) από την αντίδραση της *autonested* GoTaq PCR. Συνεπώς, η T4 DNA Ligase βακτηριοφάγου (Promega, USA) που χρησιμοποιήθηκε καταλύει την σύνδεση των συμπληρωματικών άκρων, η

συμπληρωματικότητα των οποίων επιτρέπει στα δύο δίκλινα μόρια DNA να ενωθούν μέσω των φωσφοδιεστερικών δεσμών που δημιουργεί η λιγάση ανάμεσα στο 3' υδροξύλιο και την διπλανή 5' φωσφορική ομάδα του DNA, καταλήγοντας στην ένθεση του PCR προϊόντος στην περιοχή ένθεσης του φορέα κλωνοποίησης. Η αντίδραση λιγάσης έλαβε χώρα στους 25°C για 2h. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 1μl pGEM®-T Easy Vector 50ng, 3μl προϊόντος της auto-nested GoTaq PCR, 5 μl 2x Rapid Ligation Buffer και 3 units T4 DNA Ligase (Promega, USA).

2° : Παραγωγή δεκτικών κυττάρων με τη χρήση χλωριούχου ασβεστίου

Για την ανάπτυξη των ανασυνδυασμένων φορέων κλωνοποίησης χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά κύτταρα E.coli DH5α. Η μετάλλαξη φ80 lacZ ΔM15 στην αλληλουχία του γενώματος των βακτηριακών κυττάρων, επιτρέπει α-συμπληρωματικότητα με το αμινοτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης (τμήμα α) που κωδικοποιείται από τον φορέα κλωνοποίησης. Το τμήμα Ω της β-γαλακτοσιδάσης κωδικοποιείται από το βακτηριακό γένωμα, ωστόσο απαιτείται και το τμήμα α για τον σχηματισμό ενεργού ενζύμου, το οποίο κωδικοποιείται από τον φορέα και μέσα στον οποίο υπάρχει η περιοχή πολυσυνδέτη, η παρουσία της οποίας όμως δεν διαταράσσει το αναγνωστικό πλαίσιο. Αρχικά, από απόθεμα γλυκερόλης στους -80°C συλλέχθηκαν βακτηριακά κύτταρα, μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένου μέσου ανάπτυξης LB Broth (20g/L, Sigma, USA) και ακολούθησε επώαση για 16h (overnight) στους 37°C στις 210rpm. Στη συνέχεια, 1 ml από την καλλιέργεια αυτή μεταφέρθηκε σε 50 ml LB Broth και ακολούθησε επώαση για 2h στους 37°C στις 210rpm. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε λήψη 1 ml από την καλλιέργεια έτσι ώστε να μετρηθεί η απορρόφηση σε OD₆₀₀ και να σταματήσουμε την κυτταρική ανάπτυξη όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση αύξησης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450-0,550A. Όταν τα κύτταρα έφτασαν στο κατάλληλο σημείο ανάπτυξης τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10 min. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C και στο τέλος της φυγοκέντρησης αποχύθηκε το υπερκείμενο. Στη συνέχεια, διαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 14 ml παγωμένου CaCl₂ συγκέντρωσης 0,1M και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min στους 4°C, στο τέλος της οποίας αποχύθηκε το υπερκείμενο. Τέλος, διαλυτοποιήθηκε το ίζημα σε 2,5 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1M. Διάλυμα 0,1M CaCl₂: 0,55g CaCl₂ (Sigma, USA) διαλύονται σε ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 50ml.

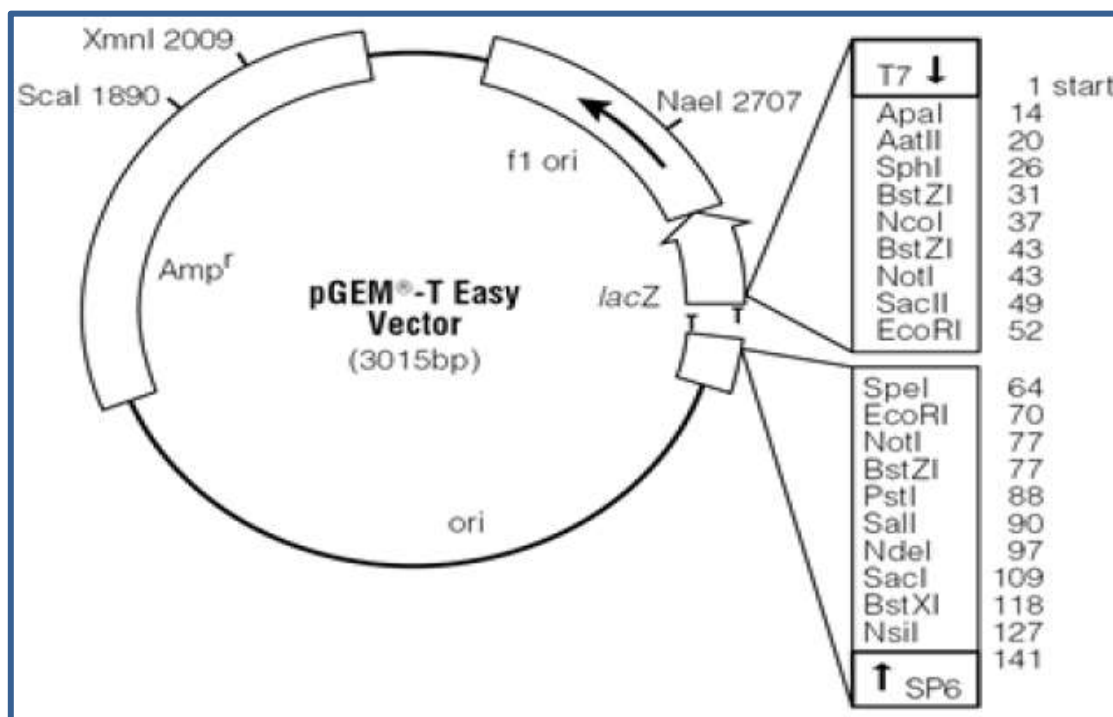
3ο : Μετασχηματισμός επιδεκτικών κυττάρων

Η διαδικασία ενσωμάτωσης του ανασυνδυασμένου φορέα κλωνοποίησης στα επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα ξεκινά με τη μεταφορά, για κάθε δείγμα, 200 μl από τα δεκτικά κύτταρα σε πλαστικούς σωλήνες των 500 μl. Ακολούθησε προσθήκη του μισού ποσού της αντίδρασης λιγάσης κάθε δείγματος στον αντίστοιχο πλαστικό σωλήνα και ύστερα από ήπια ανάδευση, τοποθετήθηκαν στον πάγο για 30 min. Έπειτα οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο προθερμασμένο στους 42°C για 90 sec ακριβώς και ακολούθως μεταφέρθηκαν γρήγορα στον πάγο για 2 λεπτά (heat shock). Στη συνέχεια, 200 μl των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων μεταφέρθηκαν σε πλαστικό σωλήνα των 15 ml (falcon) με 800 μl LB Broth και επώαστηκαν στους 37°C στις 180rpm για 1 ώρα (επαναφορά πλασματικής μεμβράνης των βακτηριακών κυττάρων «επούλωση»). Εν συνεχεία, 300 μl από την κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τριβλίο που περιείχε LB Agar (30g/L, Scharlau, Spain) και αμπικιλίνη 1,5 μl/ml LB Agar (6,6 mg/ml) και προστέθηκαν 12 μl X-gal (50 mg/ml, Promega, USA), ενώ ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C. Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό αμπικιλίνη, η οποία παρεμβαίνει στη διασύνδεση των μονάδων πεπτιδογλυκάνης και αναστέλλει τη σύνθεση του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος. Έτσι, αποκλείεται η ανάπτυξη άλλων βακτηριακών κυττάρων στο τριβλίο καλλιέργειας πέραν όσων έχουν μετασχηματιστεί με τον φορέα κλωνοποίησης. Επίσης, στα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν, όταν αυτά αναπτύσσονται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την άχρωμη χημική ουσία 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολ-β-D-γαλακτοσίδιο (X-gal), η διάσπαση της ουσίας αυτής από την β-γαλακτοσιδάση παράγει ένα αδιάλυτο προϊόν μπλε χρώματος. Έτσι, όταν στον φορέα κλωνοποίησης δεν έχει εισαχθεί στην περιοχή πολυσυνδέτη το επιθυμητό ένθεμα, το τμήμα α της β-γαλακτοσιδάσης παράγεται, σχηματίζεται το ενεργό ένζυμο και το X-gal διασπάται παράγοντας αποικίες μπλε χρώματος. Όταν όμως έχει γίνει ένθεση του PCR προϊόντος στην περιοχή πολυσυνδέτη, το αναγνωστικό πλαίσιο του τμήματος α της β-γαλακτοσιδάσης διαταράσσεται, δεν παράγεται ενεργό ένζυμο και οι αποικίες είναι άχρωμες (λευκές).

Σύμφωνα με την παραπάνω αρχή, έγινε συλλογή λευκών αποικιών και συγκεκριμένα δύο από κάθε τριβλίο καλλιέργειας, δηλαδή από κάθε δείγμα. Έπειτα, κάθε αποικία μεταφέρθηκε σε 2 ml LB Broth (20g/L) με αμπικιλίνη 1,5μl/ml LB Broth (6,6mg/ml) και ακολούθησε επώαση για 16h στους 37°C σε 210 στροφές/λεπτό. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, έτσι ώστε να απομονωθεί ο ανασυνδυασμένος φορέας που περιείχαν οι λευκές αποικίες.

4° : Πέψη με EcoRI

Για την επιβεβαίωση της ένθεσης ολόκληρου του ενθέματος στην θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του φορέα κλωνοποίησης, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI, του οποίου θέσεις αναγνώρισης στον πλασμιδιακό φορέα υπάρχουν μόνο εκατέρωθεν της θέσης ενσωμάτωσης στον πολυσυνδέτη. Για την αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 4 μl από το εκχυλισμένο πλασμιδιακό DNA, 2μl 10x Buffer, 1 μl Restriction Enzyme EcoRI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και 13 μl ddH₂O έτσι ώστε ο συνολικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2h, ενώ με το πέρας της επώασης προστέθηκαν 3 μl 10x Loading Buffer για να σταματήσει η αντίδραση. Τα 23 μl που προέκυψαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Για τον προσδιορισμό του μήκους των επιθυμητών προϊόντων χρησιμοποιήθηκε ο μάρτυρας μοριακού βάρους, 100 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε 120 Volts, 50mA για περίπου 1 ώρα. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε.



Εικόνα 2.1: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM®-T Easy Vector System. Φαίνονται τα γονίδια ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και β-γαλακτοσιδάσης καθώς και οι θέσεις κοπής της EcoRI.

2.9 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Η αλληλούχιση των κλωνοποιημένων PCR δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (τμήμα ανοσολογίας και ιστοσυμβατότητας).

2.10 ΑΝΑΛΥΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Αφού αλληλουχήθηκαν τα δείγματά μας, τα επεξεργαστήκαμε με κατάλληλα προγράμματα βιοπληροφορικής. Το σύνολο των δειγμάτων που επεξεργαστήκαμε ήταν δύο, το LEV22 και το LEV32.

Οι αλληλουχίες παραλαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος και πριν προχωρήσουμε στην επεξεργασία τους έγινε έλεγχος και διόρθωση τυχόν λαθών.

Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα **BLAST** μέσω του οποίου αναζητείται η κοντινότερη αν όχι όμοια αλληλουχία. Η αναζήτηση πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στη διεθνή τράπεζα δεδομένων (GenBank), με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Ο αλγόριθμος BLAST αναζητά στη GenBank κατατεθειμένες αλληλουχίες ή τμήματα αυτών, οι οποίες παρουσιάζουν υψηλή ομολογία με την υπό μελέτη αλληλουχία. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοίχισεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης καταγράφονται με μορφή πίνακα. Στον πίνακα αυτόν παρουσιάζονται τελικά οι κοντινότερες αλληλουχίες με αυτές του δείγματός μας, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης, κι επομένως ομολογίας.

Έπειτα ακολούθησε επεξεργασία με το πρόγραμμα **ClustalW** (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Με αυτό το πρόγραμμα πραγματοποιήθηκαν οι «ομοπαράθεσεις» των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των δειγμάτων μας με την αλληλουχία του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 2 (AY184219). Μέσω των στοίχισεων κατέστη δυνατή η ανίχνευση μεταλλάξεων στα υπό μελέτη κλινικά στελέχη.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

● Ζεύγος εκκινητών EUG3a,b,c/EUC2

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε με τους συγκεκριμένους εκκινητές δεν παρουσίαζε την ανάλογη ευαισθησία που ήταν απαραίτητη για τα δεδομένα μας, καθώς είχαμε ευαισθησία 10^5 TCID₅₀/0,1ml. Όπως έχει αναφερθεί ήδη λόγω του χαμηλού ιϊκού φορτίου των δειγμάτων μας απαιτείται πρωτόκολλο με αυξημένη ευαισθησία

● Ζεύγος εκκινητών AN89/AN898

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε με αυτούς τους εκκινητές παρουσίασε καλή ευαισθησία, 1TCID₅₀/0,1ml. Εφαρμόστηκε σε όλα τα δείγματά μας, αλλά δεν πήραμε κανένα θετικό αποτέλεσμα καθώς η VP1 γενωμική περιοχή είναι εξαιρετικά ποικιλόμορφη.

● UG₅₂/ UC53

Η ευαισθησία της αντίδρασης με αυτούς τους εκκινητές έφτανε το 1TCID₅₀/0,1ml αλλά δεν εφαρμόστηκε τελικά στα κλινικά δείγματα καθώς με τους εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP (οι οποίοι ενισχύουν την ίδια περιοχή) είχαμε ελαφρώς μεγαλύτερη ευαισθησία.

● UG52-FLAP/UC53-FLAP

Τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν με αυτούς τους εκκινητές είχαν ευαισθησία 0,1 TCID₅₀/0,1ml και επομένως εφαρμόστηκαν σε όλα τα δείγματα.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα δείγματα τα οποία ανιχνεύθηκαν με τους εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP (autonested PCR):

Δείγμα	Περιοχή ενίσχυσης	Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ηλικία ασθενή	Τόπος διαμονής
LEV22	5' UTR	2/2/2010	13	Ιωάννινα
LEV23	5' UTR	23/12/2009	1	Ιωάννινα
LEV25	5' UTR	2/11/2009	2	Μαύρικα Καρδίτσας
LEV26	5' UTR	5/11/2009	57	Ιωάννινα
LEV32	5' UTR	9/7/2009	48	Ιωάννινα
LEV35	5' UTR	24/1/2010	81	Κόνιτσα
LEV45	5' UTR	11/8/2009	34	Ιωάννινα
LEV51	5' UTR	3/2/2010	1	Φιλιππιάδα

Πίνακας 3.1 Κλινικά δείγματα τα οποία ανιχνεύθηκαν με τους εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP.

3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των δύο δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν για στοίχιση με τη χρήση του προγράμματος Clustalw με τις αλληλουχίες του κατατιθέμενου πρότυπου στελέχους Sabin 2 προκειμένου να ανιχνεύσουμε πιθανές νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις.

Παρακάτω απεικονίζεται η στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του PCR προϊόντος UG52-FLAP/UC53-FLAP του δείγματος LEV 22 με την 5' UTR αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin 2 (AY184219).

Διπλωματική εργασία – Δασταμάνη Μεταξία

LEV22	-----	
S2	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCCAGAGGCCACGTGGCGGCTAGCACTCCGGT	60
LEV22	-----	
S2	ATTACGGTACCCTTGTGCGCCTGTTTATACTCCCCTCCCGCAACTTAGAAGCACGAAAC	120
LEV22	-----AACAAGCACTTCTGTTTCCCC	21
S2	CAAGTTCAATAGAAAGGGGTACAAACCAGTACCACCTACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCC	180

LEV22	GGTGACATTGCATAGACTGCTCACGCGGTTGAAAGTGATCGATCCGTTACCCGATTGTGT	81
S2	GGTGACATTGCATAGACTGCTCACGCGGTTGAAAGTGATCGATCCGTTACCCGATTGTGT	240

LEV22	ACTTCGAAAAGCCTAGTATCGCCTTGGAACTCTCGACGCGTTGTGCTCAGCACCAGACCC	141
S2	ACTTCGAAAAGCCTAGTATCGCCTTGGAACTCTCGACGCGTTGTGCTCAGCACCAGACCC	300

LEV22	CGGGGTGTAGGTTAGGCTGATGAGTCTGGACATTCCTCACGG-TGACGGTGGTCCAGGCT	200
S2	CGGGGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATTCCTCACGGTGGTCCAGGCT	360
	***** * *****	
LEV22	GAGTTGGCGGCCTACCTATGGCTAACGCCATAGGACGTTAGATGTGAACAAGGTGTGAAG	260
S2	GCGTTGGCGGCCTACCTATGGCTAACGCCATAGGACGTTAGATGTGAACAAGGTGTGAAG	420
	* *****	
LEV22	AGCCTATTGAGCTACATAAGAGTCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACCACGGA	320
S2	AGCCTATTGAGCTACATAAGAGTCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAACCACGGA	480

LEV22	ACAGGCGGTGCGGAACCAGTACTGGCTTGTGCGTAACGCGCAAGTCTGTGGCGGAACCGA	380
S2	ACAGGCGGTGCGGAACCAGTACTGGCTTGTGCGTAACGCGCAAGTCTGTGGCGGAACCGA	540

LEV22	CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTGTTATTTTATCATGGCTGCTTATGG-----	430
S2	CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTGTTATTTTATCATGGCTGCTTATGGTACAATCAG	600

LEV22	-----	
S2	AGATTGTTATCATAAAGCGAATTGGATTGGCCATCCGGTGAGTGTGTGTCAGGTATACA	660

* Τα αστεράκια που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα νουκλεοτίδια σημαίνουν ομοιότητα ενώ τα κενά σημαίνουν ότι στο συγκεκριμένο σημείο υπάρχει μετάλλαξη.

Ακολουθεί η στοίχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του PCR προϊόντος UG52-FLAP/UC53-FLAP του δείγματος LEV32 με την 5' UTR αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin 2 (AY184219).

Διπλωματική εργασία – Δασταμάνη Μεταξία

LEV32	-----	
S2	TTAAAACAGCTCTGGGGTTGTACCCACCCCAGAGGCCACGTGGCGGCTAGCACTCCGGT	60
LEV2	-----	
S2	ATTACGGTACCCTTGTGCGCCTGTTTATACTCCCTCCCGCAACTTAGAAGCACGAAAC	120
LEV32	-----AACAGCACTTCTGTTTCCCC	21
S2	CAAGTTCAATAGAAAGGGGTACAAACCAGTACCACCTACGAACAAGCACTTCTGTTTCCCC	180

LEV32	GGTGACATTGCATAGACTGCTCACGCGGTTGAAAGTGATCGATCCGTTACCCGCTTGTGT	81
S2	GGTGACATTGCATAGACTGCTCACGCGGTTGAAAGTGATCGATCCGTTACCCGCTTGTGT	240

LEV32	ACTTCGAAAAGCCTAGTATCGCCTTGGAACTCTCGACGCGTTGCGCTCAGCACCCGACCC	141
S2	ACTTCGAAAAGCCTAGTATCGCCTTGGAACTCTCGACGCGTTGCGCTCAGCACCCGACCC	300

LEV32	CGGGGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATTCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCT	201
S2	CGGGGTGTAGCTTAGGCTGATGAGTCTGGACATTCCTCACCGGTGACGGTGGTCCAGGCT	360

LEV32	GTGTTGGCAGCCTACCTATGGCTAACGCCATAGGACGTTAGATGTGAACAAGGTGTGAAG	261
S2	GCCTTGGCAGCCTACCTATGGCTAACGCCATAGGACGTTAGATGTGAACAAGGTGTGAAG	420
	* ***** .*****	
LEV32	AGCATATTGAGCTACATAAGAGTCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATTCTAACCACAGA	321
S2	AGCCTATTGAGCTACATAAGAGTCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAATTCTAACCACAGA	480
	*** .***** ***** .**	
LEV32	ACAGGCGGTGCGGAACCAGTGACTGGCTTGTGCGTAACGCGCAATTCTGTGGCGGAACCGA	381
S2	ACAGGCGGTGCGGAACCAGTGACTGGCTTGTGCGTAACGCGCAAGTCTGTGGCGGAACCGA	540
	***** *****	
LEV32	CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTGTTATTTTATCATGGCTGCTTATGGTGACAAT---	438
S2	CTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCCTGTTATTTTATCATGGCTGCTTATGGTGACAATCAG	600

* Τα αστεράκια που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα νουκλεοτίδια σημαίνουν ομοιότητα ενώ τα κενά σημαίνουν ότι στο συγκεκριμένο σημείο υπάρχει μετάλλαξη.

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως είπαμε για τα δείγματα LEV22 και LEV32 και επέτρεψε την ανίχνευση νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων στην 5' αμετάφραστη περιοχή τους. Στον πίνακα 3.2 φαίνεται η θέση και το είδος των μεταλλάξεων που ανιχνεύτηκαν.

Δείγμα	Νουκλεοτιδική μετάλλαξη
LEV22	C 234 A
	C 284 T
	C 295 A
	C 311 G
	C 341 G
	C 343 ---
	C 362 A
LEV32	C 362 T
	G 369 A
	C 424 A
	C 469 T
	G 478 A
	G 524 T

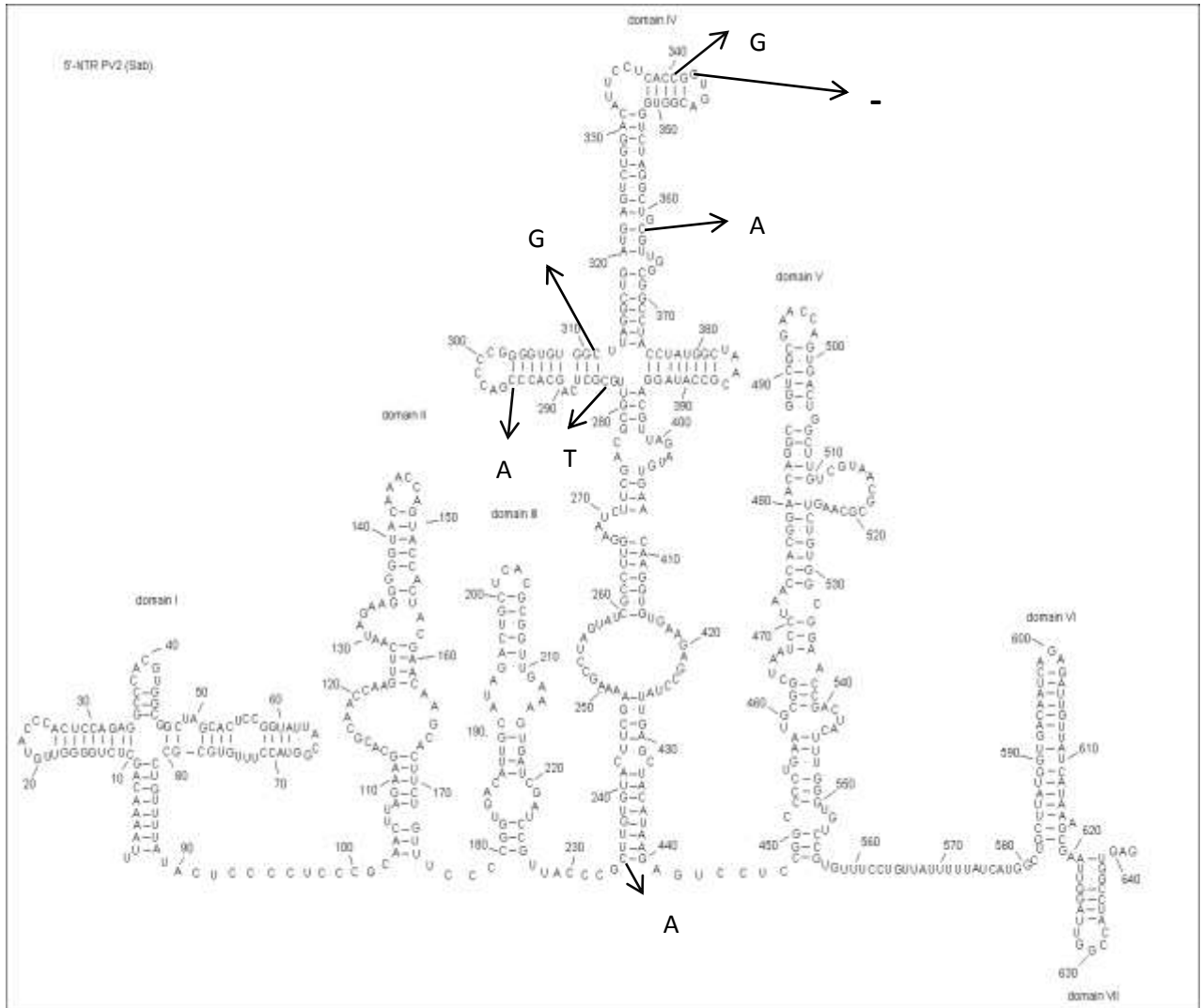
Πίνακας 3.2: Νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις στην 5' UTR περιοχή (PCR προϊόν UG52-FLAP/UC53-FLAP) των δειγμάτων. Οι αριθμοί απεικονίζουν τις θέσεις των μεταλλάξεων. Με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα νουκλεοτίδια του πρότυπου εμβολιακού στελέχους SABIN 2 ενώ με κόκκινο τα αντίστοιχα νουκλεοτίδια των στελεχών που μελετήσαμε

Το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας των δειγμάτων LEV22 και LEV32 με την αλληλουχία του προτύπου Sabin 2 βρέθηκε με τη βοήθεια του Blast και είναι της τάξης του 95% και 98% ,αντίστοιχα.

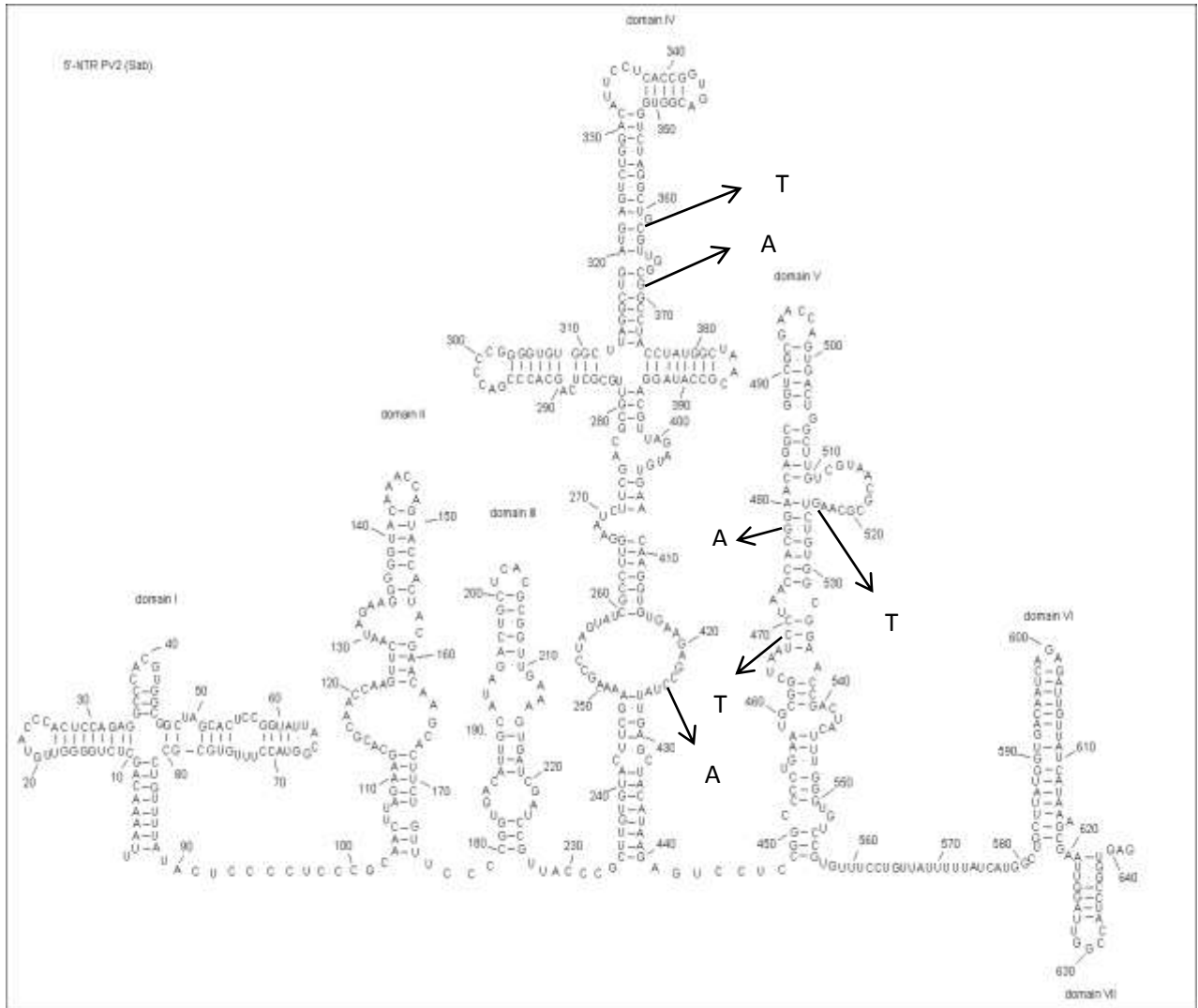
3.3 ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ 5'-UTR ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΪΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Το PCR προϊόν μήκους 439 bp περιλαμβάνει τις περιοχές II-VI του IRES γενετικού στοιχείου.

Στον πίνακα 3.2 φαίνονται οι μεταλλάξεις στην 5' UTR περιοχή μετά από την αλληλούχιση του PCR προϊόντος. Αυτές οι μεταλλάξεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες βάση της δομής της περιοχής στην οποία εντοπίζονται. Η πρώτη αφορά αυτές που εντοπίζονται σε μονόκλωνες περιοχές της δευτεροταγούς δομής της περιοχής IRES και η δεύτερη αυτές που εντοπίζονται σε δίκλωνες περιοχές του IRES. Παρακάτω ακολουθεί ο εντοπισμός των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων των δειγμάτων LEV22 και LEV32 που μελετήθηκαν, με τη χρήση των δευτεροταγών δομών των IRES γενετικών στοιχείων του πρότυπου στελέχους Sabin 2.



Εικόνα 3.1: Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις του κλινικού δείγματος LEV22 που μελετήθηκε, με τη βοήθεια της δευτεροταγούς δομής του IRES του προτύπου στελέχους Sabin 2.



Εικόνα 3.2: Απεικονίζονται οι μεταλλάξεις του κλινικού δείγματος LEV32 που μελετήθηκε, με τη βοήθεια της δευτεροταγούς δομής του IRES του προτύπου στελέχους Sabin 2.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές εντεροϊικές μολύνσεις είναι ασυμπτωματικές ή υποκλινικές αλλά ο νευροτροπισμός τους μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές στο ΚΝΣ όπως είναι η άσηπτη μηνιγγίτιδα. Γενικά, οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αποτελούν συχνά ανθρώπινα παθογόνα, και σχετίζονται με αιφνίδιες εξάρσεις κλινικών συμπτωμάτων όπως μηνιγγίτιδες.

Τα 51 δείγματα τα οποία παραλάβαμε από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων ήταν ύποπτα για άσηπτη μηνιγγίτιδα. Προσπαθήσαμε να ενισχύσουμε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος των εντεροϊών στα κλινικά δείγματα, ωστόσο λόγω του χαμηλού ιικού φορτίου των δειγμάτων ήταν δύσκολη η εύρεση κατάλληλων πρωτοκόλλων ούτως ώστε να έχουμε την επιθυμητή ευαισθησία που απαιτείται. Τελικά η μόνη περιοχή που μπορέσαμε να ενισχύσουμε ήταν η 5' μη κωδική περιοχή με τη βοήθεια των εκκινητικών μορίων UG52-FLAP/UC53-FLAP. Σημειώνεται πως από τα 51 δείγματα θετικά βρέθηκαν τα 8. Τα δείγματα στα οποία εντοπίστηκε εντεροϊός ήταν από ασθενείς ηλικίας 1 έως 81 ετών κατά την χρονική περίοδο Ιουνίου 2009 - Φεβρουαρίου 2010. Ο τόπος διαμονής των ασθενών ήταν τα Ιωάννινα ή γειτονικές περιοχές (Φιλιππιάδα, Κόνιτσα) με εξαίρεση έναν ασθενή που διέμενε στα Μαυρικά Καρδίτσας. Σημειώνεται πως σε γενικές γραμμές τα εργαστηριακά ευρήματα συμφωνούν με την ύπαρξη ιογενούς μηνιγγίτιδας. Τα δύο δείγματα LEV22 και LEV32 που επιλέξαμε να κλωνοποιήσουμε προέρχονται από ασθενείς που διέμεναν στα Ιωάννινα, ηλικίας 13 και 48 ετών αντίστοιχα και λήψη των δειγμάτων έγινε στις 2/2/2010 και 9/7/2009 αντίστοιχα.

Μετά την αλληλούχιση των δειγμάτων LEV22 και LEV32 στη 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή που ενισχύουν οι εκκινητές UG52-FLAP/UC53-FLAP με τη βοήθεια του προγράμματος Blast βρέθηκε ότι το ποσοστό ομοιότητας της αλληλουχίας των δειγμάτων LEV22 και LEV32 με την αλληλουχία του προτύπου στελέχους Sabin 2 είναι 95% και 98%, αντίστοιχα. Η ανίχνευση αλληλουχιών στα δείγματα LEV22 και LEV32 η οποία προσομοιάζει στην 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή με το εμβολιακό στέλεχος SABIN 2 έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς είναι ιδιαίτερα σπάνιο γεγονός. Συνήθως οι περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας οφείλονται σε κάποιον μη πολιοϊό εντεροϊό. Ωστόσο η ύπαρξη ενός πολιοϊού σε δείγματα ασθενών με άσηπτη μηνιγγίτιδα δεν αποκλείεται λόγω της νευρομαλυσματικότητας των εμβολιοσυνδεδεμένων Sabin 2 στελεχών.

Μεταλλάξεις στην 5'-UTR περιοχή του ιικού γενώματος

Από τις συνολικά 13 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα κλινικά στελέχη LEV22 και LEV32 υπήρχαν τόσο μεταστροφές όσο και μεταπτώσεις καθώς και μια έλλειψη βάσης. Παρακάτω ακολουθεί μια ερμηνεία των μεταλλάξεων όσον αφορά τον εντοπισμό τους και τον πιθανό ρόλο τους στην αρμοστικότητα των στελεχών. Ανάμεσα στα δύο κλινικά στελέχη βρέθηκε μόνο μια μετάλλαξη στην θέση 362 σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου η οποία πιθανόν αποσταθεροποιεί τη δευτεροταγή δομή της περιοχής καθώς το ζευγάρι GC μετατρέπεται σε GA και GT, αντίστοιχα.

Κλινικό στέλεχος LEV22: Οι μεταλλάξεις C234A, C295A, C311G, και C341G βρίσκονται σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 3.3) και πιθανόν αποσταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή της IV περιοχής του καθώς οι δύο πρώτες οδηγούν σε μετατροπή του ζεύγους CG σε AG και οι δύο τελευταίες σε μετατροπή του ζεύγους CG σε GG. Η C284T εντοπίζεται σε μονόκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 3.3) και πιθανότατα δεν επηρεάζει τη σταθερότητα της δευτεροταγούς δομής της. Θα μπορούσε όμως να επηρεάζει την αρμοστικότητα του ιού, επηρεάζοντας τη πρόσδεση κάποιου παράγοντα μετάφρασης. Τέλος, η C343- είναι ιδιαίτερα σπάνια καθώς οδηγεί σε έλλειψη μιας βάσης, βρίσκεται σε μονόκλωνη περιοχή και ενδέχεται να επηρεάζει και αυτή την αρμοστικότητα.

Κλινικό στέλεχος LEV32: Η μετάλλαξη C469T βρίσκεται σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 3.4) και πιθανώς αποσταθεροποιεί τη δευτεροταγή δομή της περιοχής του καθώς οδηγεί σε μετατροπή του ζεύγους CG σε CT. Οι μεταλλάξεις C424A και G524T εντοπίζονται σε μονόκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 3.4) και ενδέχεται να μην επηρεάζουν τη σταθερότητα της δευτεροταγούς δομής. Τέλος, οι μεταλλάξεις G369A και G478A βρίσκονται σε δίκλωνη περιοχή του IRES cis-acting γενετικού στοιχείου (εικόνα 3.4) και μάλλον σταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή καθώς οδηγούν σε μετατροπή του ζεύγους GU σε AU.

Στα δείγματά μας δεν παρατηρήσαμε μεταλλάξεις σε θέσεις που χαρακτηρίζουν την νευρομολυσματικότητα των πολιοϊών όπως η θέση πρόσδεσης (559-624 nt) του κυτταρικού πεπτιδίου p52 (αυτοαντιγόνο La) σημαντικού παράγοντα για την μετάφραση του γενώματος των πολιοϊών (Equestre et al., 1991) ή τη θέση 481 στην οποία εντοπίζονται μεταλλάξεις στις περισσότερες περιπτώσεις νευρομολυσματικών στελεχών. Ωστόσο εντοπίσαμε στο ένα δείγμα LEV32 πιθανές σταθεροποιητικές μεταλλάξεις οι οποίες ενδεχομένως να αυξάνουν τη σταθερότητα και τη νευρομολυσματικότητα του ιού. Μεταλλάξεις οι οποίες αποσταθεροποιούν τη δευτεροταγή δομή περιοχών IRES θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε καταστροφή της δευτεροταγούς δομής. Όμως τέτοιου

είδους καταστροφές αποφεύγονται συνήθως μέσω του φαινομένου της συμεταβλητότητας. Οι μεταλλάξεις οι οποίες βρίσκονται σε θηλιές και επομένως σε μονόκλωνες περιοχές μπορεί μιν να μην επηρεάζουν τη δευτεροταγή δομή αλλά ενδέχεται να επηρεάζουν την πρόσδεση παραγόντων μετάφρασης.

Πρέπει να σημειωθεί πως τα υπό μελέτη κλινικά δείγματα μελετήθηκαν μόνο στην 5' αμετάφραστη περιοχή τους η οποία επιτρέπει την ανίχνευση-εντοπισμό όλων των εντεροϊών αλλά δεν επιτρέπει την ταυτοποίηση του οροτύπου. Όλοι οι εντεροϊοί συγκλίνουν στην 5' μη κωδική περιοχή και επομένως δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι για τον ορότυπο των στελεχών τα οποία χαρακτηρίσαμε. Για την ταυτοποίηση του οροτύπου προτείνονται περιοχές οι οποίες είναι πιο ευμετάβλητες μεταξύ των εντεροϊών, όπως η κωδική περιοχή. Γι' αυτό το λόγο η παρούσα εργασία αποτελεί μια αρχική μελέτη η οποία θα ακολουθηθεί από την πλήρη αλληλούχιση και τον μοριακό χαρακτηρισμό του γενώματος των ιών αυτών.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agol V. I. 1997. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.

Agol VI. 2002. Genomic instability in picornaviruses. *Mol Biol* 36(2):286-95.

Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996. Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.

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.

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

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

Chakravarty S., Hutson A.M., Estes M.K. and Venkataram Prasad V. 2005. Evolutionary Trace Residues in Noroviruses: Importance in Receptor Binding, Antigenicity, Virion Assembly, and Strain Diversity. *J Virol.* 79: 554–568.

Dedepisdias, E., V. Pliaka, Z. Kyriakopoulou, C. Brakoulis, S. Levidiotou-Stefanou, b. Pratti, Z. Mamuris, and P. Markoulatos. 2008. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin3/Sabin2 capsid recombinant. *FEMS* 52:342-351.

Dierssen, U., Rehren, F., Henke-Gendo, C., Harste, G., Heim, A., 2008. Rapid routine detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid by a one-step real-time RT-PCR assay. *J. Clin. Virol.* 42, 58–64.

Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Escarmis, C., 2008. Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 323, 3–32.

Etchison, D., Milburn, S.C., Edery, I., Sonenberg, N., Hershey, J.W., 1982. Inhibition of HeLa cell protein synthesis following poliovirus infection correlates with the proteolysis of a 220,000-dalton polypeptide associated with eucaryotic initiation factor 3 and a cap binding protein complex. *J. Biol. Chem.* 257 (24), 14806–14810.

Feuer, R., Mena, I., Pagarigan, R.R., Harkins, S., Hassett, D.E., Whitton, J.L., 2003. Coxsackievirus B3 and the neonatal CNS: the roles of stem cells, developing neurons, and apoptosis in infection, viral dissemination, and disease. *Am. J. Pathol.* 163, 1379–1393.

Feuer, R., Pagarigan, R.R., Harkins, S., Liu, F., Hunziker, I.P., Whitton, J.L., 2005. Coxsackievirus targets proliferating neuronal progenitor cells in the neonatal CNS. *J. Neurosci.* 25, 2434–2444.

Figlerowicz M, Alejska M, Kurzyńska-Kokorniak A and Figlerowicz M. 2003. Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev.* 23(4):488-518.

Fitzgerald, K.D., Semler, B.L., 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 1789, 518–528.

Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.

Freistadt, M.S., Vaccaro, J.A., Eberle, K.E., 2007. Biochemical characterization of the fidelity of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virol. J.* 4, 44.

Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol* 40:157-70.

Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Vamvakopoulos N. C. (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.* 38:4337-42.

Gromeier, M., Wimmer, E., 1998. Mechanism of injury-provoked poliomyelitis. *J. Virol.* 72, 5056–5060.

Guest, S., Pilipenko, E., Sharma, K., Chumakov, K., Roos, R.P., 2004. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J. Virol.* 78(20) Shih, S.R., Weng, K.F., Stollar, V., Li, M.L., 2008. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. *J. Neurovirol.* 14 (1), 53–61., 11097–11107.

Guest, S., Pilipenko, E., Sharma, K., Chumakov, K., Roos, R.P., 2004. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J. Virol.* 78 20, 11097–11107.

Han, J., Ma, X.J., Wan, J.F., Liu, Y.H., Han, Y.L., Chen, C., Tian, C., Gao, C., Wang, M., Dong, X.P., 2010. Long persistence of EV71 specific nucleotides in respiratory and feces samples of the patients with Hand–Foot–Mouth Disease after recovery. *BMC Infect. Dis.* 10, 178.

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

Hogle, J. M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.

Hosking, M.P., Lane, T.E., 2010. The role of chemokines during viral infection of the CNS. *PLoS Pathog.* 6, e1000937. (Tabor-Godwin et al., 2010).

Huang, S.C., Chang, C.L., Wang, P.S., Tsai, Y., Liu, H.S., 2009. Enterovirus 71-induced autophagy detected in vitro and in vivo promotes viral replication. *J. Med. Virol.* 81(7), 1241–1252.

Hughes, S.A., Thaker, H.M., Racaniello, V.R., 2003. Transgenic mouse model for echovirus myocarditis and paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 15906–15911.

Ida-Hosonuma, M., Iwasaki, T., Yoshikawa, T., Nagata, N., Sato, Y., Sata, T., Yoneyama, M., Fujita, T., Taya, C., Yonekawa, H., Koike, S., 2005. The alpha/beta interferon response controls tissue tropism and pathogenicity of poliovirus. *J. Virol.* 79, 4460–4469.

Jackson, W.T., Giddings Jr., T.H., Taylor, M.P., Mulinyawe, S., Rabinovitch, M., Kopito, R.R., Kirkegaard, K., 2005. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* 3 (5), e156.

Jacobson MF and Baltimore D. 1968. Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J Mol Biol.* 33(2):369-78.

Jacobson S. J., Konings D. A., and Sarnow P. (1993) 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.* 67:2961-2971.

Kauder, S., Kan, S., Racaniello, V.R., 2006. Age-dependent poliovirus replication in the mouse central nervous system is determined by internal ribosome entry site-mediated translation. *J. Virol.* 80, 2589–2595.

Kauder, S.E., Racaniello, V.R., 2004. Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113, 1743–1753.

Kempf, B.J., Barton, D.J., 2008. Poliovirus 2A(Pro) increases viral mRNA and polysome stability coordinately in time with cleavage of eIF4G. *J. Virol.* 82 (12), 5847–5859.

Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Marttila RJ, Kotilainen P., 2005. Diagnosis of enteroviral meningitis by use of polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid, stool, and serum specimens. *Clin Infect Dis.* 40(7):982-7.

Kuss, S.K., Etheredge, C.A., Pfeiffer, J.K., 2008. Multiple host barriers restrict poliovirus trafficking in mice. *PLoS Pathog.* 4 (6), e1000082.

Lancaster, K.Z., Pfeiffer, J.K., 2010. Limited trafficking of a neurotropic virus through inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 6 (3), e1000791.

Leland, D.S., Ginocchio, C.C., 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 49–78.

Lin, J.Y., Li, M.L., Shih, S.R., 2009a. Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation. *Nucleic Acids Res.* 37, 47–59.

Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Ilonen J. (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86:3281-90.

Madan, V., Lyons T., K. E. Murray, A. W. Roberts, and D. J. Barton. 2001. Poliovirus 5'-Terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 75(22): 10696-10708.

Melnick JI, Shaw Ew, Curnen Ec., 1949. A virus isolated from patients diagnosed as non-paralytic poliomyelitis or aseptic meningitis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 71(3):344-9.

Michos, A.G., Syriopoulou, V.P., Hadjichristodoulou, C., Daikos, G.L., Lagona, E., Douridas, P., Mostrou, G., Theodoridou, M., 2007. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PLoS ONE* 2, e674.

Minor PD. 1999. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Rev Mol Med.* 1999:1-17.

Minor P. D., Ferguson M., Evans D. M., Almond J. W., and Icenogle J. P. (1986) Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J. Gen. Virol.* 67:1283-1291.

Mirand, A., Bailly, J.L., Henquell, C., Peigue-Lafeuille, H., 2008. Rapid enterovirus genotyping in cerebrospinal fluids: a two-year prospective study in a virology laboratory setting. *Pathol. Biol. Paris.* 56, 471–481.

Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan. 2003. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-5144.

Murray K. E. and D. J. Barton. 2003. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8): 4739-4750.

Nagata, N., Iwasaki, T., Ami, Y., Tano, Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Miyamura, T., Shimizu, H., 2004. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of cynomolgus monkeys after intravenous inoculation. *J. Gen. Virol.* 85, 2981–2989.

Nagata, N., Iwasaki, T., Ami, Y., Tano, Y., Harashima, A., Suzaki, Y., Sato, Y., Hasegawa, H., Sata, T., Miyamura, T., Shimizu, H., 2004. Differential localization of neurons susceptible to enterovirus 71 and poliovirus type 1 in the central nervous system of inefficient retrograde axonal transport and the type I interferon response. *PLoS Pathog.* 6 (3), e1000791.

Paul A. V., J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer. 2003. A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem.* 278(45): 43951-43960.

Paul A. V., J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer. 2003. A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem.* 278(45): 43951-43960.

Pfeiffer, J.K., Kirkegaard, K., 2006. Bottleneck-mediated quasispecies restriction during spread of an RNA virus from inoculation site to brain. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103 (14), 5520–5525.

Pfister T., and Wimmer E. (1999) Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* 274: 6992-7001

Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. (1999) Molecular biology. In "Encyclopedia of Virology", second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.

Pilipenko, E.V., Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Khitrina, E.V., Poperechnaya, A.N., Agol, V.I., Hellen, C.U., 2000. A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* 14, 2028–2045.

Redondo, N., Carrasco, L., 2010. Cell permeabilization by poliovirus 2B viroporin triggers bystander permeabilization in neighbouring cells through a mechanism involving gap junctions. *Cell. Microbiol.* 12 (8), 1144–1157.

Pliaka V, Achilleos C, Kyriakopoulou Z, Tsakogiannis D, Ruether IG, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. 2010. Determination of antigenic properties of vaccine derived poliovirus strains. *Vaccine.* 29(1):26-33.

Pliaka V, Dedepisdís E, Kyriakopoulou Z, Papadopoulou I, Levidiotou S, Markoulatos P. 2007. Use of mutational pattern in 5'-NCR and VP1 regions of polioviruses for molecular diagnosis. *Mol Cell Probes.* 21(4):267-75.

Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Tsakogiannis D, Ruether IG, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Krikelis A, Markoulatos P. Correlation of mutations and recombination with growth kinetics of poliovirus vaccine strains. 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 29(12):1513-23

Romero, J.R., 1999. Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 123, 1161–1169.

Rossmann M. G. (1994) Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3:1712-1725.

Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH., 1974. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis.* 129(3):304-9.

Scott TF, Rivers TM., 1936. Meningitis in man caused by a filterable virus : i. two cases and the method of obtaining a virus from their spinal fluids. *J Exp Med.* 63(3):397-414.

Shih, S.R., Weng, K.F., Stollar, V., Li, M.L., 2008. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. *J. Neurovirol.* 14 (1),53–61., 11097–11107.

Stanway G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71:2483-2501.

Suhy, D.A., Giddings Jr., T.H., Kirkegaard, K., 2000. Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins: an autophagylike origin for virus-induced vesicles. *J. Virol.* 74 (19), 8953–8965.

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.

Ugo K. Ihekweba, Goura Kudesia, Michael W. McKendrick, 2008. Clinical Features of Viral Meningitis in Adults: Significant Differences in Cerebrospinal Fluid Findings among Herpes Simplex Virus, Varicella Zoster Virus, and Enterovirus Infections. *Clinical infectious diseases*. United Kingdom, 47:783-9.

Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E., Andino, R., 2006. Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* 439, 344–348.

Ward C. D., and Flanagan J. B. (1992) Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66:3784-93.

Weng, K.F., Li, M.L., Hung, C.T., Shih, S.R., 2009. Enterovirus 71 3C protease cleaves a novel target CstF-64 and inhibits cellular polyadenylation. *PLoS Pathog.* 5 (9), e1000593.

Whitton, J.L., Cornell, C.T., Feuer, R., 2005. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (10), 765–776.

Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.

Witwer C., Rauscher S., Hofacker I.L., and Stadler P. F. (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic. Acids Res.* 15:5079-89.

Yakovenko ML, Cherkasova EA, Rezapkin GV, Ivanova OE, Ivanov AP, Eremeeva TP, Baykova OY, Chumakov KM and Agol VI. 2006. Antigenic evolution of vaccinederived polioviruses: changes in individual epitopes and relative stability of the overall immunological properties. *J Virol.* 80(6):2641-53.

Yoon, S.Y., Ha, Y.E., Choi, J.E., Ahn, J., Lee, H., Kweon, H.S., Lee, J.Y., Kim, D.H., 2008. Coxsackievirus B4 uses autophagy for replication after calpain activation in rat primary neurons. *J. Virol.* 82 (23), 11976–11978.

Yoshikawa, T., Iwasaki, T., Ida-Hosonuma, M., Yoneyama, M., Fujita, T., Horie, H., Miyazawa, M., Abe, S., Simizu, B., Koike, S., 2006. Role of the alpha/beta interferon response in the acquisition of susceptibility to poliovirus by kidney cells in culture. *J. Virol.* 80, 4313–4325.

