



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΜΙΑΣ MULTIPLEX RT PCR ΓΙΑ ΤΗΝ
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΜΟΡΙΑΚΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ
COXSACKIE A ΚΑΙ B ΙΩΝ**

ΜΟΣΧΟΝΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2015

Δημιουργία μίας Multiplex RT PCR για την αντίχνευση και το μοριακό χαρακτηρισμό
Coxsackie A και B ιών

Development of a Multiplex RT PCR assay for the detection and molecular
characterization of Coxsackie A and B viruses

Τριμελής Επιτροπή

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) :

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

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ :

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

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ :

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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί, όπως οι Coxsackie A και B ιοί, ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά. Τα μέλη του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από το μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών 4 πρωτεϊνών. Οι περισσότερες λοιμώξεις των εντεροϊών είναι ασυμπτωματικές, και εμφανίζονται πιο συχνά σε άνδρες από ότι σε γυναίκες. Από την άλλη πλευρά, αυτοί οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα φάσμα από διακριτά κλινικά σύνδρομα οδηγώντας σε ασθένειες.

Ο καλύτερα μελετημένος εντεροϊός, είναι ο πολιοϊός, εξαιτίας της εμφάνισης της πολυμυελίτιδας και της ανάγκης για την εξάλειψή της.

Στη συγκεκριμένη εργασία, σε πρότυπα και κλινικά στελέχη CAV και CBV, εκτελέστηκαν 5 απλές αντιδράσεις PCR με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών. Στη συνέχεια επιλέχθηκαν 3 από αυτά τα 5 ζεύγη εκκινητών ώστε να δημιουργηθούν δύο Multiplex PCR αντιδράσεις, μία για CAV και μία για CBV ιούς.

Η κάθε Multiplex PCR αντίδραση εκτελέστηκε σε πρότυπα και κλινικά δείγματα CAV και CBV αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα των Multiplex PCR απέδειξαν ότι καθίσταται δυνατή η ταυτόχρονη ανίχνευση και ο μοριακός χαρακτηρισμός τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο οροτύπου. Επίσης προσφέρουν ταχύτατη ενίσχυση ενός μεγάλου τμήματος του ιικού γονιδιώματος, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω επεξεργασία και αλληλούχηση.

Οι Coxsackie A και B έχουν εντοπιστεί σε επιδημίες τόσο σε παγκόσμια κλίμακα όσο και στον ελλαδικό χώρο. Για αυτό το λόγο καθιστάτε αναγκαία μία μέθοδος που θα ανιχνεύει και θα ταυτοποιεί ταχύτατα τους CAV και CBV ιούς σε κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Ως τέτοιες διαγνωστικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι Multiplex RT PCR που σχεδιάστηκαν στη παρούσα εργασία.

ABSTRACT

Human enteroviruses, such as Coxsackie A and B viruses, belong to genus *enterovirus* of Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-strand RNA, which consists of a highly conserved 5'-UTR, an Open Reading Frame (ORF), a 3'-UTR and a poly(A)-tract. The members of this genus are characterized by their non-enveloped icosahedral capsid of two-, three- and five-fold symmetry, which is made up of 60 copies of pentameric intermediates of 4 proteins: VP1, VP2, VP3 and VP4. Most enterovirus infections are asymptomatic and occur more frequently in men than in women. On the other hand, these viruses can cause a range of distinct clinical syndromes leading to diseases.

The most well-studied enterovirus is poliovirus, because of the emergence of poliomyelitis and the need for its eradication.

Coxsackie A and B virus are often implicated in aseptic meningitis outbreaks encountered around the world as well as in Greece. Because of that, it is necessary the development of an assay that could rapidly detect and identify clinical and environmental samples of CAV and CBV viruses. As such diagnostic Multiplex RT PCR assay was designed and developed in the present thesis.

Five PCR assays with different primer pairs were initially tested to both prototype and clinical isolates of CAV and CBV viruses. Three of those five primer pairs were selected and used for the development of two Multiplex PCR assays, one for CAV viruses and one for CBV viruses.

Each Multiplex PCR assay was then tested to both prototype and clinical isolates CAV and CBV respectively. According to our results, these Multiplex PCRs can be used for the molecular detection and serotypic characterization of CAV and CBV strains, offering a fast amplification of a large region of the viral genome that can be used in further processing and sequencing.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας από το Σεπτέμβριο του 2014 έως τον Ιανουάριο του 2015.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος αυτής της πτυχιακής εργασίας, για την εμπιστοσύνη, τη συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή της.

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

Επιπλέον, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και όλα τα παιδιά με τα οποία συνεργαστήκαμε για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και απασχόλησης μου στο εργαστήριο.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Τηλέμαχο Δημητρίου με τον οποίο συνεργαστήκαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας μου και από την πρώτη μέχρι την τελευταία μέρα ήταν πάντα δίπλα μου για να με βοηθάει, να με καθοδηγεί και να με συμβουλεύει, πάντα έχοντας την καλύτερη πρόθεση.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Δημήτρη και Άννα, και τον αδερφό μου, Νικόδημο, για την οικονομική, αλλά κυρίως για την πνευματική υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	1
1.1.1	Ταξινόμηση των εντεροϊών	1
1.1.2	Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων.....	3
1.1.3	Οργάνωση του ιικού γενώματος.....	7
1.2	ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	9
1.2.1	Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.	11
1.2.2	Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης	14
1.2.3	Αντιγραφή του ιικού RNA	18
1.2.4	Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων	20
1.3	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	21
1.4	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	24
2	ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	26
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
3.1	ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	27
3.2	ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ	28
3.3	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA	29
3.4	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).....	29
3.5	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	30
3.6	MULTIPLX PCR	32
3.7	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR	33
3.8	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	34
3.9	ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	34
3.10	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	36
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4.1	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.....	38
4.2	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MULTIPLEX-PCR	39
4.2.1	Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα Coxsackie A.....	40
4.2.2	Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie A.....	41
4.2.3	Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα Coxsackie B	42
4.2.4	Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie B.....	43
4.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ.....	44
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	48

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί, όπως οι Coxsackieviruses A και B, ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας Picornaviridae. Τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae είναι ιοί χωρίς φάκελο και το γονιδίωμά τους είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA (ssRNA) το οποίο αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά. Τα μέλη του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από το μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών 4 πρωτεϊνών. Η οικογένεια αυτή των ιών περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως ο ιός της ηπατίτιδας A, ο πολιοϊός (ιός της πολιομυελίτιδας), ο ρινοϊός και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα της οικογένειας αυτής των ιών είναι σύνθετο, καθώς αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (pico), και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA).

1.1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια των ιών Picorna αποτελείται από σαράντα έξι είδη που ταξινομούνται σε εικοσιέξι γένη: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicipivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Rosavirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Teschovirus* και *Tremovirus* [(Adams M.J et al (2013), Knowles NJ et al (2012)]. Όσον αφορά τους εντεροϊούς, υπάρχουν δώδεκα διακριτά γένη με διάφορους οροτύπους ο καθένας (πίνακας 1.1.1.1).

Οι ιοί picorna είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Παρ' όλο το περιορισμένο γενετικό υλικό και τα δομικά εμπόδια, η εξέλιξη στους ιούς picorna έχει σαν αποτέλεσμα ένα μεγάλο αριθμό εύκολα διακριτών μελών. Η ποικιλία αυτή έχει καταχωρηθεί αντιγονικά ως ορότυπος.

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και απαρτίζεται από τους πολιοϊούς (3

ορότυποι), τους ιούς Coxsackie A (23 ορότυποι) και B (6 ορότυποι), τους Echo ιούς (28 ορότυποι), αλλά και άλλους εντεροϊούς που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους (εντεροϊοί 68-71).

Πίνακας 1.1.1.1: Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποί τους

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

Οι ιοί picorna είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, όμως άσχετα από το μικρό και περιορισμένο τους μέγεθος, η εξέλιξη στους ιούς picorna οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, των επονομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων.

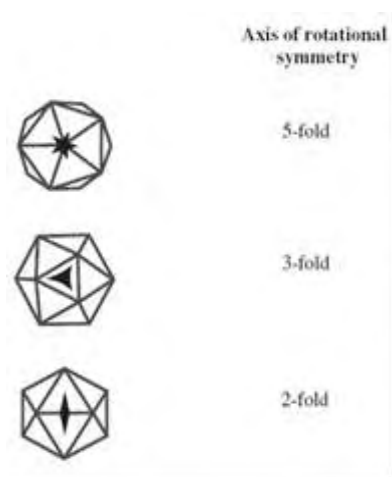
Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπινου ξενιστή, την προστασία από τη νόσο, τη χρήση του υποδοχέα, και, σε μικρότερο βαθμό, το φάσμα της κλινικής νόσου. Ο ορότυπος προσδιορίζεται από τις συνδετικές θηλιές και τα C- τελικά άκρα των καψιδιακών πρωτεϊνών που περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια του ισοβάτιου. Αυτά περιλαμβάνουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού.

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και, σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί, παρ' όλα

αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς coxsackie A ή B και ιούς echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντι-ορών.

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους (ταυτοποίηση ιών οροτυπικά ταυτόσημων με γνωστούς ιούς echo που βρέθηκαν να προκαλούν νόσο σε ποντικούς και ανθρώπους). Τέτοιες ανακολουθίες στο σύστημα ταξινόμησης οδήγησε στην αρίθμηση νέων οροτύπων εντεροϊών ξεκινώντας με τον EV68. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [Racaniello V (2007)].

1.1.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων



Εικόνα 1.1.2.1: Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο

Τα ιωσωμάτια του εντεροϊού είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα ιωσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες [Melnick JL (1996)]. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε τιμές pH 3 και μικρότερες.

Τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [Caspar DL, Klug A. (1962)],

ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες

υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [Rueckert RR (1969)].

Ο βασικός λίθος του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Το κέλυφος σχηματίζεται από την VP1 τη VP2 και τη VP3 ενώ η VP4 υπάρχει στην εσωτερική επιφάνεια. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία αλληλουχική ομολογία, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Το αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που έχει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες στο ότι παρουσιάζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρόμοια στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3 και λειτουργεί σαν μια αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2 παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου. Περαιτέρω τροποποίηση του N-τελικού άκρου της VP4, έχει προταθεί στην συμβολή στην προσκόλληση του ιού σε κυτταρικούς υποδοχείς, στην αποδιάταξη του καψιδίου, την απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον αλλά και στη δημιουργία του καψιδίου, κατά τη συγκρότηση του ώριμου πλέον ιού (εικόνα 1.1.2.2)

Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 οφείλονται στους βρόγχους που συνδέουν τα β'- φύλλα και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που

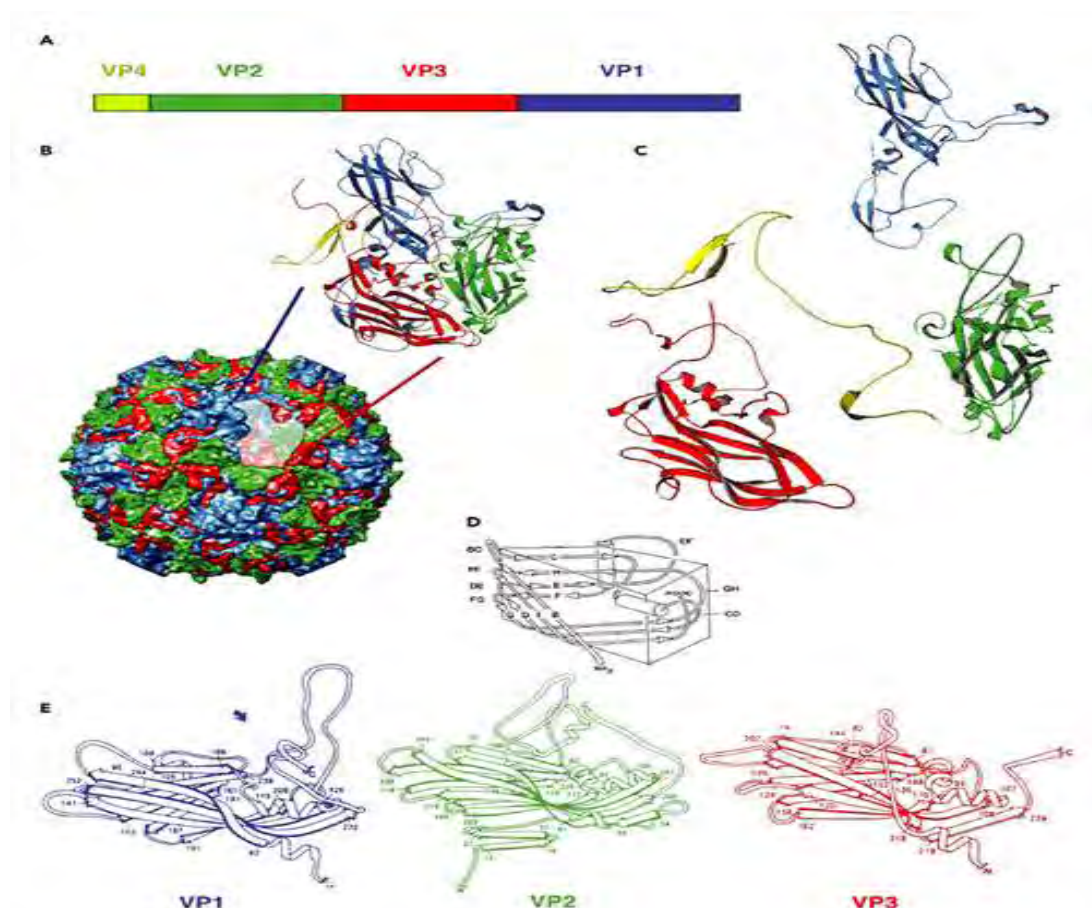
εξέχουν της περιοχής του β'-βαρελίου. Αυτές οι αμινοξικές αλληλουχίες δίνουν σε κάθε *picorna* ιό την ξεχωριστή μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιοσωματίου και τα N-τελικά στο εσωτερικό του, δείχνοντας ότι προκύπτουν σημαντικές αναδιατάξεις του P1 προδρόμου κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Στους πολιοιούς έχουν αναγνωριστεί τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ, [66 (1999)].

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

Σχετικά με την επιφάνεια του ιοσωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (*plateau*), βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (*canyon*) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Η αύλακα αυτή βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1, VP2 και VP3. Αρχικά προτάθηκε ότι η αύλακα αυτή αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς, υπόθεση η οποία αποδείχθηκε σωστή στη συνέχεια.

Στο εσωτερικό των ιοσωμάτων, στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων της VP3 πρωτεΐνης σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β'-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β' φύλλων σχηματισμένα από το N-τελικό άκρο των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος συνδεδεμένη στο N-άκρο της VP4 επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών δομών [Chow M et al (1987)]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα πλέγμα β'-φύλλων, που συντίθεται από τέσσερα β'-πλέγματα του VP3 βαρελίου και ένα πλέγμα από το N-άκρο της VP1 που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β'-φύλλου του N-άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [Filman DJ et al (1989)].

Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, πρόταση βασιζόμενη σε ευρήματα με τον ιό bean rod, ο οποίος σχετίζεται με τους ιούς picorna [Chen ZG et al (1989)]. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την διάταξη του RNA των ιών Picorna. Μελέτες που αφορούσαν την ατομική δομή του πολιοϊού P2, έδειξαν ότι οι βάσεις



του RNA, αλληλεπιδρούν με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [Lentz KN et al (1997)]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα

Εικόνα 1.1.2.2: Δομικά χαρακτηριστικά των εντεροϊών.

A. Η οργάνωση των δομικών πρωτεϊνών στο γένωμα του ιού.

B. Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου του πολιοϊού, όπου φαίνεται το πακετάρισμα των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου.

C. Τρισδιάστα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4.

D. Διάγραμμα που απεικονίζει το πώς τα οχτώ β'-πλέγματα κάθε πρωτεΐνης σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους.

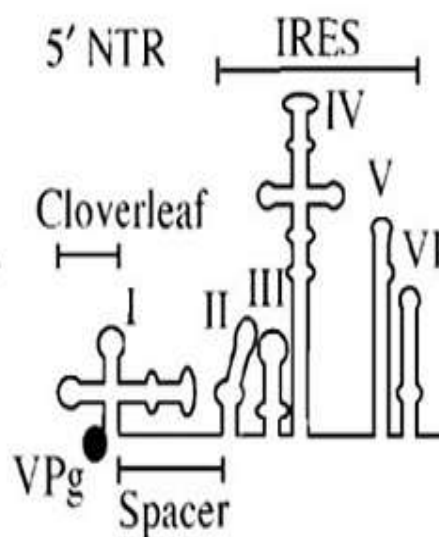
E. Διάγραμμα τύπου ribbon των VP1, VP2 και VP3 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελίου.

του καψιδίου ή την απέκδυση.

1.1.3 Οργάνωση του ιικού γενώματος

Το γένωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA, μήκους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων. Το ιικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό την παραγωγή όλων των ιικών πρωτεϊνών που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το RNA των εντεροϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο (πλούσιο σε G+C) με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome-linked) [Flanegan JB et al (1977), Lee YF et al (1977)].

Το μέγεθος της VPg ποικίλλει από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων σε διαφορετικούς picorna ιούς και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιικό γονίδιο. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O₄-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η VPg πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο, ενώ δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους εντεροϊούς. Το mRNA των εντεροϊών διαφέρει από το ιικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ιικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδυνο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους [Nomoto A et al (1977), Pettersson RF et al (1977)]. Μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού καταλύει την αφαίρεση της VPg από το ιικό RNA [Ambros V et al (1978)]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [Nomoto A et al (1977), Pettersson RF et al (1978)].



Εικόνα 1.1.3.1: Η 5' αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών μαζί με το IRES.

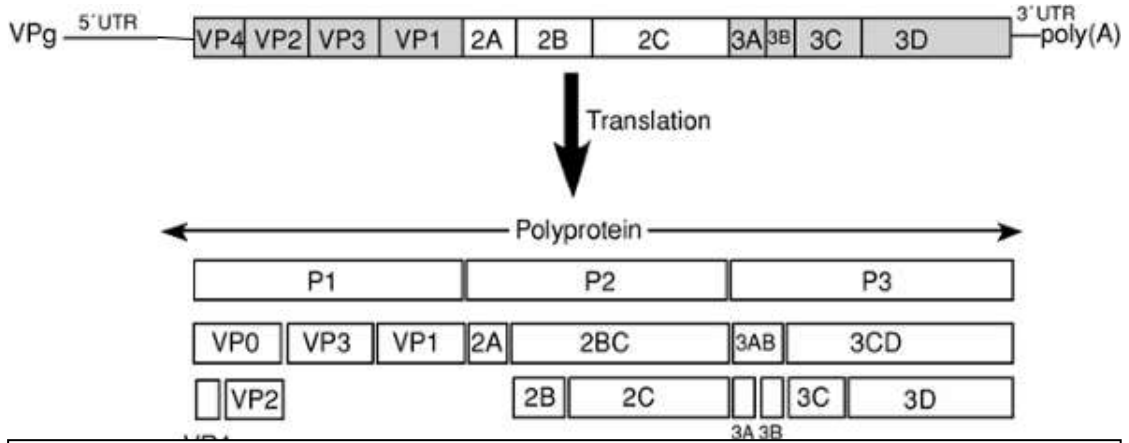
Οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μακριές και υψηλά δομημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος, ενώ η ύπαρξη δευτεροταγούς δομής φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα του RNA. Η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [Racaniello V (2007)].

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια, και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [Jacobson S J et al (1993)]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [Brown DM et al (2005), Todd S et al (1997)]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [Yogo Y, Wimmer E (1972)]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) του θετικού κλώνου [Yogo Y et al (1974)]. Ένα ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [Spector DH, Baltimore D (1974)].

Τα αποτελέσματα βιοχημικών μελετών σε κύτταρα μολυσμένα από πολιοϊούς προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες [Summers DF, Maizel JV (1968)]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί ένα μοναδικό ORF [Kitamura N et al (1981), Racaniello VR, Baltimore D et al (1981)]. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα πρόδρομα ατεμάχιστα μόρια έχουν επίσης ορισμένες λειτουργίες κατά την αντιγραφή.

Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις περιοχές: P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία (2^{Apro} , 3C^{pro} , 3CD^{pro}) και την αντιγραφή του γενώματος (2B, 2C, 3AB,

3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}), ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από την περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές-καψιδιακές πρωτεΐνες. (εικόνα 1.1.3.2)



Εικόνα 1.1.3.2: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. **Πάνω:** διάγραμμα του ιικού RNA γενώματος, με την VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, το 5'UTR, τα γονίδια των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(A) ουρά. **Κάτω:** Ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης αρχικά σε τρεις περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ιικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού.

1.2 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η αντιγραφή των εντεροϊών γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA τότε απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Μόλις, το θετικής πολικότητας ιικό RNA, εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν ικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί γίνονται κυρίως από δύο ικές πρωτεϊνάσες: την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Μεταξύ των πρωτεϊνών που συντίθενται είναι και η ιική RNA-εξαρτώμενη RNAπολυμεράση και οι βοηθητικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γενώματος και τη σύνθεση του mRNA. Το πρώτο βήμα της αντιγραφής του γενώματος είναι η αντιγραφή του θετικού RNA κλώνου. Κατά την αντιγραφή η ιική πολυμεράση συνθέτει αρχικά ένα συμπληρωματικό αρνητικής πολικότητας RNA κλώνο ο οποίος θα αποτελέσει μήτρα για την σύνθεση επιπρόσθετων θετικών κλώνων. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ικές πρωτεΐνες. Όταν πλέον ο αριθμός των πρωτεϊνών του καψιδίου είναι αρκετός, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή, σχηματίζοντας τελικά το εικοσαεδρικό καψίδιο. Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA συνδέονται στα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες, κάτι που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [Racaniello V (2007)].

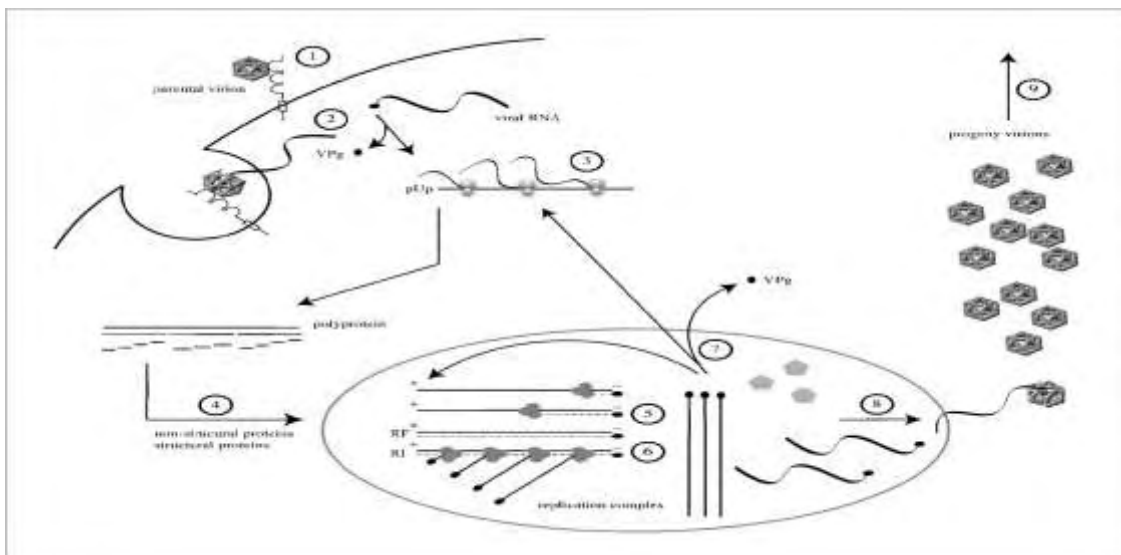
Εικόνα 1.2.1: Σύνοψη του κύκλου ζωής του πολιοϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1) και απέκδυση του ιικού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. Ο ιικός (+) RNA κλώνος αντιγράφεται από τις ικές RNA πολυμεράσες για να σχηματιστούν πλήρους μήκους (-) RNA κλώνοι (5), οι οποίοι αντιγράφονται στη συνέχεια για να παραχθεί επιπρόσθετο (+) RNA (6). Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο νέο-συντεθειμένος (+) RNA κλώνος μεταφράζεται για να παράγει επιπρόσθετες ικές πρωτεΐνες (7). Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, οι (+) κλώνοι εισέρχονται στο μορφογενετικό μονοπάτι (8). Τα νέο-συντεθειμένα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση (9).

Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια (εικόνα 1.2.1) :

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

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων μέσω της προσκόλλησής τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Οι ιοί έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά για να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς του κυττάρου, ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [Mendelsohn CL et al (1989)].

Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί



υποδοχείς για τους picorna ιούς, όπου και μερικοί μοιράζονται μεταξύ μελών άλλων οικογενειών. Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει επίσης, εν μέρει, την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (polio virus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών απεκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση

σύνδεσης των πολιοϊών [Koike S et al (1991), Morrison ME, Racaniello VR (1992)]. Μοντέλα των συμπλόκων πολιοϊών-PVR που παρήχθησαν από δεδομένα κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού.

Ορθόλογα του *pvr* γονιδίου βρίσκονται στα γονιδιώματα ενός αριθμού θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένου και αυτών που δεν είναι ευάλωτοι στην μόλυνση των πολιοϊών [Iida-Hosonuma M et al (2003)]. Η αμινοξική αλληλουχία της περιοχής 1 του PVR ποικίλει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των μη-ευάλωτων θηλαστικών, ειδικά στις περιοχές που είναι γνωστό ότι έρχονται σε επαφή με τους πολιοϊούς. Η απουσία θέσης σύνδεσης πολιοϊών σε αυτά τα μόρια PVR εξηγεί γιατί η μόλυνση των πολιοϊών είναι περιορισμένη στους πίθηκους. Αξίζει να σημειωθεί, πως αν και η κυτταρική λειτουργία του PVR είναι ακόμα άγνωστη, πιθανότατα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους.

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι αύλακες αυτές είναι πάρα πολύ βαθιές ώστε να μην επιτρέψουν τη διείσδυση αντισωμάτων, [Rossmann MG (1989)]. Αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστεύεται ότι κρύβει αμινοξέα, κρίσιμα για δέσμευση από το ανοσοποιητικό σύστημα του υποδοχέα. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [Colston E, Racaniello VR (1994), Colston EM, Racaniello VR (1995), Harber J et al (1995) , Liao S, Racaniello V (1997)].

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του οδηγεί σε μείζονες δομικές αλλαγές του ιού. Τα επακόλουθα σωματίδια που ονομάζονται *altered* ή *σωμάτια A*, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη του καψιδίου VP4. Επιπροσθέτως, το N-άκρο της VP1, που συνήθως βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται πλέον στην επιφάνεια του σωματίου A [Fricks CE, Hogle JM (1990)]. Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση

του πολιοϊού που οδηγούν στην απέκδυση του επάγονται από τον PVR [Racaniello V. (2007)].

Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 που απελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Ένας ιός που φέρει μετάλλαξη στο 28^ο αμινοξύ της VP4 μπορεί να συνδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε σωματίο A, αλλά μπλοκάρεται σε επακόλουθο στάδιο [Moscufo N et al (1993)].

Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η αποτελεσματικότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των εντεροϊών και του PVR καθορίζεται, εν μέρει, από την αλληλουχία των αμινοξέων των αντιγονικών περιοχών και πιθανώς από την χωροταξική διαμόρφωση των αμινοξέων που βρίσκονται προσκείμενα σε αυτές τις περιοχές.

Αξίζει να σημειωθεί, πως πολλοί από τους ιούς αυτούς χρησιμοποιούν συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή για την ενεργοποίηση σε συνυποδοχείς, την επαγωγή ενδοκυτταρικών αποκρίσεων αλλά και την επαγωγή ενδοκυτταρικών συνθηκών, ευνοϊκών για την μόλυνση. Η σηματοδότηση που ξεκινά στην κυτταρική μεμβράνη πιθανότατα μπορεί να συνεχίσει σε κυτταροπλασματικά οργανίδια (πχ ενδοσώματα) [Kew O et al (1993)]. Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης ή άλλων κινασών, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [Pelkmans L et al (2004) ,Greber UF (2002), Tagawa A et al (2005)]. Η επαγόμενη από τον ιό σηματοδότηση εξαρτάται από δεύτερους αγγελιαφόρους (phosphatidylinositides, διακυλογλυκεριδια, και ασβεστίου), και άλλους ρυθμιστές της μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Πολλοί από τους ιούς αυτής της κατηγορίας χρειάζονται μόνο την ύπαρξη ενός υποδοχέα για την είσοδό τους εντός της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ παράλληλα, για την είσοδο άλλων απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου, που ονομάζεται συνυποδοχέας. Για παράδειγμα, μερικοί από τους Coxsackie B ιούς χρησιμοποιούν ως συνυποδοχέα τους, τις ιντεγκρίνες, ενώ

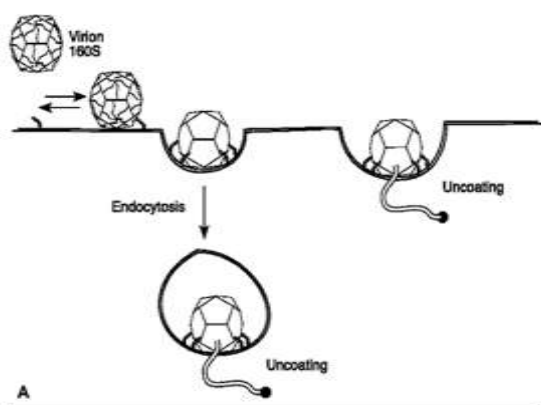
Εικόνα 1.2.1.2: Μοντέλο εισόδου των εντεροϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο προσδένεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωματίων A. Το ιικό RNA εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.

πολλοί echo ιοί την μικροσφαιρίνη για την πιο γρήγορη είσοδό τους εντός του κυττάρου.

Ο υποδοχέας για τους Coxsackie B ιούς είναι ο υποδοχέας CAR ο οποίος χρησιμοποιείται από κοινού και από τους Coxsackie B και από τους περισσότερους αδενοϊούς, και έχει ερευνηθεί εκτενώς από τότε που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε το 1997. Η πρωτογενής αλληλουχία του CAR δείχνει ότι είναι ένα μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, και περιέχει δύο Ig-like περιοχές: μία αμινοτελική περιοχή V-like και μία C2-like περιοχή [Carson (2001)].

1.2.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [Ambros V, Baltimore D (1980)]. Η αλληλούχιση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που



περιέχει επτά AUG κωδικόνια [Kitamura N et al (1981), Racaniello VR, Baltimore D. (1981)], κάτι που αργότερα βρέθηκε και σε άλλους picornaviruses, δείχνοντας και την ύπαρξη υψηλά δομημένων RNA-δομών. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά

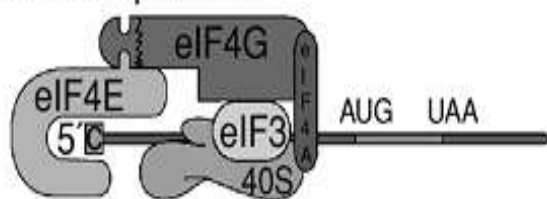
δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*).

Τα *IRES* των ιών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε ομάδες με βάση ένα αριθμό κριτηρίων όπως: η αρχική αλληλουχία, η δευτεροταγής δομή, η τοποθεσία του

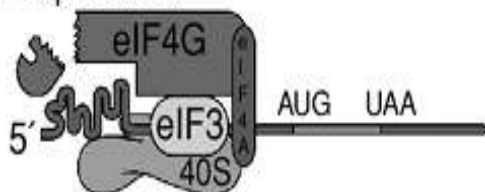
κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα σε διάφορα κύτταρα. Μπορούμε να διακρίνουμε 2 τύπους IRES στους picorna ιούς. Τον τύπο I όπου ανήκουν οι εντεροϊοί και οι ρινοϊοί, τον τύπο II στον οποίο συγκαταλέγονται οι καρδιοϊοί και αφθοϊοί. Στα τύπου I IRES το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50 με 100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES.

Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του τύπου I IRES περιλαμβάνει τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES και την ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης. Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με την eIF3 συνδεδεμένη στην C- τελική περιοχή της eIF4G, που

5'-end dependent



IRES-dependent



συνδέεται απευθείας στο IRES (εικόνα 1.2.2.1).

Υπάρχει μία μικρή διατήρηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των IRES. Τα IRES των picorna ιών περιέχουν εκτεταμένες περιοχές δευτερεύουσας δευτεροταγούς δομής του RNA, που δεν είναι αυστηρά συντηρημένες μεταξύ των εντεροϊών αλλά είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση του ριβοσώματος. Ένα μοτίβο που είναι συντηρημένο μεταξύ των IRES των picorna ιών, είναι μία αλληλουχία GNRA (G, γουανίνη N, οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, R πουρίνη, A αδερίνη) στη θηλεία IV του τύπου I. Ένα άλλο συντηρημένο στοιχείο είναι ένα μοτίβο YN-Xm-AUG, στο οποίο η Yn είναι μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη και το Xm είναι ένα διάστημα (spacer) 15 έως 25 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από ένα κωδικόνιο AUG.

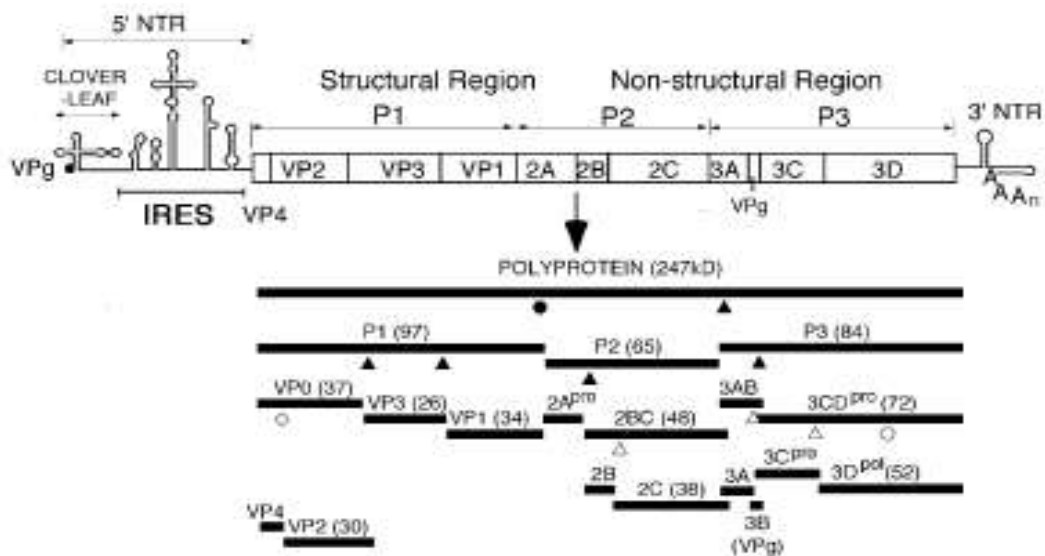
Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού,

Εικόνα 1.2.2.1: Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-καλύπτρα-εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η IRES-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES.

μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (*incis*) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες *incis* ή *intrans* (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τρεις πρωτεΐνάσες: την L_{pro}, την 2A^{pro} και την 3C^{pro} ή 3CD^{pro}.

Σε μολυσμένα με εντεροϊό κύτταρα ο αρχικός τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης μεταξύ P1 και P2 γίνεται από την 2A^{pro}. Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες πρωτεολύονται από την 2A^{pro}, όπως οι eIF4GI, eIF4GII και Pabp. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των εντεροϊών, η θέση τεμαχισμού για την 2A^{pro} είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Η 3C^{pro} είναι η πρωτεΐνάση που κάνει τον αρχικό τεμαχισμό μεταξύ 2C και 3A περιοχής. Σε αντίθεση με την 2A^{pro}, η 3C^{pro} τεμαχίζει και σε δεύτερο στάδιο τα P1 και P2 πρόδρομα μόρια. Η 3C^{pro} των εντεροϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly.

Τόσο η $3C^{pro}$ όσο και η $2A^{pro}$ είναι ενεργές στο πολυπεπίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτό-τεμαχισμό. Αφού απελευθερωθούν οι πρωτεΐνάσες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *intrans*. Ο αρχικός τεμαχισμός στον καταρράκτη επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης ξεκινάει με την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της $2A^{pro}$. Στη συνέχεια η $3CD^{pro}$ απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Η πρωτεΐνάση αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον τύπου 1 πολιοϊό πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την $3C^{pro}$. Τόσο η $3C^{pro}$ όσο και η $3CD^{pro}$ επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* 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

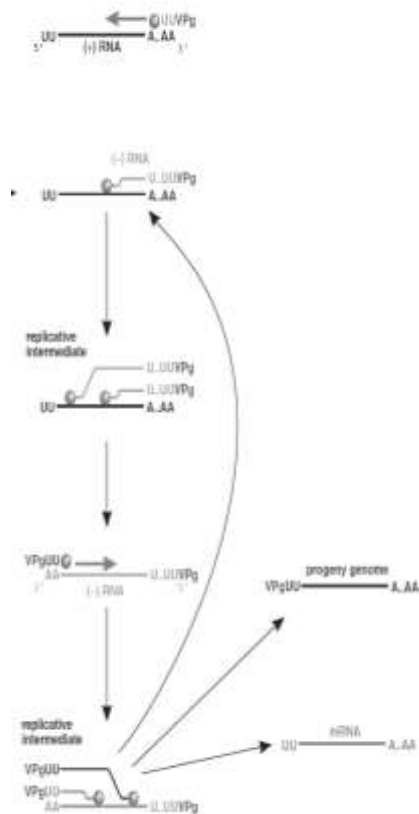


πρόδρομες μορφές τους. Η $3D^{pol}$ αλληλουχία μέσα στην $3CD^{pro}$ απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστηκή επεξεργασία από το $3C^{pro}$ μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν

Εικόνα 1.2.2.2: πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης. Τα τρίγωνα δείχνουν τα σημεία πρωτεόλυσης από τις $3C^{pro}$ / $3CD^{pro}$ και οι κύκλοι από την $2A^{pro}$ όπου τα μαύρα σχήματα δείχνουν γεγονότα πρωτεόλυσης που συμβαίνουν με γρήγορο ρυθμό και τα άσπρα σχήματα με αργό ρυθμό [Mueller S, Wimmer E, Cello J].

υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνάσες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί [Racaniello V (2007)].

1.2.3 Αντιγραφή του ιικού RNA



Εικόνα 1.2.3.1: Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιικού RNA.

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Αν και η διαδικασία της αντιγραφής των εντεροϊών, δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, ένα απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ιικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+) όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένους σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [Giachetti C, Semler BL (1991), Novak JE, Kirkegaard K. (1991)].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ($3D^{pol}$) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης $3CD^{pro}$, η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεΐνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης.

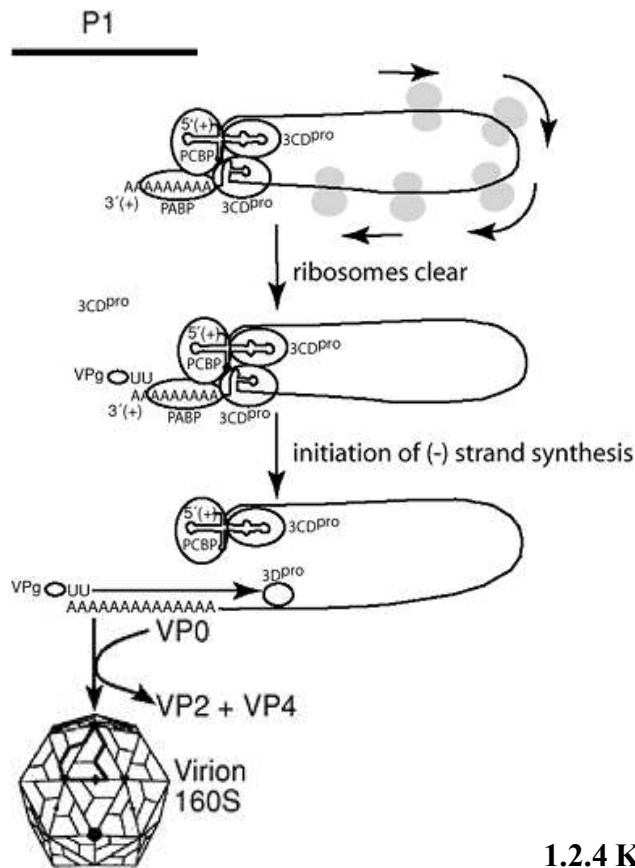
Η $3D^{pol}$ είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η $3D^{pol}$ δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην

κωδική περιοχή των εντεροϊών [Wickman I (1907), Rieder E et al (2000)]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [Morasco BJ et al (2003), Murray KE, Barton DJ (2003)].

Η σύνθεση του ιικού γενώματος γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Μία μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται κατά τη διαδικασία αυτή και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης [Dales S et al (1965), Schlegel A et al (1996)]. Η ιική σύνθεση του RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών [Bienz K et al (1987), Cho MW et al (1994), Egger D et al (2000)]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής, αυξάνοντας τα επίπεδα δραστηριότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3D^{pol} και την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [Echeverri AC et al (1995)].

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει, τότε το RNA αντιγράφεται και τότε μεταφράζεται. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (*PCBP*-βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CD^{pro} συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει την μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα [Gamarnik AV, Andino R (1998)].



ικών σωματιδίων

Εικόνα 1.2.3.2: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου. Οι ικές πρωτεΐνες 3CD^{pro}, VPg, PABP και PCBP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα άκρα του RNA, σχηματίζοντας ένα κυκλικό RNP. Κατά την αναστολή της μετάφρασης, αρχικά, απομακρύνονται τα ριβοσώματα από το ικό RNA. Στη συνέχεια, η VPg-pUrpU αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ικού RNA και σχηματίζει το κυκλικό πρωταρχικό RNA σύμπλοκο αντιγραφής. Η σύνθεση του (-)RNA κλώνου ξεκινάει με την επιμήκυνση του VPg-pUrpU από την 3D^{pol}.

1.2.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελιού και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Όταν η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 τεμαχίζονται από την πρωτεϊνάση 3CDpro. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελιών. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο της VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο τους βρίσκεται στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Η επεξεργασία αυτή παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δηλαδή δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο των VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια σχηματίζουν ένα πενταμερές, με συντελεστή καθίζησης 14S.

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεϊνάση που πραγματοποιεί αυτόν τον τελευταίο τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0

που κόβεται βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και ώριμων ιοσωματίων και δεν είναι προσιτός σε ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες.

Η διαδικασία καψιδίωσης του εντεροϊού είναι ειδική, καταλήγοντας στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι των ικών mRNA, αρνητικών

Εικόνα 1.2.4.1: *Μορφογένεση του εντεροϊού. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται σε VP0+VP3+VP1 πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές 5S. Τα πρωτομερή σχηματίζουν τα πενταμερή 14S και αυτά με τη σειρά τους τα άδεια ιικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S*

ικών RNA ή οποιοδήποτε κυτταρικό RNA [Nomoto A et al (1977), Novak JE, Kirkegaard K. (1991)]. Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η καψιδίωση του ικού γονιδιώματος συνδέεται με τη σύνθεση του RNA, και θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί μόνο τα RNA που περιέχουν VPg καψιδιώνονται.

Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή περίπου 7-8 ώρες μετά τη μόλυνση. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [Tucker SP et al (1993)]. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανώδων κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τη σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων είναι άγνωστη. Μία υπόθεση είναι ότι η διαρροή των λυσοσωματικών περιεχομένων είναι εν μέρει υπεύθυνη [Guskey LE et al (1970)].

1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η ιική παθογένεση είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα όταν ένας ιός μολύνει έναν ξενιστή. Γνωρίζουμε ότι μιλώντας για ιούς, αναφερόμαστε σε υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των ζωντανών κυττάρων και των ιστών. Τα κύτταρα που στοχεύονται από ιούς κατά την μόλυνση επιβιώνουν, διαφοροποιούνται, και λειτουργούν σε έναν ιστό που έχει μια περίπλοκη σχέση με άλλους ιστούς και φυσιολογικές διεργασίες στον ανέπαφο ξενιστή.

Η παθογένεση ως όρος αναφέρεται συχνά στην επαγωγή της ασθένειας από έναν ιό, παρά τη διαδικασία της μόλυνσης.

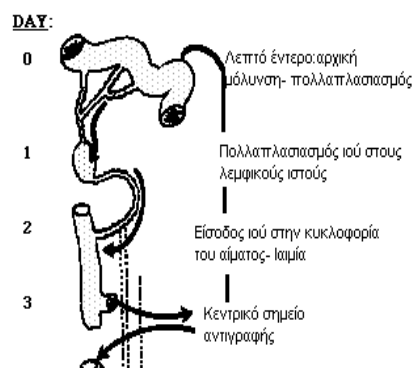
Η ιική παθογένεια είναι το ολοκληρωμένο αποτέλεσμα πολλών πολύπλοκων παραγόντων που είναι μοναδικοί για ένα συγκεκριμένο ιό, ένα συγκεκριμένο είδος, και ένα συγκεκριμένο ξενιστή. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων καθορίζει την φύση της λοίμωξης, κατά πόσο μπορεί να οδηγήσει σε ασθένεια, αλλά και τη σοβαρότητα αυτής.

Σχετικά με την παθογένεια των εντεροϊών, οι μελέτες επικεντρώθηκαν πάνω στους πολιοϊούς, εξαιτίας της μεγάλης διάδοσης τους και της σημασίας τους και έχουν προταθεί κυρίως τρία μοντέλα [Minor DP (1999)]:

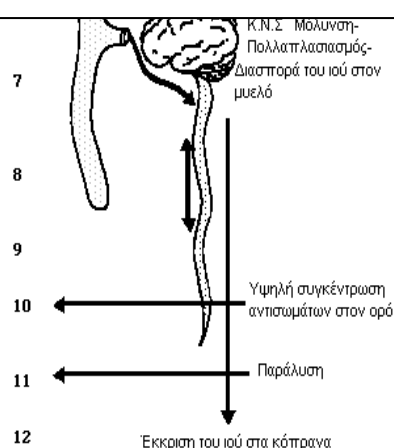
-το μοντέλο του **Flexner** που προτάθηκε το 1910 και σύμφωνα με το οποίο η φυσιολογική οδός μετάδοσης της ασθένειας στους ανθρώπους είναι μέσω της μύτης.

-το μοντέλο του **Bodian** που προτάθηκε το 1950 και σύμφωνα με το οποίο ο ιός μετά την είσοδό του στον οργανισμό εγκαθιδρύει μία αρχική μόλυνση στους λεμφαδένες του εντέρου και κατόπιν σε πιο μακρινούς λεμφαδένες ώσπου τελικά εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος και από εκεί σε άλλους ευαίσθητους ιστούς περιλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος [Bodian D (1955)].

-το μοντέλο του **Sabin** το οποίο προτάθηκε την ίδια χρονική περίοδο με το μοντέλο του Bodian και φαίνεται πως είναι πιο κοντά στην πραγματική κατάσταση. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο ο ιός εγκαθιδρύει αρχικά μία μόλυνση στις βλεννώδεις



Εικόνα 1.3.1: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών [Melnick JL (1996)]



επιφάνειες του φάρυγγα και του εντερικού σωλήνα. Στη συνέχεια ο ιός μπορεί να μεταδοθεί από τον βλεννογόνο στους τοπικούς λεμφαδένες από τους οποίους μπορεί να απομονωθεί αλλά αυτό δεν σημαίνει απαραίτητως ότι ο ιός μπορεί να αντιγράφεται εκεί. Κατόπιν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας μία χαμηλού βαθμού ιαιμία και έτσι μπορεί πλέον να μολύνει πιο απομακρυσμένους λεμφικούς ιστούς ή άλλες ευαίσθητες περιοχές. Η αντιγραφή του ιού σε αυτές τις δευτερογενείς θέσεις παράγει την δευτερογενή ή κύρια ιαιμία κατά την οποία ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα λόγω του μεγάλου ιικού φορτίου και τελικά είναι πιθανόν να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ανοσίας του ατόμου.

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπεται από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [G.Palacios, MS Oberste (2005)].

Σύμφωνα με στοιχεία που δημοσιεύτηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), οι ιοί Coxsackie έχουν παγκόσμια μετάδοση, με αυξημένη συχνότητα τους ζεστούς μήνες σε εύκρατα κλίματα. Η είσοδος των εντεροϊών γίνεται από το στόμα και η μόλυνση προχωρά μέσω του πεπτικού συστήματος. Εξαιρέση αποτελούν ο ιός Coxsackie A21 (CAV21), ο οποίος μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος, και ο εντεροϊός 70 (EV70), ο οποίος εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων [Knipe and Howley, (2007)]. Λοιμώξεις από ιούς Coxsackie μπορούν να μεταδοθούν απευθείας από άτομο σε άτομο μέσω των κοπράνων, του στόματος ή την επαφή με εκκρίσεις του φάρυγγα [Hunter (1998)]. Επιπλέον, ο ιός μπορεί να μεταδοθεί με αεροζόλ ή μέσω του νερού.

Ο ιός μολύνει τους βλεννογόνους ιστούς του φάρυγγα, του εντέρου ή και τα δύο και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος όπου αποκτά πρόσβαση σε όργανα-στόχους, όπως οι μήνιγγες, το μυοκάρδιο και το δέρμα. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο, προκαλείται ιαιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο – στόχο. Η περίοδος επώασης του ιού, δηλαδή ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση

με εντεροϊό, σε άτομα που έχουν είτε κλινικές είτε υποκλινικές ενδείξεις, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες [Melnick J.L et al (1990)].

1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

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

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς:

A. παρέχουν την ευκαιρία για αναμφισβήτητη ταυτοποίηση του στελέχους

B. παρέχουν γνώσεις σχετικά με την κατάταξη των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους

Γ. διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων.

Για τους εντεροϊούς, η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχιση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μόνο μεταξύ στενών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των άγριων απομονώσεων εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών [Rico-Hesse R. et al (1987)].

Η τεχνολογία αλληλούχισης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PV, όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών [Kew O et al (1993), Kew OM et al (1995)]. Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των απομονώσεων σε μια επιδημία, και (γ) διαφορές μεταξύ των προϊόντων απομόνωσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση ενός ιού. [Lipskaya G et al (1995), Mulders MN et al (1995), Rico-Hesse R et al (1987), Zheng DP et al (1993)].

Μελέτες σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογία των μη-πόλιο εντεροϊών, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση των απομονώσεων του ιού μέσα σε ένα ορότυπο, καθώς και τη σύγκριση των

απομονώσεων από διαφορετικούς οροτύπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός του γένους Picornaviridae.

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες χρησιμοποιώντας την αλληλούχιση έχουν αναφερθεί για CVB1, CVB5, EV30, και EV71 [Brown BA et al (1999), Drebot MA et al (1999), Kopecka H et al (1995), Oberste MS et al (1999)]. Οι γονότυποι του Echovirus 30 έχουν δείξει μία αλληλεπικαλυπτόμενη διαδοχή μεταξύ των απομονώσεων από τις Ηνωμένες Πολιτείες [Oberste MS et al (1999)].

Αντίθετα στην Ελλάδα, έχουν αναφερθεί διάφορα περιστατικά ανά περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, ένα από τα στελέχη που ευθύνονταν για το μεγάλο περιστατικό της άσηπτης μηνιγγίτιδας το 2007 ήταν το E6 [Logotheti M et al (2007), Kyriakopoulou Z et al (2011)]. Το 2001 ανιχνεύθηκαν τα στελέχη EV30/EV13/E7, που προκάλεσαν άσηπτη μηνιγγίτιδα, στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας. [Kottaridi C et al (2005), Siafakas N et al (2004)].

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

2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας ήταν ο σχεδιασμός εκκινητών και η εύρεση των κατάλληλων συνθηκών για την εκτέλεση PCR δοκιμασιών με σκοπό την ανάπτυξη μίας Multiplex RT PCR για την ανίχνευση και τον μοριακό χαρακτηρισμό των Coxsackie A και Coxsackie B ιών.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 8 πρότυπα στελέχη Coxsackie A και 7 κλινικά δείγματα Coxsackie A, και 6 πρότυπα στελέχη Coxsackie B και 12 κλινικά δείγματα Coxsackie B.

Στέλεχος	Ορότυπος	Προέλευση	Έτος απομόνωσης
----------	----------	-----------	-----------------

Κλινικά Δείγματα Coxsackie A

65/89/1	CAV9	Cantacuzino Institute	1989
113/73/2a	CAV9	Cantacuzino Institute	1973
611/80/1	CAV9	Cantacuzino Institute	1980
A9/He1	CAV9	Environment/Cyprus	2002
A9/He2	CAV9	Environment/Cyprus	2002
A9/He4	CAV9	Environment/Cyprus	2002
A9/He5	CAV9	Environment/Cyprus	2002

Κλινικά Δείγματα Coxsackie B

98/74/2	CBV1	Cantacuzino Institute	1974
99/74/1	CBV1	Cantacuzino Institute	1974
118/95/2	CBV2	Cantacuzino Institute	1974
116/95/2	CBV2	Cantacuzino Institute	1974
109/85/1	CBV3	Cantacuzino Institute	1974
77/78/3	CBV3	Cantacuzino Institute	1974
69/86/1	CBV4	Cantacuzino Institute	1974
169/75/1	CBV4	Cantacuzino Institute	1975
14/76/1	CBV5	Cantacuzino Institute	1970
254/77/1	CBV5	Cantacuzino Institute	1973
7/73/19	CBV5	Cantacuzino Institute	1973
86/73/1	CBV6	Cantacuzino Institute	1973

Πρότυπα CAV

Πρότυπα CBV

CAV 11	CBV 1
CAV 13	CBV 2
CAV 17	CBV 3
CAV 18	CBV 4
CAV 20	CBV 5
CAV 21	CBV 6
CAV 24	
CAV 9	

Πίνακας 3.1.1: Παρουσιάζονται η προέλευση, ο ορότυπος και το έτος απομόνωσης του δείγματος.

3.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erpendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erpendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erpendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 3.2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα RD ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (90μl από κάθε erpendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση χαρακτηριστικής κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα RD με θρεπτικό υλικό MEM-D).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M

Εικόνα 3.2.1: Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλμισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων (AB: το πρώτο δείγμα, CD: το δεύτερο δείγμα, EF: το τρίτο δείγμα, GH: το τέταρτο δείγμα). Οι αριθμοί μέσα στα πηγαδάκια απεικονίζουν τις σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων ενώ με το γράμμα M απεικονίζεται η θέση των μαρτύρων.

Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας με τη μεγαλύτερη αραιώση που παρουσίασε CPE ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες

κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα RD ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα RD μη μολυσμένα ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των πλαστικών φιαλών κυτταροκαλλιιεργειών με την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ RNA

Πρώτο βήμα ήταν η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) που έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [Casas I et al (1995)]. Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroylsacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιιεργειας. Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20 °C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκειμένο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Το RNAτων δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.4 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι

απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενόματος που μας ενδιαφέρει.

Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1μl random primers d(N7) (Metabion) (100 pmol/μl), 1μl 40 mM dNTPs και ddH₂O (5μl/tube). Σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Techne TC-512. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 4μl 5X first strand Buffer, 2μl 0,1M DTT, 0,5μl RNaseout 20units/μl, 0,5μl M-MLV (Invitrogen) (200units/μl) και 1μl ddH₂O. Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

3.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία, αρχικά εκτελέστηκαν 4 αντιδράσεις PCR με 4 διαφορετικά ζεύγη εκκινητών σε κάθε πρότυπο και κλινικό δείγμα των Coxsackie A και B ιών (Πίνακας 3.5.1)

Πίνακας 3.5.1 : Περιγράφονται η ονομασία των εκκινητικών μορίων, η αλληλουχία τους, η θέση υβριδισμού τους, το μήκος του ενισχυμένου τμήματος από κάθε ζευγος εκκινητών και η πολικότητά τους.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Πολικότητα	Θέση υβριδισμού	Μήκος Προϊόντος (bp)
UG52- UC53	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG TTGTCACCATAACCAGCCA	Sense Antisense	5'UTR :168-188 5'UTR :588-606	423 bp
ENV2- 1200R	CCCCTGAATGCGGCTAATC GGGAATTTCCACCACCACC	Sense Antisense	5'UTR :451-469 VP2 :1196-1177	745 bp
AN89- AN88	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Sense Antisense	VP1 :2602-2627 VP1 : 2977-2951	375 bp
CHR1- CHR2	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Sense Antisense	2C : 4284-4308 2C: 5084-5061	800 bp

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 1μl διαλύματος MgCl₂ 25mM (τελικής συγκέντρωσης 2mM από την οποία 1,5mM προέρχονται από το MgCl₂ που περιέχεται στο Taq Buffer), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl primers (1 μl από τον κάθε sense και 1μl από τον κάθε antisense σε συγκέντρωση 25pmol/μl), 0.5 Units ενζύμου Kara Taq DNA Polymerase, και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne TC-512) στις εξής συνθήκες για κάθε ζεύγος εκκινητικών μορίων (πίνακας 3.5.2):

Πίνακας 3.5.2: Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν σε κάθε PCR για κάθε εκκινητικό ζεύγος αντίστοιχα

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες PCR		
UG52/UC53	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 2 min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 30 sec	} 50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	45 °C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης:	72 °C για 30 sec	
Θερμοκρασία επιμήκυνσης των ημιτελών κλώνων:	72 °C για 2 min	1 κύκλος	
ENV2/1200R	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 2 min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 30 sec	} 50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	48 °C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης:	72 °C για 45 sec	
Θερμοκρασία επιμήκυνσης των ημιτελών κλώνων:	72 °C για 2 min	1 κύκλος	
AN89/AN88	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 2 min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 30 sec	} 50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	60 °C για 30 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης:	72 °C για 30 sec	
Θερμοκρασία επιμήκυνσης των ημιτελών κλώνων:	72 °C για 2 min	1 κύκλος	
CHR1/CHR2	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 2 min	1 κύκλος
	Θερμοκρασία αποδιάταξης:	95 °C για 30 sec	} 50 κύκλοι
	Θερμοκρασία υβριδοποίησης:	50 °C για 20 sec	
	Θερμοκρασία επιμήκυνσης:	72 °C για 50 sec	
Θερμοκρασία επιμήκυνσης των ημιτελών κλώνων:	72 °C για 2 min	1 κύκλος	

3.6 MULTILEX PCR

Στη Multiplex PCR από τα 4 ζεύγη εκκινητών που αναφέρθηκαν παραπάνω επιλέχθηκαν 3 για να δημιουργηθεί από τον συνδιασμό τους η Multiplex PCR. Η επιλογή των 3 ζευγών εκκινητών έγινε σύμφωνα με τους εξής κανόνες :

A. Τα προϊόντα σε κάθε ζεύγος εκκινητών να διαφέρουν τουλάχιστον κατά 50bp μεταξύ τους έτσι ώστε να είναι δυνατός ο διαχωρισμός των προϊόντων κατά την ηλεκτροφόρηση.

B. Οι θερμοκρασίες υβριδισμού των εκκινητών να είναι παρόμοιες.

Γ. Οι εκκινητές στις μεμονωμένες τους αντιδράσεις PCR να παρουσιάζουν μεγάλη ειδικότητα και ευαισθησία , για τα πρότυπα δείγματα.

Δ. Οι εκκινητές να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους και να μην αλληλεπικαλύπτονται οι περιοχές ενίσχυσης τους.

Δ. Μέσω των προϊόντων ενίσχυσης να μπορεί ο ερευνητής να αντλήσει πληροφορίες για το γένος και τον ορότυπο του δείγματος, καθώς και το σύνολο των προϊόντων ενίσχυσης να παρέχει στον ερευνητή ένα αρκετά μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για αλληλούχηση.

Έτσι σύμφωνα με τους παραπάνω κανόνες επιλέχθηκαν τα ζεύγη εκκινητών:

1. **UG52/UC53**
2. **AN89/AN88**
3. **CHR1/CHR2**

Κατά τη δημιουργία της Multiplex PCR αντίδρασης εφαρμόστηκαν και εξετάστηκαν διάφορες συνθήκες, έως ότου καταλήξουμε στις τελικές, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω, καταλήγοντας σε 2 αντιδράσεις Multiplex PCR η μία για τους Coxsackie A ιούς και η άλλη για τους Coxsackie B ιούς.

Η κάθε αντίδραση της multiplex PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Ο τελικός όγκος του κάθε μικροσωληναρίου ήταν 25μl.

Στη Multiplex PCR για τους Coxsackie A ιούς αυτά τα 25μl αποτελούνται από: 3μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1,2mM), 5.5μl ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA2G Buffer A 5x) το οποίο σε 1x περιέχει 1,5mM MgCl₂ δημιουργώντας έτσι τελική συγκέντρωση MgCl₂ 1,65mM , 1 μl από κάθε εκκινητή τελικής συγκέντρωσης όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.6.1A , 1 Unit ενζύμου KAPA2G Fast Hot Start (KAPA), 2μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 25μl.

Στη Multiplex PCR για τους Coxsackie B ιούς αυτά τα 25μl αποτελούνται από: 3μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελικής συγκέντρωσης 1,2mM), 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA2G Buffer A 5x) το οποίο σε 1x περιέχει 1,5mM MgCl₂ δημιουργώντας έτσι τελική συγκέντρωση MgCl₂ 1,5mM , 1 μl από κάθε εκκινητή τελικής συγκέντρωσης όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 3.3.6.1B , 1 Unit ενζύμου KAPA2G Fast Hot Start (KAPA), 2μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 25μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια και των 2 Multiplex αντιδράσεων τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Techne TC-512) στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
	-15 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA.
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 45 °C για την υβριδοποίηση των 3 ζευγών εκκινητών
	-20 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση

Πίνακας 3.3.6.1 A:

Εκκινητές	Τελική Συγκέντρωση
UG52	50pmol
UC53	50pmol
AN89	10pmol
AN88	10pmol
CHR1	50pmol
CHR2	50pmol

Πίνακας 3.3.6.1 B:

Εκκινητές	Τελική Συγκέντρωση
UG52	10pmol
UC53	10pmol
AN89	10pmol
AN88	10pmol
CHR1	50pmol
CHR2	50pmol

3.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (InvitrogenUltra-PureGelAgarose) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμίχθηκαν, σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου

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

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl από κάθε PCR προϊόν αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης που περιέχει 50% σουκρόζη και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

3.8 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Αφού ελεγχθεί το πήκτωμα και επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της PCR, προχωράμε στον καθαρισμό των προϊόντων της PCR. Συγκεκριμένα, τα υπόλοιπα 40 µl της αντίδρασης ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Οι επιθυμητές ζώνες αποκόπτονται από το πήκτωμα και τοποθετούνται σε eppendorf των 1,5 ml. Ακολουθεί ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR με τη βοήθεια του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

3.9 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Αφού έχει ολοκληρωθεί ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της μοριακής κλωνοποίησης. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: i) η αντίδραση λιγάσης, ii) η παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, iii) ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων και iv) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει, στον φορέα.

Αντίδραση τοποϊσομεράσης: Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο TOPO –TOPO TA Cloning Kit, ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1 μl TOPO vector (50 ng/ μl), 1 μl Salt Solution, 1 μl ddH₂O και 3 μl καθαρισμένο PCR product. Η αντίδραση έχει συνολικό όγκο 6 μl και μετά την ολοκλήρωση του μείγματος το αφήνουμε να επωαστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου – CaCl₂): Αρχικά συλλέγουμε βακτηριακά κύτταρα από το απόθεμα γλυκερόλης στους -80 °C, τα μεταφέρουμε υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένης καλλιέργειας LB Broth και επωάζονται στους 37 °C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε από την καλλιέργεια αυτή, 1 ml σε 50 ml LB Broth και ακολουθεί επώαση στους 37 °C στις 210 στροφές/min για 2h. Για τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων, μετράμε την απορρόφηση της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα OD₆₀₀. Όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450 – 0,550 A, τότε σταματάμε την κυτταρική ανάπτυξη, τοποθετώντας τα στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 10 min στους 4 °C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 min στους 4 °C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Τέλος, επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M.

Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Μετά τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, θα πρέπει να μετασηματιστούν και να ενσωματωθεί σε αυτά ο ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποίησης. Η διαδικασία του μετασηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200 μl δεκτικών κυττάρων σε erpendorf των 500 μl. Στη συνέχεια, προσθέτουμε τα 6 μl του προϊόντος της αντίδρασης λιγάσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200 μl μετασηματισμένων κυττάρων σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml με 800 μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1h. Έπειτα επιστρώνουμε 200 μl κάθε καλλιέργειας σε

τριβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100 µgr/ml αμπικιλίνη. Αφού προστέθηκαν 12 µl X – Gal (50 mg/ml, Promega, USA), ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους 37 °C για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 2 – 3 λευκές (ανασυνδυσασμένες) αποικίες από κάθε τριβλίο και μεταφέρθηκαν σε 3 ml LB Broth με 100 µl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (overnight). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Nucleospin Plasmid (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI: Για να επιβεβαιώσουμε το γεγονός ότι το ένθεμα εισήχθη στη θέση ένθεσης του πολυσυνδέτη του πλασμιδίου πραγματοποιούμε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI (Εικόνα 14). Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 2 µl πλασμιδιακού DNA, 2 µl 10 x Buffer, 1 µl περιοριστικού ενζύμου EcoRI (Takara, Japan) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 20 µl. Ακολουθεί επώαση για 2h στους 37 °C και για να σταματήσει η αντίδραση (μετά το τέλος της επώασης) προστίθενται 3 µl 10x Loading Buffer. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται τα 23 µl της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1 h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne) και φωτογραφίζεται .

3.10 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές οι προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες πρότυπων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST. Για την επεξεργασία και τη μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν

προγράμματα βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

Gene Runner V. 3.05: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, τη μετάφραση της πολυπρωτεΐνης των ικών στελεχών στα τρία πιθανά πλαίσια ανάγνωσης (επιλέχθηκε αυτό που δεν περιείχε πρόωρο κωδικόνιο λήξης) και για την συρραφή των τμημάτων αλληλουχιών του EIS6b.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Το εργαλείο αυτό, το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), αποτελεί μια δημοφιλή μέθοδο εύρεσης ομοιοτήτων νουκλεοτιδικών, αμινοξικών κ.α. αλληλουχιών. Ο αλγόριθμος BLAST πραγματοποιεί αναζήτηση στη διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών (GenBank) για αλληλουχίες ή τμήματα αλληλουχιών που παρουσιάζουν ομολογία με την αλληλουχία που μελετάμε. Χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση των ικών στελεχών που απομονώσαμε και για την εύρεση «συγγενικών» ικών στελεχών που χρησιμοποιήσαμε στην επιδημιολογική και φυλογενετική μελέτη.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για κάθε ζεύγος εκκινητών εκτελέστηκαν αντιδράσεις PCR (ενότητα 3.5). Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε δις απεσταγμένο νερό για να διαπιστωθεί η ύπαρξη τυχόν επιμόλυνσης κατά την προετοιμασία και διεξαγωγή της PCR.

Στον παρακάτω πίνακα 4.1.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για κάθε PCR αντίδραση που εκτελέστηκε σύμφωνα με την ενότητα 3.5 και τον πίνακα 3.3.5.2.

Πίνακας 4.1.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των 4 PCR αντιδράσεων. Με (+) σημειώνονται τα δείγματα τα οποία παρουσίασαν το αναμενόμενο προϊόν, ενώ με (-) σημειώνεται η απουσία του αναμενόμενου προϊόντος.

Στέλεχος	UG52-UC53	ENV2-1200R	AN89-AN88	CHR1-CHR2
Πρότυπα CAV				
CAV 9	+	+	+	+
CAV 11	+	+	+	-
CAV 13	+	+	-	-
CAV 17	+	+	+	-
CAV 18	+	+	+	-
CAV 20	+	+	+	-
CAV 21	+	+	+	-
CAV 24	+	+	+	-
Κλινικά Δείγματα CAV				
65/89/1	+	+	+	+
113/73/2a	+	+	+	+
611/80/1	+	+	+	+
A9/He1	+	+	-	+
A9/He2	+	+	+	+
A9/He4	+	+	+	-
A9/He5	+	+	+	+
Πρότυπα CBV				
CBV 1	+	+	+	+
CBV 2	+	+	+	+
CBV 3	+	+	+	+
CBV 4	+	+	+	+
CBV 5	+	+	+	+
CBV 6	+	+	+	+

Στέλεχος	UG52-UC53	ENV2-1200R	AN89-AN88	CHR1-CHR2
Κλινικά Δείγματα CBV				
98/74/2	+	+	+	+
99/74/1	+	-	+	+
118/95/2	+	-	+	+
116/95/2	+	+	+	+
109/85/1	+	-	-	+
77/78/3	+	+	+	+
69/86/1	+	-	+	+
169/75/1	+	+	+	+
14/76/1	+	+	+	+
254/77/1	+	+	+	+
86/73/1	+	+	+	+
7/73/19	+	+	+	+

Η ευαισθησία των 4 αντιδράσεων PCR για τους Coxsackie A και B ιούς υπολογίστηκε μέσω σειριακών αραιώσεων από το πρότυπο δείγμα Coxsackie A9 και Coxsackie B6 αντίστοιχα, που υποβλήθηκαν στις 4 παραπάνω αντιδράσεις PCR. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1.2.

Πίνακας 4.1.2: Παρουσιάζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του ιού, εκφραζόμενη σε CCID₅₀/0.1ml, στην οποία παρουσιάστηκε το αναμενόμενο προϊόν.

	UG52-UC53	ENV2-1200R	AN89-AN88	CHR1-CHR2
Coxsackie B	10^{-1}	10^3	10	10^2
Coxsackie A	1	10^{-1}	10	10^3

4.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ MULTIPLEX-PCR

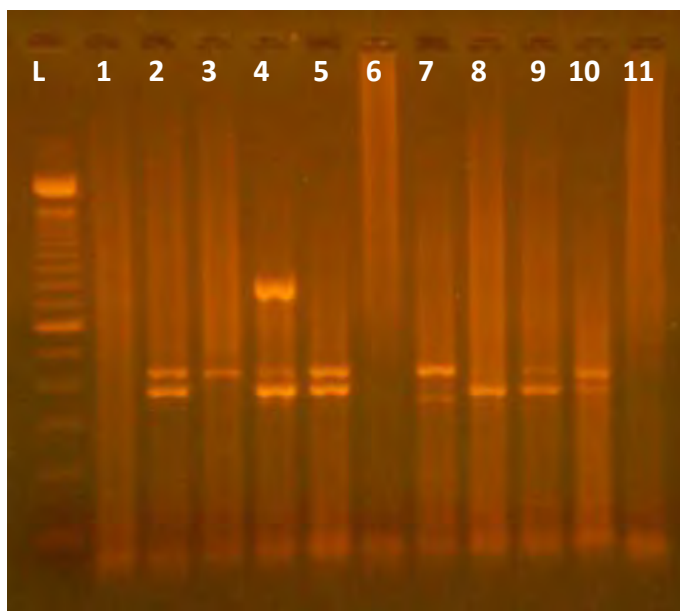
Σύμφωνα με την ενότητα 3.6 τους πίνακες 3.3.6.1 A και B εφαρμόστηκαν δύο Multiplex-PCR αντιδράσεις. Τα αποτελέσματα κάθε αντίδρασης όπως αυτά προέκυψαν έπειτα από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσιάζονται παρακάτω:

4.2.1 Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα

Coxsackie A

Στη Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα Coxsackie A, όλα τα δείγματα εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών UG52/UC53 (προϊόν 423bp), όλα τα δείγματα εκτός των CAV13 και CAV18 εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών AN89/AN88 (προϊόν 375bp) και μόνο το δείγμα CAV 9 εμφάνισε το προϊόν του ζεύγους εκκινητών CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp).

Πρότυπα Δείγματα CAV	UG52/UC53 (προϊόν 423bp)	AN89/AN88 (προϊόν 375bp)	CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp)
CAV 9	+	+	+
CAV 11	+	+	-
CAV 13	+	-	-
CAV 17	+	+	-
CAV 18	+	-	-
CAV 20	+	+	-
CAV 21	+	+	-
CAV 24	+	+	-

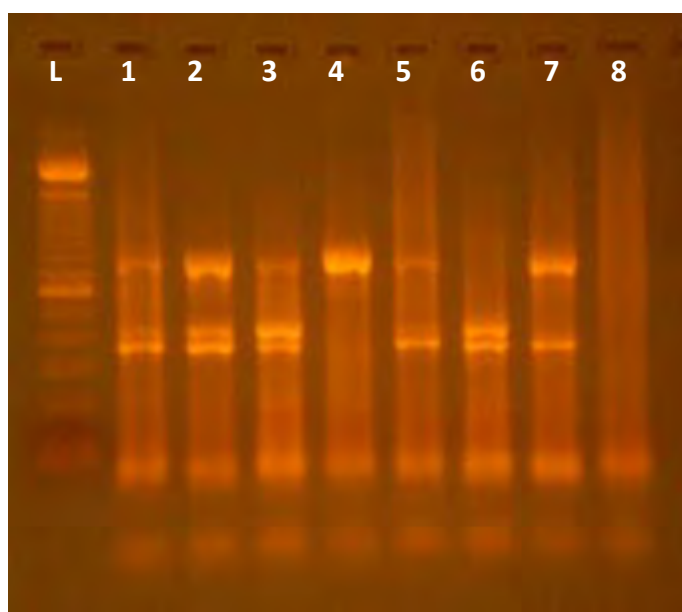


Θέση	Δείγμα
L	Ladder
1	ddH ₂ O
2	CAV 11
3	CAV 13
4	CAV 9
5	CAV 17
6	ddH ₂ O
7	CAV 18
8	CAV 20
9	CAV 21
10	CAV 24
11	ddH ₂ O

4.2.2. Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie A

Στη Multiplex PCR CAV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie A όλα τα δείγματα εκτός από το A9/He1 εμφάνισαν τον προϊόν του ζεύγους εκκινητών UG52/UC53(προϊόν 423bp) , όλα τα δείγματα εκτός από το A9/He1 εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών AN89/AN88 (προϊόν 375bp) και όλα τα δείγματα εκτός από το A9/He4 εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών CHR1/CHR2(προϊόν 800bp).

Κλινικά Δείγματα CAV	UG52/UC53 (προϊόν 423bp)	AN89/AN88 (προϊόν 375bp)	CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp)
65/89/1	+	+	+
113/73/2a	+	+	+
611/80/1	+	+	+
A9/He1	-	-	+
A9/He2	+	+	+
A9/He4	+	+	-
A9/He5	+	+	+



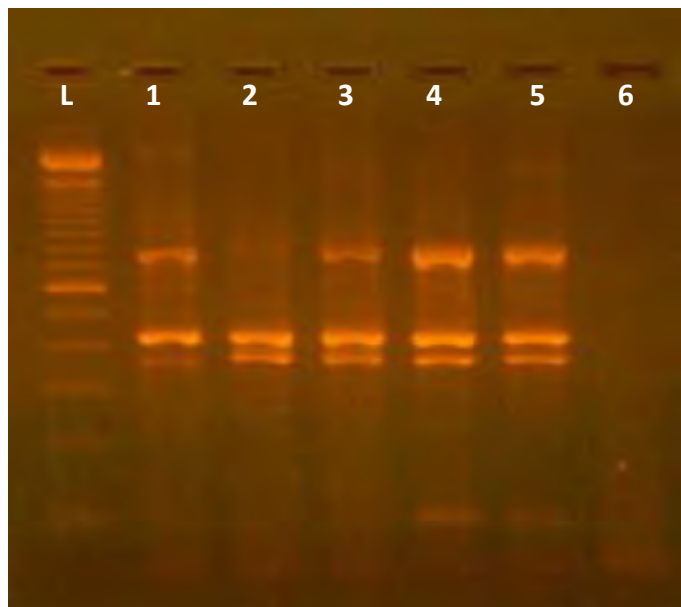
Θέση	Δείγμα
L	Ladder
1	65/89/1
2	113/73/2a
3	611/80/1
4	A9/He1
5	A9/He2
6	A9/He4
7	A9/He5
8	ddH ₂ O

4.2.3. Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα

Coxsackie B

Στη Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα πρότυπα δείγματα Coxsackie B όλα τα δείγματα εμφάνισαν και τα τρία προϊόντα των τριών ζευγών εκκινητών, UG52/UC53 (προϊόν 423bp), AN89/AN88 (προϊόν 375bp), CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp).

Πρότυπα Δείγματα CBV	UG52/UC53 (προϊόν 423bp)	AN89/AN88 (προϊόν 375bp)	CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp)
CBV 1	+	+	+
CBV 2	+	+	+
CBV 3	+	+	+
CBV 4	+	+	+
CBV 5	+	+	+
CBV 6	+	+	+

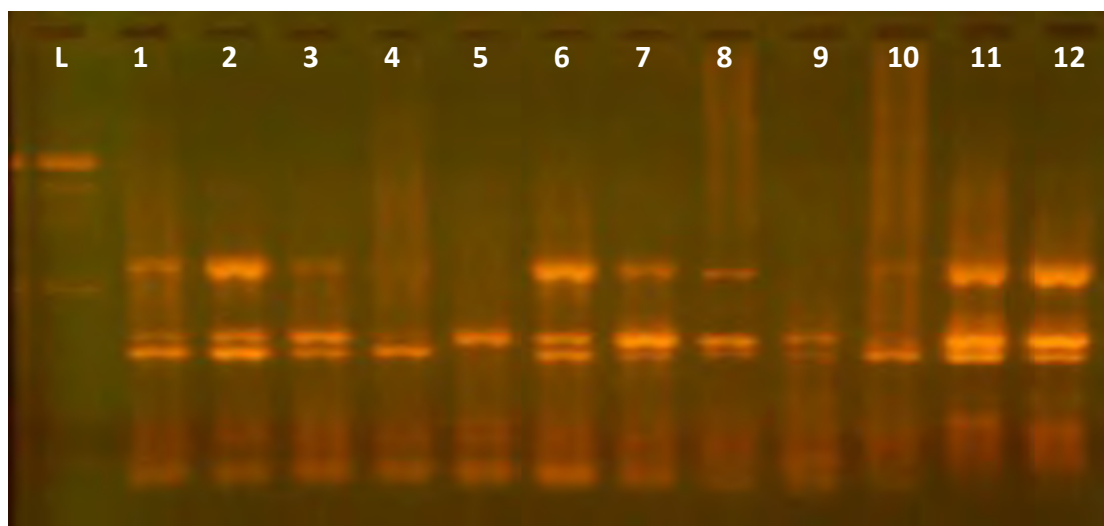


Θέση	Δείγμα
L	Ladder
1	CBV 1
2	CBV 2
3	CBV 3
4	CBV 4
5	CBV 5
6	ddH ₂ O

4.2.4. Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie B

Στη Multiplex PCR CBV που εφαρμόστηκε στα κλινικά δείγματα Coxsackie B όλα τα δείγματα εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών UG52/UC53 (προϊόν 423bp), όλα τα δείγματα εκτός από το 109/85/1 εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών AN89/AN88(προϊόν 375bp) και όλα τα δείγματα εκτός από το 116/95/2, το 109/85/1 και το 14/76/1 εμφάνισαν το προϊόν του ζεύγους εκκινητών CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp).

Θέση	Κλινικά Δείγματα CBV	UG52/UC53 (προϊόν 423bp)	AN89/AN88 (προϊόν 375bp)	CHR1/CHR2 (προϊόν 800bp)
1	98/74/2	+	+	+
2	99/74/1	+	+	+
3	118/95/2	+	+	+
4	116/95/2	+	+	-
5	109/85/1	+	-	-
6	77/78/3	+	+	+
7	69/86/1	+	+	+
8	169/75/1	+	+	+
9	14/76/1	+	+	-
10	254/77/1	+	+	+
11	86/73/1	+	+	+
12	7/73/19	+	+	+



Η ευαισθησία των 2 Multiplex αντιδράσεων PCR για τους Coxsackie A και B ιούς υπολογίστηκε μέσω σειριακών αραιώσεων από το πρότυπο δείγμα Coxsackie A9 και Coxsackie B6 αντίστοιχα, που υποβλήθηκαν στις 2 παραπάνω αντιδράσεις PCR. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Πίνακας 4.2.1: Παρουσιάζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του ιού, εκφραζόμενη σε $CCID_{50}/0.1ml$, στην οποία παρουσιάστηκε το αναμενόμενο προϊόν στις Multiplex RT-PCR αντιδράσεις.

	UG52-UC53	AN89-AN88	CHR1-CHR2
Coxsackie B	1	10	10^2
Coxsackie A	10^2	10	10^3

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Όπως περιεγράφηκε στη ενότητα 3.10 τα κλωνοποιημένα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGene Europe (Amsterdam, The Netherlands), έτσι ώστε να διαπιστωθεί η εξειδίκευση της τεχνικής. Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και με ομοπαράθεση μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες πρότυπων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST.

Όλες οι αλληλουχίες αντιστοιχούσαν στις αναμενόμενες γενομικές περιοχές τις οποίες ενισχύουν τα αντίστοιχα ζεύγη εκκινητών. Περαιτέρω μέσω της αλληλουχίας που αντιστοιχεί στο ενισχυμένο προϊόν από το εκκινητικό ζεύγος AN89/AN88 πραγματοποιήθηκε μια επαλήθευση του οροτύπου των δειγμάτων, ο οποίος είχε ταυτοποιηθεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου (Πίνακας 4.3.1)

Πίνακας 4.3.1 : Παρουσιάζονται τα κλινικά δείγματα τα οποία αλληλομήθηκαν, ο ορότυπός τους (από προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου) και τα αποτελέσματα που προέκυψαν μέσω του προγράμματος Blast:

Δείγμα	Ορότυπος	Αποτελέσματα Blast	Ομοιότητα	E-value
113/73/2a	CAV9	CAV9	97%	3e-147
7/73/19	CBV5	CBV5	95%	1e-165
77/78/3	CBV3	CBV3	98%	2e-149

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Coxsackie ιοί έχουν συσχετιστεί με μια ποικιλία ασθενειών του ανθρώπου που κυμαίνονται από συμπτώματα κοινού κρυολογήματος, ήπια γαστρεντερική δυσφορία έως και περικαρδίτιδα, μυοκαρδίτιδα, παγκρεατίτιδα και άσηπτη μηνιγγίτιδα. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων.

Οι Coxsackie A και B ιοί είναι σημαντικοί παράγοντες παθογένειας, ιδιαίτερα σε νήπια και έχουν εμφανιστεί σε πολλές επιδημίες. Παρόλο που η μόλυνση με Coxsackie ιούς είναι συνήθως ασυμπτωματική, είναι υπεύθυνοι για πολλά σημαντικά κλινικά συμπτώματα. Για το λόγο αυτό, υπάρχει ανάγκη για γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους.

Οι non-polio εντεροϊοί, όπως οι Coxsackie A και B ιοί, αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία είναι η πιο συχνή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις εντεροϊών. Τέτοιες επιδημίες άσηπτης μηνιγγίτιδας παρουσιάστηκαν σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας το 2001 [Siafakas N et al (2004)] και το 2007 [Logotheti M et al (2009)].

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησής τους. Επίσης λόγω του υψηλού ρυθμού εξέλιξής τους είναι ανάγκη να γνωρίζουμε πληροφορίες από διάφορα τμήματα του γονιδιώματός τους.

Για την ταυτοποίηση και τυποποίηση των εντεροϊών έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές όπως η οροεξουδετέρωση, η RFLP και η ενίσχυση συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος των εντεροϊών με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης(PCR). Σύγχρονες μοριακές τεχνικές, με βάση την PT-PCR, παίζουν, στις μέρες μας, ένα κρίσιμο ρόλο στην κοινή διάγνωση των λοιμώξεων των εντεροϊών και, επιπλέον, στην ταυτοποίηση και τυποποίηση των non-polio εντεροϊών. Μέσω της στόχευσης συγκεκριμένων περιοχών του γονιδιώματος των εντεροϊών, οι τεχνικές αυτές στοχεύουν σε μια ταχεία και ευαίσθητη ανίχνευση όλων των μελών του γένους των

εντεροϊών μέσω της ενίσχυσης της αλληλουχίας. Ειδικοί, γενικοί και συχνά εκφυλισμένοι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί για το σκοπό αυτό και οι αλληλουχίες στόχος έχουν βρεθεί μέσα σε αρκετές περιοχές του γονιδιώματος.[Bolanaki E et al (2005)].

Η 5'UTR γονιδιωματική περιοχή επιλέχθηκε για να μελετηθεί διότι, είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή μεταξύ των εντεροϊών επειδή παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση και στην αντιγραφή του θετικής πολικότητας κλώνου RNA των εντεροϊών. Έτσι με την ενίσχυση αυτής της γονιδιωματικής περιοχής μέσω του ζεύγους εκκινητών UG52/UC53 αυξάνονται οι πιθανότητες της καθολικής ανίχνευσης όλων εντεροϊών που κυκλοφορούν στον πληθυσμό. Η ενίσχυση της 5'UTR περιοχής δεν μπορεί από μόνη της να καθορίσει τις οροτυπικές διαφορές μεταξύ των εντεροϊών [Siafakas N et al (2004)].

Το δεύτερο ζεύγος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι το εκφυλισμένο ζεύγος AN89/AN88 το οποίο ενισχύει την VP1 κωδική περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την κωδικοποίηση της VP1 πρωτεΐνης του καψιδίου των εντεροϊών. Η περιοχή αυτή υπόκειται σε εξελικτική πίεση, αφού η πρωτεΐνη VP1 βρίσκεται στο εξωτερικό του καψιδίου και φέρει τα κύρια αντιγονικά σημεία του ιού και για αυτό το λόγο εμφανίζει υψηλό ρυθμό μεταλλάξεων. Η περιοχή αυτή χαρακτηρίζει τον ορότυπο των εντεροϊών και θεωρείται η καταλληλότερη για την μοριακή ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων των εντεροϊών [Oberste et al (2004)].

Η ταυτόχρονη ενίσχυση και της 5'UTR περιοχής και της VP1 περιοχής του γονιδιώματος των Coxsackie ιών μέσω των Multiplex PCRs που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία προσφέρει επιπλέον την ταχύτατη φυλογενετική και οροτυπική ανάλυση των υπό ερεύνηση εντεροϊών, μέσω της αλληλούχησης των προϊόντων ενίσχυσης των ζευγών εκκινητών UG52/UC53 και AN89/AN88.

Το τελευταίο ζεύγος εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκε στις Multiplex PCRs που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία είναι το ζεύγος εκκινητών CHR1/CHR2. Το ζεύγος εκκινητών CHR1/CHR2, ενισχύει ένα τμήμα που περιλαμβάνει την 2C περιοχή. Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία των HEVB και όχι των HEVC εντεροϊών. Έτσι η αδυναμία του ζεύγους εκκινητών CHR1/CHR2 να ενισχύσει την 2C περιοχή των polio και κάποιων non-polio εντεροϊών προσφέρει στον ερευνητή ,στο στάδιο της ηλεκτροφόρησης, μία πρώτη αντίληψη του πιθανού οροτύπου του υπο μελέτη εντεροϊού [Kottaridi C et al (2007)].

Η ταυτόχρονη ενίσχυση των γονιδιωματικών περιοχών 5'UTR, VP1 και 2C μέσω των RT-Multiplex PCRs που σχεδιάστηκαν σε αυτή την εργασία προσφέρει αρχικά μία ταχύτατη ανίχνευση Coxsackie A και B ιών, λειτουργώντας έτσι ως μία πολύ γρήγορη διαγνωστική μέθοδος ή ως μέθοδος ανίχνευσης Coxsackie A και B ιών σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα. Επίσης μέσω της παρουσίας ή της απουσίας του προϊόντος ενίσχυσης του ζεύγους εκκινητών CHR1/CHR2 προσφέρεται μία πρώτη αντίληψη του πιθανού οροτύπου του υπό μελέτη ιού, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Μέσω της αλληλούχησης ή περαιτέρω επεξεργασίας (RFLP) του προϊόντος του ζεύγους εκκινητών UG52/UC53 προσφέρεται η δυνατότητα ομαδοποίησης σε clusters ενώ μέσω της αλληλούχησης του προϊόντος του ζεύγους εκκινητών AN89/AN88 επιτυγχάνεται η οροτυπική ανάλυση των υπό μελέτη εντεροϊών. Τέλος μέσω της ταυτόχρονης ενίσχυσης συνολικού μήκους ιικού γονιδιώματος περίπου 1500 bp, προσφέρεται με μόνο μία αντίδραση PCR ένα μεγάλο τμήμα του ιικού γονιδιώματος το οποίο μπορεί εν συνεχεία να αλληλουχηθεί.

Η ευαισθησία της Multiplex PCR αντίδρασης για τους Coxsackie B ιούς ήταν ικανοποιητική αφού επέτρεπε την ανίχνευση Coxsackie B ιών σε κλινικά δείγματα με συγκέντρωση ίση με 10^2 CCID₅₀/0.1ml. Η ευαισθησία της Multiplex PCR αντίδρασης για τους Coxsackie A ιούς επέτρεπε την ανίχνευση Coxsackie A ιών σε κλινικά δείγματα με συγκέντρωση ίση με 10^3 CCID₅₀/0.1ml. Οι τιμές ιικού τίτλου αντιστοιχούν στην μικρότερη συγκέντρωση όπου ενισχύονται και οι τρεις περιοχές. Παρατηρείται μία μείωση της ευαισθησίας της Multiplex RT PCR σε σχέση με τις απλές PCR, κάτι που είναι αναμενόμενο καθώς ο ανταγωνισμός μεταξύ των τριών ζευγών εκκινητών επιδρά αρνητικά στην ευαισθησία της μεθόδου.

Επειδή στα κλινικά δείγματα και στο περιβάλλον ο ιικός τίτλος των Coxsackie A και B ιών είναι μικρός, μελλοντικά θα μπορούσε να σχεδιαστεί μια real-time Multiplex PCR χρησιμοποιώντας νέα εκκινητικά μόρια που θα στοχεύουν στις ίδιες γονιδιωματικές περιοχές των CAV και CBV όπως στην εργασία μας. Στόχος μίας τέτοιας real-time Multiplex PCR θα είναι η αύξηση της ευαισθησίας, λειτουργώντας έτσι ως ισχυρότερη διαγνωστική μέθοδος.

6 BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 **Adams, M.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2013). *Archives of Virology* 158: 2023–2030.
- 2 **Ambros V, Baltimore D.** Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem* 1980; 255:6739–6744.
- 3 **Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D.** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirus RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 1978;15:1439–1446.
- 4 **Bienz K, Egger D, Pasamontes L.** Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 1987;160:220–226.
- 5 **Bodian D.** Some emerging concepts of poliomyelitis infection. *Science* 1955;122:105–108.
- 6 **Bolanaki E, Kottaridi C, Markoulatos P, Margaritis L, Katsorchis T.** A comparative amplification of five different genomic regions on Cocksackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. *Molecular and Cellular Probes* 19 (2005) 127–135
- 7 **Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al.** Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999;73:9969–9975.
- 8 **Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al.** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
- 9 **Carson SD** Receptor for the group B coxsackieviruses and adenoviruses: CAR. *Rev Med Virol.* 2001 Jul-Aug;11(4):219-26.
- 10 **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
- 11 **Caspar DL, Klug A.** Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1–22.
- 12 **Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, et al.** Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* 1989;245:154–159
- 13 **Cho MW, Teterina N, Egger D, et al.** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 1994;202:129–145.
- 14 **Chow M, Newman JF, Filman D, et al.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 1987;327:482–486.
- 15 **Colston E, Racaniello VR.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* 1994;13:5855–5862.
- 16 **Colston EM, Racaniello VR.** Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* 1995;69:4823–4829.
- 17 **Dales S, Eggers HJ, Tamm I, et al.** Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* 1965;26:379–389.
- 18 **Drebot MA, Campbell JJ, Lee SH.** A genotypic characterization of enteroviral antigenic variants isolated in eastern Canada. *Virus Res* 1999;59:131–140.
- 19 **Echeverri AC, Dasgupta A.** Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.
- 20 **Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al.** Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 2000;74:6570–6580.
- 21 **Filman DJ, Syed R, Chow M, et al.** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* 1989;8:1567–1579.

- 22 **Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, et al.** Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:961–965.
- 23 **Fricks CE, Hogle JM.** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* **1990**;64:1934–1945.
- 24 **G.Palacios and MS Oberste.** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases(2005). *Journal of neurovirology* **11**:424-433
- 25 **Gamarnik AV, Andino R.** Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* **1998**;12:2293–2304.
- 26 **Giachetti C, Semler BL.** Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis . *J Virol***1991**;65(7):3972 and **1991**;65(10):5653. *J Virol***1991**;65:2647-2654.
- 27 **Greber UF.** Signaling in viral entry. *Cell Mol Life Sci***2002**; 59(4):608-626
- 28 **Guskey LE, Smith PC, Wolff DA.** Patterns of cytopathology and lysosomal enzyme release in poliovirus- infected HEp-2 cells treated with either 2-(alpha-hydroxybenzyl)-benzimidazole or guanidine HCl. *J Gen Virol***1970**;6:151-161.
- 29 **Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al.** Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* **1995**;214:559–570.
- 30 **Hunter, P.R. (1998)** Waterborne Disease. Epidemiology and Ecology. John Wiley and Son Ltd, Chichester, UK.
- 31 **Ida-Hosonuma M, Sasaki Y, Toyoda H, et al.** Host range of poliovirus is restricted to simians because of a rapid sequence change of the poliovirus receptor gene during evolution. *Arch Virol* **2003**;148:29–44.
- 32 **Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P.** Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol* **1993**;67:2961–2971.
- 33 **Kew O, De L, Yang C-F, et al.** The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res***1993**;215-246.
- 34 **Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al.** Molecular epidemiology of polioviruses. *In: Kew OM, Nathanson N, eds. Molecular Epidemiology. Seminars in Virology, Vol 6. New York: Academic Press; 1995:401-414.*
- 35 **Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature***1981**;291:547–553.
- 36 **Knipe D. M., and Howley P. M. (2007)** Fields Virology, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
- 37 **Knowles, N.J., Hovi, T, Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. Picornaviridae.** In Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (2012) Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: (2012) Elsevier, pp 855-880.
- 38 **Koike S, Ise I, Nomoto A.** Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A***1991**;88:4104-4108
- 39 **Kopecka H, Brown B, Pallansch M.** Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res***1995**;38:125-136.
- 40 **Kottaridi C, Bolanaki E, Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pratti A, Markoulatos P.** Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **2007 Aug**;58(4):407-12
- 41 **Kottaridi C, Eugenia Bolanaki, Nikolaos Siafakas, Panayotis Markoulatos.** Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **53 (2005) 113 – 119**
- 42 **Kyriakopoulou Z, E.Dedepsidis, V.Pliaka, D.Tsakogiannis, I.G.A Ruether,**

- A.Krikelis and P.Markoulatos.** Complete nucleotide sequence analysis of the VP1 genomic region of Echoviruses 6 isolated from sewage in Greece revealed 98% similarity with Echoviruses 6 that were characterized from an aseptic meningitis outbreak 1 year later. *Clin Microbiol Infect* **2011**; *17*: 1170–1173
- 43 Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al.** A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:59–63.
- 44 Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, et al.** Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* **1997**;5:961–978.
- 45 Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* **1997**;71:9770–9777.
- 46 Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al.** Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* **1995**;76:1687β€“1699.
- 47 Logotheti M, Vasiliki Pogka, Elina Horefti et al.** Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis outbreak in Greece during the summer of 2007. *Journal of Clinical Virology* **46 (2009)** 270–274
- 48 Melnick JL.** Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; **1996**:655–712.
- 49 Melnick J. L. (1990)** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology, Second Edition (ed. Fields B. N.):* 549 – 605.
- 50 Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR.** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **1989**;56:855–865.
- 51 Minor D. P. 1999.** Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- 52 Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**;77:5136–5144.
- 53 Morrison ME, Racaniello VR.** Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene. *J Virol* **1992**;66:2807–2813
- 54 Moscufo N, Yafal AG, Rogove A, et al.** A mutation in VP4 defines a new step in the late stages of cell entry by poliovirus. *J Virol* **1993**;67:5075–5078.
- 55 Mueller S, Wimmer E, Cello J.** Poliovirus and poliomyelitis: A tale of guts, brains, and an accidental event. *Virus Research* **2005**; 111(issue 2): 175–193
- 56 Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, et al.** Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* **1995**;171:1399–1405.
- 57 Murray KE, Barton DJ.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**;77:4739–4750.
- 58 Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al.** The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* **1977**;268:208–213.
- 59 Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al.** The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**;74:5345–5349.
- 60 Novak JE, Kirkegaard K.** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J Virol* **1991**;65:3384–3387
- 61 Oberste MS, Maher K, Kennett ML, et al.** Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3928–3933
- 62 Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A. (2004)** Evidence for frequent

- recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* 78:855-67.
- 63 **Pelkmans L, BOrli T, Zerial M, et al.** Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 2004;118(6):767-780.
 - 64 **Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D.** Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357-365.
 - 65 **Pettersson RF, Flanagan JB, Rose JK, et al.** 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* 1977;268:270-272.
 - 66 **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer.** Molecular Biology of poliovirus. *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.* 1999
 - 67 **Racaniello VR, Baltimore D.** Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4887-4891.
 - 68 **Racaniello V.** Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830.
 - 69 **Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al.** Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160:311-322.
 - 70 **Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al.** Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000;74:10371-10380.
 - 71 **Rossmann MG.** The canyon hypothesis. Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J Biol Chem* 1989;264:14587-14590.
 - 72 **Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM.** The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:912-919.
 - 73 **Schlegel A, Giddings Jr TH, Ladinsky MS, et al.** Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 1996;70:6576-6588.
 - 74 **Siafakas N, Panayotis Markoulatos, Stamatina Levidiotou-Stefanou.** Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Molecular and Cellular Probes* 18 (2004) 389-398
 - 75 **Spector DH, Baltimore D.** Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;71:2983-2987.
 - 76 **Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966-971.
 - 77 **Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, et al.** Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 2005;170(5):769-779
 - 78 **Todd S, Towner JS, Brown DM, et al.** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol* 1997;71:8868-8874.
 - 79 **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.
 - 80 **Wickman I.** Beitrage zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitis acuta und verwandter Erkernkungen). Berlin: Karger; 1907
 - 81 **Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101-1109.
 - 82 **Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1972;69:1877-1882.
 - 83 **Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, et al.** Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis* 1993;168:1361-1367.