

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ

ΣΟΦΟΥ ΠΟΛΥΞΕΝΗ

<<Χρήση κυτταροκαλλιέργειας και αντίστροφης μεταγραφής Real Time PCR
για τον εντοπισμό εντεροϊών οι οποίοι προκαλούν ή δεν προκαλούν
κυτταρικές αλλοιώσεις σε Rd κύτταρα>>

2018

<<Χρήση κυτταροκαλλιέργειας και αντίστροφης μεταγραφής Real Time PCR για τον εντοπισμό εντεροϊών οι οποίοι προκαλούν ή δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε Rd κύτταρα>>

<<A combined cell culture and reverse transcription Real Time PCR for the detection of enteroviruses that cause or not cause a cytopathic effect on Rd cells>>

Τριμελής Επιτροπή

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ) :

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ :

Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ :

Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας Picornaviridae. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μια πολυ(A)-ουρά. Τα μέλη του γένους αυτού δε διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και το RNA γονιδίωμα τους περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής δομής, το οποίο αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών τεσσάρων πρωτεϊνών.

Οι λοιμώξεις των εντεροϊών είναι πολύ συχνές και οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές, όμως μπορούν να γίνουν σοβαρές και επικίνδυνες για τη ζωή, καθώς προκαλούν ένα μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, τρία στελέχη εντεροϊών, τα στελέχη Sabin 1, Echo 12 και Coxsackie A 13, ανιχνεύτηκαν με τη χρήση καλλιέργειας σε κύτταρα Rd και στη συνέχεια με τη χρήση της μεθόδου RT Real Time PCR.

Αρχικά, τα τρία στελέχη ιών ενοφθαλμίστηκαν στην κυτταρική σειρά Rd και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική εξέταση των κυττάρων για εμφάνιση CPE. Ακολούθως, το RNA των τριών στελεχών εκχυλίστηκε και μετατράπηκε σε cDNA με τη μέθοδο της Reverse Transcription (RT). Τέλος, πραγματοποιήθηκε Real Time PCR για τον εντοπισμό των τριών ιικών στελεχών. Τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων απέδειξαν τη μεγαλύτερη ταχύτητα και ακρίβεια εντοπισμού των 3 ιικών στελεχών με τη χρήση της μεθόδου RT Real Time PCR, σε σύγκριση με τη χρήση μόνο της κυτταροκαλλιέργειας.

ABSTRACT

Human enteroviruses belong to the Enterovirus genus of Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-strand RNA molecule, 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 lack a lipid envelope and their RNA genome is surrounded by a protein shell of icosahedral structure, which is made up of 60 copies of pentameric intermediates of 4 proteins.

Enterovirus infections are very common and are often asymptomatic, but they can be very serious and life-threatening, as they cause a broad spectrum of clinical symptoms.

In this thesis, three enterovirus strains, Sabin 1, Echo 12 and Coxsackie A 13 were detected by a combined use of cell culture and RT Real Time PCR method.

Initially, the three enterovirus strains were inoculated in Rd cells and were examined microscopically for the detection of cytopathic effect (CPE). Subsequently, the RNA of the three viral strains was extracted and converted to cDNA by the use of Reverse Transcription (RT). Finally, Real Time PCR was performed for the quantitation and detection of the three viral strains. The produced results by the two methods proved the higher speed and precision of detection of the three viruses by Real Time PCR assay, when this was compared with the appearance of characteristic CPE in Rd cells.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, στο εργαστήριο Μικροβιολογίας– Ιολογίας, από τον Ιούλιο του 2017 έως τον Ιανουάριο του 2018.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας και την πολύτιμη βοήθεια κατά τη διεξαγωγή της.

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

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Δάσκου για τη βοήθεια και την καθοδήγηση της κατά τη διάρκεια της εργασίας μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, τους γονείς μου Δημήτρη και Βασιλική και τους αδερφούς μου Γρηγόρη και Θανάση, για την ενθάρρυνση και την πνευματική τους υποστήριξη κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	Ταξινόμηση των Εντεροϊών	1
1.2	Βιολογία των εντεροϊών	4
1.2.1	Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων	4
1.2.2	Οργάνωση του γονιδιώματος	7
1.3	Κύκλος ζωής των εντεροϊών	11
1.3.1	Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος στο κύτταρο	12
1.3.2	Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης	17
1.3.3	Αντιγραφή του ιικού RNA	21
1.3.4	Καψιδίωση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων	27
1.4	Παθογένεια	30
1.5	Επιδημιολογία	32
2	ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	37
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	38
3.1	Στελέχη Εντεροϊών	38
3.2	Καλλιέργεια Εντεροϊών	38
3.3	Εκχύλιση του RNA	40

3.4	Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)	41
3.5	Real Time PCR	42
3.6	Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR	43
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	45
4.1	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Sabin 1 10 ⁶	48
4.2	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Sabin 1 [1]	50
4.3	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Echo 12 10 ⁶	52
4.4	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Echo 12 [1]	53
4.5	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Coxsackie A 13 10 ⁶	56
4.6	Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Coxsackie A 13 [1]	58
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	60
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ταξινόμηση των Εντεροϊών

Η οικογένεια Picornaviridae αποτελείται από ιούς χωρίς λιπιδικό έλυτρο, οι οποίοι διαθέτουν μονόκλωνο RNA γονιδίωμα θετικής πολικότητας. Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών είχε σκοπό να αποδώσει το μικρό μέγεθος των ιών (pico) και το είδος του νουκλεϊκού οξέος το οποίο αποτελεί το ιικό γονιδίωμα (RNA).

Η οικογένεια Picornaviridae ανήκει στην τάξη Picornavirales και αποτελείται από 80 είδη τα οποία ταξινομούνται στα εξής 35 γένη: Ampivirus, Arthovirus, Aquamavirus, Avihepatovirus, Avisivirus, Cardiovirus, Cosavirus, Dicipivirus, Enterovirus, Erbovirus, Gallivirus, Harkavirus, Hepatovirus, Hunnivirus, Kobuvirus, Kunsagivirus, Limnipivirus, Megrivirus, Mischivirus, Mosavirus, Oscivirus, Parechovirus, Pasivirus, Passerivirus, Potamipivirus, Rabovirus, Rosavirus, Sakobuvirus, Salivirus, Sapelovirus, Senecavirus, Sicinivirus, Teschovirus, Torchivirus, Tremovirus [Zell et al (2017), Knowles et al (2012), Adams et al (2013, 2014, 2015, 2016)].

Στο γένος των Εντεροϊών (Enterovirus) ανήκουν 13 είδη: Enterovirus A (25 ορότυποι), Enterovirus B (63 ορότυποι), Enterovirus C (23 ορότυποι), Enterovirus D (5 ορότυποι), Enterovirus E (5 ορότυποι), Enterovirus F (7 ορότυποι), Enterovirus G (20 ορότυποι), Enterovirus H (1 ορότυπος), Enterovirus I (1 ορότυπος), Enterovirus J (6 ορότυποι), Rhinovirus A (80 ορότυποι), Rhinovirus B (32 ορότυποι), Rhinovirus C (55 ορότυποι). Τα είδη των εντεροϊών, καθώς και οι νέες και παλαιές ονομασίες τους αναφέρονται στον Πίνακα 1.1 [Oberste et al (1999), Palmenberg et al (2009), Simmonds et

al (2010), McIntyre et al (2013)]. Μέλη αυτού του γένους περιλαμβάνουν τους πολιοϊούς (3 ορότυποι), τους ιούς Coxsackie (25 ορότυποι), τους ιούς Echo (28 ορότυποι), τους ανθρώπινους εντεροϊούς (43 ορότυποι) και πολλούς μη ανθρώπινους εντερικούς ιούς.

Πίνακας 1.1 : Νέα και παλαιά ταξινόμηση των εντεροϊών

Νέα ονομασία των ειδών	Παλαιά ονομασία των ειδών
Enterovirus A	Human enterovirus A
Enterovirus B	Human enterovirus B
Enterovirus C	Human enterovirus C
Enterovirus D	Human enterovirus D
Enterovirus E	Bovine enterovirus (group A)
Enterovirus F	Bovine enterovirus (group B)
Enterovirus G	Porcine enterovirus B
Enterovirus H	Simian enterovirus A
Enterovirus I	-
Enterovirus J	Unclassified simian viruses
Rhinovirus A	Human rhinovirus A
Rhinovirus B	Human rhinovirus B
Rhinovirus C	Human rhinovirus C

Οι picorna ιοί είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Παρά το μικρό γενετικό υλικό και τους δομικούς περιορισμούς, η εξέλιξη στους ιούς picorna είχε ως αποτέλεσμα ένα μεγάλο αριθμό εύκολα διακριτών μελών. Αυτή η ποικιλομορφία έχει χαρακτηριστεί αντιγονικά ως ορότυπος.

Καθένας από τους ορότυπους συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπινου ξενιστή, την προστασία από τη νόσο, τη χρήση υποδοχέων και, σε μικρότερο βαθμό, το φάσμα της κλινικής νόσου. Αυτοί οι συσχετισμοί, ωστόσο, έχουν μόνο μερικώς σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, coxsackie A και B ιούς, και Echo ιούς, με βάση τη βιολογική δραστηριότητα και τη νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή

παράλυση (πολιομυελίτιδα), χαλαρή παράλυση σε νεογέννητα ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ, και στοματικές φλύκταινες (coxsackie A ιοί) και σπαστική παράλυση σε νεογέννητα ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και καρδιακή νόσος (coxsackie B ιοί). Σε καθεμία από αυτές τις ομάδες, οι απομονωμένοι ιοί μπορούν εύκολα να διακριθούν στη βάση της αντιγονικότητας τους, η οποία αναγνωρίζεται από ειδικό αντί-ορό ανεπτυγμένο σε ζώα. Η αναγνώριση ιών ορολογικά ταυτόσημων με γνωστούς Echo ιούς, οι οποίοι βρέθηκαν να προκαλούν νόσο σε ποντίκια και ανθρώπους, καθώς και άλλες ασυνέπειες, οδήγησαν στην αρίθμηση νέων οροτύπων εντεροϊών, ξεκινώντας από τον EV68. Αυτές οι ομαδοποιήσεις, οι οποίες καθορίζουν τον ορότυπο, άρχισαν να γίνονται όλο και πιο περίπλοκες όσο ο αριθμός των διαφορετικών ιών αυξανόταν. Παρά αυτούς τους περιορισμούς, ο ορότυπος παραμένει η πιο σημαντική φυσική και ανοσολογική ιδιότητα η οποία ξεχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς.

Παρά τη σημασία των αντιγονικών ιδιοτήτων, η εισαγωγή των μοριακών μεθόδων και η επαναξιολόγηση του παλαιού συστήματος ταξινόμησης οδήγησε στην ανάπτυξη του σύγχρονου συστήματος ταξινόμησης, το οποίο διαχωρίζει τα μέλη του γένους των εντεροϊών σε είδη με βάση την οργάνωση του γονιδιώματος, την ομοιότητα της αλληλουχίας, καθώς και τις βιολογικές ιδιότητες.

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί πλέον ταξινομούνται σε τέσσερα είδη: Εντεροϊός A (EV-A), EV-B, EV-C και EV-D.

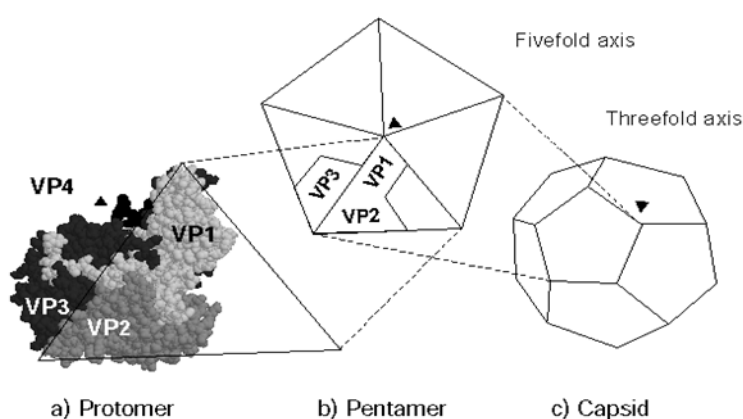
1.2 Βιολογία των εντεροϊών

1.2.1 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Τα σωματίδια των ρικορνα ιών είναι σφαιρικά, με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA γονιδίωμα. Τα ιικά σωματίδια δε διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητα τους δεν επηρεάζεται από οργανικούς διαλύτες. Οι διαφορές σταθερότητας σε διάφορες τιμές PH μεταξύ των διαφόρων ιών επηρεάζουν την περιοχή αντιγραφής του ιού.

Τα καψίδια των ρικορνα ιών συντίθενται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Τα αποτελέσματα μελετών διάθλασης ακτίνων X, παρατήρησης με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο και βιοχημικών μελετών των ιικών σωματιδίων, οδήγησαν στην υπόθεση ότι το καψίδιο των ρικορνα ιών περιέχει 60 δομικές πρωτεΐνες, οργανωμένες σε μία εικοσαεδρική δομή [Rueckert RR (1969)]. Η βασική δομική μονάδα του καψιδίου των ρικορνα ιών είναι το πρωτομερές, το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο καθενός από τις VP1, VP2, VP3 και VP4. Το καψίδιο σχηματίζεται από τις VP1 έως VP3, ενώ η VP4 βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στην Εικόνα 1-1. Οι VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν ομολογία αλληλουχίας, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β-βαρελίου. Αυτή η περιοχή είναι μία γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δυο αντιπαράλληλα β-φύλλα. Το ένα β-φύλλο σχηματίζει τον τοίχο της γωνίας, και το δεύτερο, το οποίο έχει μια κλίση στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον τοίχο όσο και τη βάση της γωνίας. Το γωνιακό σχήμα διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων ώστε να σχηματίσουν ένα πυκνό, άκαμπτο πρωτεϊνικό καψίδιο. Το πακετάρισμα

των περιοχών των β-βαρελιών ενισχύεται από ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, κυρίως γύρω από τον πενταπλό άξονα. Αυτό το δίκτυο, το οποίο συγκροτείται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1 έως VP3, καθώς και της VP4, είναι απαραίτητο για τη σταθερότητα του ιικού σωματιδίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες διότι έχει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Αυτή η πρωτεΐνη είναι παρόμοια σε θέση και διαμόρφωση στις NH₂-τελικές αλληλουχίες της VP1 και VP3 και δρα ως μία απομονωμένη NH₂-τελική επέκταση της VP2 παρά ως μία ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου. Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στους βρόγχους οι οποίοι συνδέουν τα β-φύλλα και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που επεκτείνονται από την περιοχή του β-βαρελιού. Αυτές οι αλληλουχίες αμινοξέων δίνουν σε κάθε ριζομαχία τη διακριτή του μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου και τα N-τελικά άκρα βρίσκονται στο εσωτερικό, υποδεικνύοντας ότι κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό συμβαίνει σημαντική αναδιαμόρφωση της πρόδρομης P1.



Εικόνα 1-1 : Δομική οργάνωση ενός εντεροϊού. α)Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από τις καψιδικές πρωτεΐνες VP1 έως VP4. Η επιφάνεια του ιού σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3, ενώ η VP4 βρίσκεται εσωτερικά. β)5 πρωτομερή συναρμολογούνται σε ένα πενταμερές. Διακρίνεται ο πενταμερής άξονας συμμετρίας γ)Ένα εικοσαεδρικό καψίδιο σχηματίζεται από 12 πενταμερή [Airaksinen A. (2000), Rueckert RR (1996)].

Ανάλυση της δομής πολιοϊών και ανθρώπινων ρινοϊών αποκάλυψε ότι οι επιφάνειες αυτών των ιών έχουν μία αυλακωτή τοπογραφία. Ένα προεξέχον οροπέδιο βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενο από μία αυλάκωση και ακόμα μία προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Αρχικά προτάθηκε ότι η αυλάκωση αυτή είναι η θέση πρόσδεσης του υποδοχέα και η υπόθεση αυτή έχει αποδειχθεί για ένα αριθμό εντεροϊών.

Ένα δίκτυο το οποίο σχηματίζεται από τα N-τελικά άκρα στο εσωτερικό του καψιδίου συνεισφέρει σημαντικά στη σταθερότητα του ιικού σωματιδίου. Στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων VP3 σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β-φύλλο. Αυτή η δομή περιβάλλεται από πέντε τριπλά β-φύλλα, τα οποία σχηματίζονται από τα N-τελικά άκρα των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος, η οποία είναι συνδεδεμένη στο N-τελικό άκρο της VP4, διαμεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο δομών [Chow M et al (1987)]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται μέσω ενός επταπλού β-φύλλου, το οποίο αποτελείται από τέσσερα β-φύλλα του VP3 βαρελιού και ενός φύλλου από το N-τελικό άκρο της VP1, που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β-φύλλου του N-τελικού άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [Filman DJ et al (1989)]. Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των ρινοϊών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το RNA γονιδίωμα, με βάση ευρήματα με τον ιό bean rod, ο οποίος σχετίζεται με τους ρινοϊούς [Chen ZG et al (1989)]. Στην ατομική δομή του πολιοϊού P2, έχουν παρατηρηθεί RNA βάσεις να αλληλεπιδρούν με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [Lentz KN et al (1997)]. Η αλληλεπίδραση αυτή

μπορεί να χρησιμεύει στην συναρμολόγηση του καψιδίου ή να συνεισφέρει πιθανόν στη σταθερότητα του ιικού σωματιδίου.

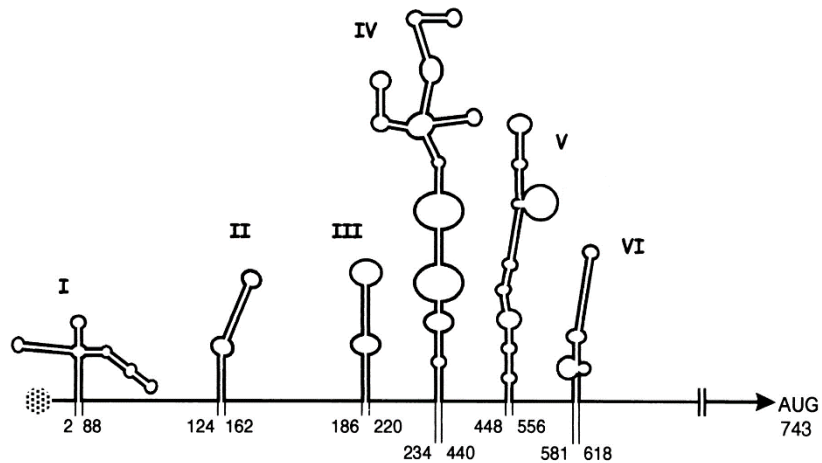
Ο ιικός ορότυπος καθορίζεται από τους συνδεδεμένους βρόγχους και τα C-τελικά άκρα των πρωτεϊνών του καψιδίου, τα οποία διακοσμούν την εξωτερική επιφάνεια του ιικού σωματιδίου. Αυτές περιέχουν τις κύριες αντιγονικές περιοχές εξουδετέρωσης του ιού, τις αλληλουχίες αμινοξέων που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα που εμποδίζουν την ιική μολυσματικότητα. Αυτές οι περιοχές περιορίζονται από μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα στην εξουδετέρωση με μονοκλωνικά αντισώματα τα οποία στοχεύουν εναντίον του ιικού καψιδίου [Minor PD et al (1983), Minor PD et al (1986), Sherry B et al (1986)].

1.2.2 Οργάνωση του γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA μόριο. Το ιικό RNA είναι μολυσματικό διότι μεταφράζεται κατά την είσοδο στο κύτταρο ώστε να παράγει όλες τις ιικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του ιού. Το γονιδιακό RNA των picorna ιών είναι μοναδικό, καθώς είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (virion protein, genome linked) [Flanagan JB et al (1977), Lee YF et al (1977)]. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O₄-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. Η VPg στους διάφορους picorna ιούς ποικίλει σε μήκος από 22 έως 24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιικό γονίδιο. Η VPg δεν απαιτείται για τη μολυσματικότητα του RNA του πολιοϊού, καθώς εάν αφαιρεθεί από το ιικό RNA μέσω κατεργασίας με πρωτεϊνάση, η εξειδικευμένη μολυσματικότητα του ιικού RNA δε μειώνεται. Η VPg δε

συναντάται στο ιικό mRNA το οποίο σχετίζεται με τα κυτταρικά ριβοσώματα και υφίσταται μετάφραση. Αυτό το mRNA περιέχει μόνο ουριδινό-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα του. Το mRNA του πολιοϊού διαφέρει από το ιικό RNA μόνο λόγω της έλλειψης της VPg [Nomoto A et al (1977), Petterson RF et al (1977)]. Η VPg απομακρύνεται από το ιικό RNA μέσω μιας πρωτεΐνης του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού [Ambros V et al (1978)]. Δεν είναι γνωστό εάν η απομάκρυνση της VPg είναι προαπαιτούμενο για τη σύνδεση με τα ριβοσώματα ή είναι συνέπεια της σύνδεσης αυτής. Η VPg είναι παρούσα στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στο RNA αρνητικής πολικότητας, γεγονός το οποίο έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η VPg είναι εκκινήτης για τη σύνθεση του RNA του πολιοϊού [Nomoto A et al (1977), Petterson RF et al (1978)].

Το γονιδίωμα ποικίλλει σε μήκος από 7 έως 8.8 kb. Οι 5' μη κωδικοποιούσες περιοχές των ριζογοναίων είναι μακριές και υψηλά δομημένες. Αυτή η περιοχή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες οι οποίες ελέγχουν την αντιγραφή και μετάφραση του γονιδιώματος. Η 5' μη κωδικοποιούσα περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site), η οποία κατευθύνει τη μετάφραση του mRNA μέσω εσωτερικής σύνδεσης στα ριβοσώματα [Racaniello V (2007)]. Η δομή της 5' μη κωδικοποιούσας περιοχής του πολιοϊού αναπαρίστανται στην Εικόνα 1-2.



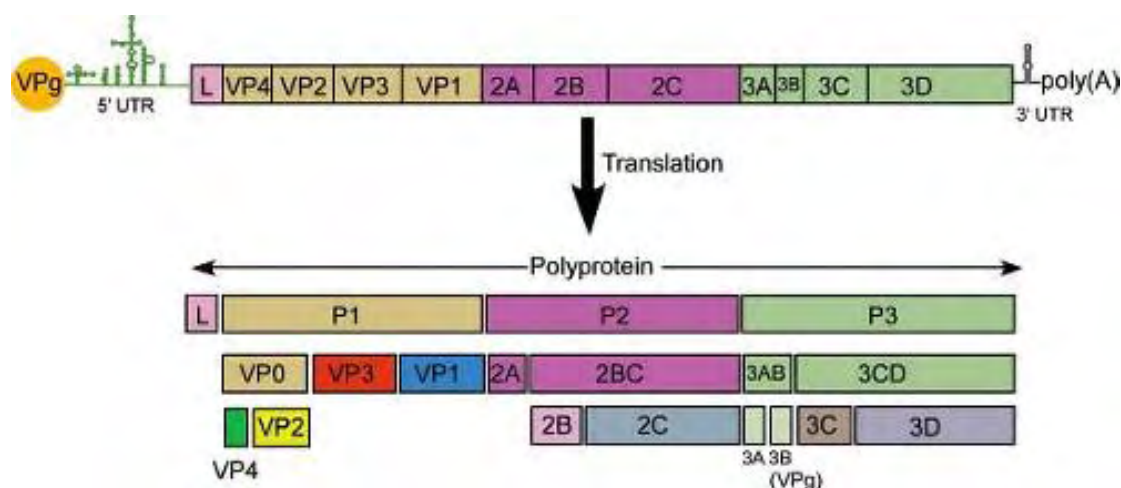
Εικόνα 1-2 : Σχηματική αναπαράσταση της δομής 5' UTR του πολιοϊού. Οι πρώτες και τελευταίες βάσεις νουκλεοτιδίων σε κάθε stem-loop αριθμούνται. Τα stem loops II έως VI αποτελούν την περιοχή IRES. Η πρωτεΐνη VPg παρουσιάζεται ως διακεκομμένος κύκλος [Malnou E C et al (2002)].

Η 3΄μη κωδικοποιούσα περιοχή των ribozyme ιών είναι μικρή, κυμαινόμενη σε μήκος από 40 έως 330 νουκλεοτίδια. Αυτή η περιοχή μπορεί επίσης να περιέχει μια δευτεροταγή δομή, μια ψευδοθηλειά, η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [Jacobson SJ et al (1993)]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA περιέχουν μια 3΄πολυ-(A) ουρά [Yogo Y, Wimmer E (1972)]. Ο αρνητικός κλώνος του RNA περιέχει μια 5΄ πολυ-(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολυ-(A) ουρά του θετικού κλώνου [Yogo Y et al (1974)]. Το ιικό RNA από το οποίο αφαιρείται η πολυ-(A) ουρά είναι μη μολυσματικό [Spector DH, Baltimore D (1974)].

Τα αποτελέσματα βιοχημικών μελετών σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού, μακριού, ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF-Open Reading Frame) στο ιικό RNA, το οποίο υφίσταται επεξεργασία ώστε να σχηματίσει μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες [Summers DF, Maizel JV (1968)]. Αυτή η υπόθεση επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος του πολιοϊού, η

οποία αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί ένα μοναδικό ORF [Kitamura N et al (1981), Racaniello VR, Baltimore D et al (1981)].

Μια παρόμοια στρατηγική για την έκφραση του ιικού γονιδίου λαμβάνει χώρα κατά την αντιγραφή όλων των *ricorna* ιών. Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη μετάφραση, έτσι ώστε το προϊόν πλήρους μήκους δεν παρατηρείται. Ο τεμαχισμός εκτελείται από πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από τον ιό, ώστε να αποδώσει 11 έως 15 προϊόντα τεμαχισμού. Ορισμένοι μη τεμαχισμένοι πρόδρομοι επίσης έχουν λειτουργία κατά την αντιγραφή.



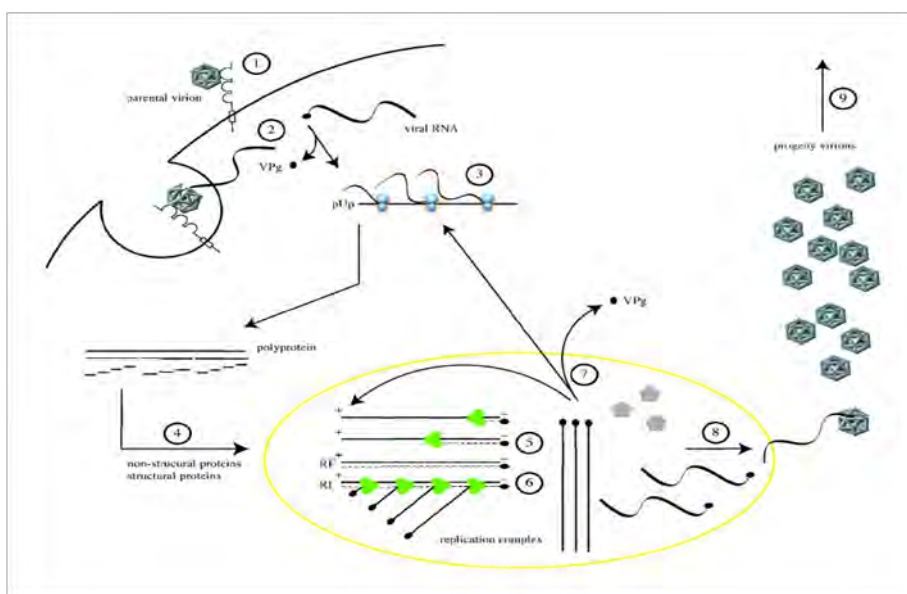
Εικόνα 1-3 : Οργάνωση του γονιδιώματος των *picorna* ιών. Πάνω: Αναπαράσταση του ιικού RNA γονιδιώματος, με την πρωτεΐνη VPg συνδεδεμένη στο 5' άκρο, την 5' αμετάφραστη περιοχή η οποία περιέχει την IRES, την περιοχή η οποία κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες, την 3' αμετάφραστη περιοχή η οποία περιέχει μία ψευδοθηλιά και την poly-(A) ουρά. L είναι η πρωτεΐνη οδηγός, η οποία δεν κωδικοποιείται σε όλους τους *picorna* ιούς. Κάτω: Μοτίβο επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης των *picorna* ιών [Racaniello VR (2007)].

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1-3, η πολυπρωτεΐνη έχει διαιρεθεί σε τρεις περιοχές: τις P1, P2 και P3. Τα γονιδιώματα ορισμένων *picorna* ιών κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη Οδηγό (L, Leader) πριν την P1 περιοχή. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην επεξεργασία πρωτεϊνών (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) και στην αντιγραφή του γονιδιώματος (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}).

1.3 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

Η αντιγραφή των ribonucleic acid (RNA) λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα. Το πρώτο βήμα είναι η πρόσδεση σε έναν κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA γονιδίωμα έπειτα εκδύεται, μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει δομικές αλλαγές του καψιδίου. Μόλις ο θετικός κλώνος του ιικού RNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται ώστε να παρέχει ιικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του γονιδιώματος και την παραγωγή νέων ιικών σωματιδίων. Οι ιικές πρωτεΐνες συντίθενται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται. Ο τεμαχισμός εκτελείται κυρίως μέσω δυο ιικών πρωτεϊνών, των 2A^{pro}, 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Μεταξύ των πρωτεϊνών οι οποίες συντίθενται είναι η RNA εξαρτώμενη- RNA πολυμεράση και βοηθητικές πρωτεΐνες, οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γονιδιώματος και τη σύνθεση του mRNA. Το πρώτο βήμα στην αντιγραφή του γονιδιώματος είναι η αντιγραφή του θετικής πολικότητας RNA, ώστε να σχηματίσει ένα ενδιάμεσο αρνητικής πολικότητας. Αυτό το βήμα ακολουθείται από την παραγωγή επιπλέον θετικών κλώνων. Αυτά λαμβάνουν χώρα σε μικρά μεμβρανοειδή κυστίδια, τα οποία επάγονται από αρκετές ιικές πρωτεΐνες. Όταν ο αριθμός των καψιδικών πρωτεϊνών είναι επαρκώς μεγάλος, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράξει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συναρμολογείται σε πενταμερή. Το νεοσυντιθέμενο θετικής πολικότητας RNA αλληλεπιδρά με τα πενταμερή για να σχηματίσει τον μολυσματικό ιό. Τα κενά καψίδια τα οποία βρίσκονται σε μολυσμένα κύτταρα πιθανόν είναι μια αποθηκευτική μορφή των πενταμερών. Τα παραπάνω παρουσιάζονται συνοπτικά στην Εικόνα 1-4.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν μοναδικό κύκλο αντιγραφής κυμαίνεται από 5 έως 10 ώρες, κάτι το οποίο εξαρτάται από το συγκεκριμένο ιό, τη θερμοκρασία, το PH και το κύτταρο του ξενιστή. Πολλοί picorna ιοί απελευθερώνονται καθώς το κύτταρο χάνει την ακεραιότητα του και λύεται, ενώ άλλοι picorna ιοί απελευθερώνονται από τα κύτταρα ελλείψει κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος.



Εικόνα 1-4 : Κύκλος ζωής των picorna ιών 1) Απέκδυση του ιικού γονιδιώματος. 2) Τεμαχισμός της ιικής πρωτεΐνης VPg και μετάφραση του ιικού RNA. 3) Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης. 4) Το RNA θετικής πολικότητας λειτουργεί ως υπόστρωμα για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου. 5) Η σύνθεση πολλών θετικών κλώνων από έναν αρνητικό κλώνο δημιουργεί το αντιγραφικό ενδιάμεσο (RI). 6) Τα νέα θετικά RNA μόρια μπορούν να λειτουργήσουν ως υπόστρωμα για μετάφραση ή 7) να επάγουν την αποκοπή ωρίμανσης της VPg, 8) η οποία παράγει νέα ιικά σωματίδια. 9) Η λύση του μολυσμένου κυττάρου οδηγεί σε απελευθέρωση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων [De Jesus NH (2007)].

1.3.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος στο κύτταρο

Οι ιοί picorna ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων συνδεδεμένοι αρχικά σε έναν υποδοχέα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή. Η φύση των υποδοχέων των picorna ιών παρέμενε άγνωστη έως το 1989, όταν ταυτοποιήθηκαν οι υποδοχείς για τον πολιοϊό και τη μεγάλη ομάδα των ρινοϊών [Mendelsohn CL et al (1989)]. Διαφορετικοί τύποι μορίων της

κυτταρικής επιφάνειας χρησιμεύουν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους ricorna ιούς. Ορισμένοι είναι κοινοί μεταξύ των ιών ricorna και άλλων οικογενειών ιών. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη CD55 της κυτταρικής επιφάνειας είναι υποδοχέας για κάποιους Coxsackie ιούς, Echo ιούς και τον εντεροϊό 70.

Για ορισμένους ricorna ιούς, ένας μοναδικός τύπος υποδοχέα επαρκεί για την είσοδο των ιών στα κύτταρα. Για άλλους ιούς, ένα δεύτερο μόριο, ή συνυποδοχέας, απαιτείται για την είσοδο του ιού στα κύτταρα. Ο PVR είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη τύπου I και μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Ig), με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μία ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή, ακολουθούμενη από δυο τύπου-C2 περιοχές [Koike S et al (1991), Morrison ME, Racaniello VR (1992)]. Τα ορθόλογα του PVR γονιδίου είναι παρόντα στο γονιδίωμα ενός αριθμού θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων αυτών που δεν είναι ευάλωτα στη μόλυνση από πολιοϊό [Ida-Hosonuma M et al (2003)]. Η αλληλουχία αμινοξέων της περιοχής 1 του PVR ποικίλλει εκτενώς μεταξύ των μη ευάλωτων θηλαστικών, ειδικά στις περιοχές που είναι γνωστό πως έρχονται σε επαφή με πολιοϊούς. Η απουσία περιοχής δέσμευσης πολιοϊού σε αυτά τα μόρια PVR, επομένως, εξηγεί γιατί η μόλυνση από πολιοϊό περιορίζεται στους πιθήκους. Πολλοί ricorna ιοί δεσμεύουν ιντεγκρίνες, οι οποίες είναι διμερείς υποδοχείς συγκόλλησης κυττάρων, με α και β υπομονάδες. Πολλοί υποδοχείς ιντεγκρίνης αναγνωρίζουν το τριπεπτιδίο Arg-Gly-Asp, η παρουσία του οποίου στο ιικό καψίδιο υποδηλώνει αλληλεπίδραση με αυτόν τον τύπο υποδοχέα.

Πολλοί εντεροϊοί δεσμεύονται στον παράγοντα επιτάχυνσης αποσύνθεσης (decay-accelerating factor, DAF ή CD55), ένα μέλος της αλληλουχίας του συμπληρώματος, που αποτελείται από τέσσερις

εξωκυτταρικές σύντομες ενότητες και προσκολλάται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (GIP). Για την πλειοψηφία των ιών αυτών, ωστόσο, η αλληλεπίδραση με τον DAF δεν επαρκεί για τη μόλυνση, καθώς το μόριο αυτό είναι ένας υποδοχέας προσκόλλησης αλλά δεν οδηγεί στην έκδυση του ιού. Ένας εξειδικευμένος ρόλος των συνυποδοχέων στην είσοδο των κυττάρων παρουσιάζεται από την είσοδο του ιού Cocksackie B 3 σε πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα [Coyne CB et al (2006)]. Ο υποδοχέας των Cocksackie ιών και αδenoϊών, CAR, διαμεσολαβεί την είσοδο στα κύτταρα όλων των Cocksackie B ιών [Bergelson JM et al, (1997)]. Ο CAR δεν είναι παρών στη απτική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων τα οποία καλύπτουν την εντερική και αναπνευστική οδό, όμως είναι συστατικό της στενής σύνδεσης και είναι μη προσβάσιμο στην είσοδο του ιού. Οι Cocksackie B ιοί πρώτα δεσμεύονται σε έναν υποδοχέα προσκόλλησης, DAF, ο οποίος είναι παρών στην απτική επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων. Η δέσμευση του ιού Cocksackie B 3 στον DAF ενεργοποιεί την κινάση Abl, η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί αναδιοργανώσεις ακτίνης εξαρτώμενες από τη Rac. Το γεγονός αυτό οδηγεί στην κίνηση του ιού προς τη στενή σύνδεση όπου μπορεί να δεσμεύσει τον CAR και να εισέλθει στα κύτταρα [Coyne CB et al (2006)].

Μεταξύ των ricorna ιών, οι τέσσερις καψιδικές πρωτεΐνες είναι παρόμοια οργανωμένες, όμως η αρχιτεκτονική της επιφάνειας ποικίλλει. Αυτές οι διαφορές ανταποκρίνονται στους διαφορετικούς ορότυπους και τους διαφορετικούς τύπους αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Για παράδειγμα, τα καψίδια των εντεροϊών έχουν μια αυλάκωση, η οποία περιβάλλει κάθε πενταπλό άξονα συμμετρίας. Οι αυλακώσεις των εντεροϊών

είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης με κυτταρικούς υποδοχείς τύπου-Ig. Τα αποτελέσματα γενετικών και δομικών πειραμάτων δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή τύπου-Ig περιέχει τη θέση η οποία δεσμεύει τον πολιοϊό [Koike S et al (1991), Morrison ME, Racaniello VR (1992)]. Μεταλλάξεις στην πρώτη περιοχή τύπου-Ig του PVR παρεμβάλλονται στη δέσμευση του πολιοϊού. Μετάλλαξη των αμινοξέων τα οποία καλύπτουν τις αυλακώσεις των πολιοϊών και ρινοϊών μπορούν να μεταβάλλουν τη συγγένεια της δέσμευσης στους υποδοχείς [Colston E, Racaniello VR (1994), Colston EM, Racaniello VR (1995), Harber J et al (1995), Liao S, Racaniello V (1997)]. Αρχικά πιστευόταν ότι οι αυλακώσεις των ρινοϊών ήταν πολύ βαθιές και στενές για να επιτρέψουν διείσδυση από τα μόρια των αντισωμάτων, τα οποία περιέχουν προσκείμενες περιοχές ανοσοσφαιρίνης [Rossmann MG (1989)]. Αυτό το φυσικό εμπόδιο θεωρούνταν πως έκρυβε αμινοξέα κρίσιμα για τη δέσμευση του υποδοχέα από το ανοσοποιητικό σύστημα. Σε αντίθεση με τους υποδοχείς τύπου-Ig οι οποίοι δεσμεύουν τις αυλακώσεις των εντεροϊών, οι θέσεις δέσμευσης για τον DAF στο ιικό σωματίδιο ποικίλλουν.

Μόλις οι ιοί ρινοϊα προσκολληθούν στον κυτταρικό υποδοχέα τους, το ιικό καψίδιο φέρεται μέσα στο κύτταρο μέσω του μονοπατιού ενδοκύτωσης, ακολουθούμενο από ελευθέρωση του γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα, τη θέση της αντιγραφής των ρινοϊών. Για ορισμένους ρινοϊούς, η αλληλεπίδραση με έναν κυτταρικό υποδοχέα χρησιμεύει μόνο στη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γονιδιώματος είναι συνέπεια του χαμηλού pH ή ίσως της δράσης ενός συνυποδοχέα. Για άλλους ρινοϊούς ο κυτταρικός υποδοχέας επίσης

προκαλεί αλλαγές διαμόρφωσης στον ιό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του γονιδιώματος.

Η αλληλεπίδραση των εντεροϊών με τους υποδοχείς του οδηγεί σε δομικές αλλαγές στα ιικά σωματίδια. Τα σωματίδια που προκύπτουν, ονομάζονται altered ή A σωματίδια και περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπλέον, το N-τελικό άκρο της VP1, το οποίο φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια του A σωματιδίου [Fricks CE, Hogle JM (1990)]. Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και, ως αποτέλεσμα, τα A σωματίδια έχουν μία αυξημένη συγγένεια για τις μεμβράνες σε σύγκριση με το αρχικά ιοσωμάτιο. Θεωρείται πως τα A σωματίδια αντιπροσωπεύουν μία σταθερή ενδιάμεση δομή στη διαδικασία εισόδου, η οποία παύει με την έξοδο του RNA και την παραγωγή κενών (80S) καψιδίων. Σύμφωνα με μία υπόθεση για την είσοδο του πολιοϊού, η δέσμευση στον υποδοχέα οδηγεί σε αυτές τις αλλαγές διαμόρφωσης. Το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο του VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, προσδένοντας το A σωματίδιο στη μεμβράνη. Έπειτα σχηματίζεται ένας μεμβρανικός πόρος, πιθανώς μέσω της VP4 και της VP1, μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να ταξιδέψει στο κυτταρόπλασμα.

Η VP4 απελευθερώνεται από το ιοσωμάτιο κατά τη μετατροπή προς A σωματίδια, όμως μια μικρή ποσότητα αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να παραμείνει και να συμμετάσχει με τη VP1 στο σχηματισμό μεμβρανικών καναλιών. Ένας ιός που περιέχει μία αλλαγή αμινοξέος στη θέση 28 της VP4 μπορεί να προσδεθεί σε κύτταρα και να μετατραπεί σε A σωματίδια, όμως αυτά μπλοκάρονται σε ένα μετέπειτα στάδιο στην είσοδο του ιού [Moscufo N

et al (1993)]. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η VP4 ίσως διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο σχηματισμό πόρων.

1.3.2 Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης

Όταν το θετικά φορτισμένο γενωμικό RNA των picorna ιών απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου, πρέπει να μεταφραστεί διότι δε μπορεί να αντιγραφεί από καμία κυτταρική RNA πολυμεράση και κανένα ιικό ένζυμο δε φέρεται στο κύτταρο μέσω του ιικού καψιδίου. Το θετικά φορτισμένο RNA γονιδίωμα στερείται τη δομή 5'καλύπτρας. Ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του θετικά φορτισμένου RNA του πολιοϊού αποκάλυψε μία 5'αμετάφραστη περιοχή μήκους 741 νουκλεοτιδίων, η οποία περιέχει 7 κωδικόνια AUG [Kitamura N et al (1981), Racaniello VR, Baltimore D (1981)]. Παρόμοιες 5'μη κωδικοποιούμενες περιοχές βρέθηκαν εν συνεχεία σε άλλους picorna ιούς και φάνηκε πως περιέχουν υψηλά διατεταγμένες RNA δομές. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην πρόταση ότι τα ριβοσώματα δε σκανάρουν κατά μήκος των 5'αμετάφραστων περιοχών των picorna ιών, αλλά προσδένονται σε μία εσωτερική αλληλουχία. Η 5'αμετάφραστη περιοχή του θετικά φορτισμένου RNA του πολιοϊού ακολούθως βρέθηκε πως περιέχει μια αλληλουχία η οποία προωθεί την εσωτερική πρόσδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας. Αυτή η αλληλουχία ονομάζεται εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES (Internal Ribosome Entry Site)*.

Οι ιικές IRES έχουν τοποθετηθεί σε τέσσερις ομάδες με βάση μία πληθώρα κριτηρίων, συμπεριλαμβανομένων της πρωτοταγούς αλληλουχίας, της δευτεροταγούς δομής, της θέσης του κωδικόνιου έναρξης και της δραστηριότητας σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Στην IRES τύπου I

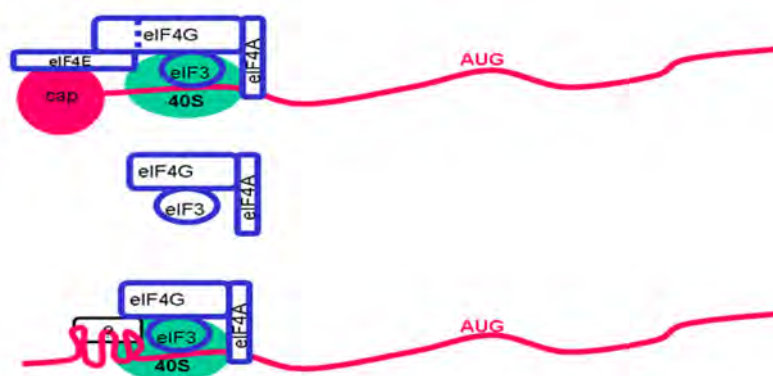
(βρίσκεται στο γονιδίωμα εντεροϊών και ρινοϊών), το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50 έως 100 νουκλεοτίδια μετά το 3΄άκρο της IRES.

Υπάρχει μικρή συντήρηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ διαφορετικών IRES. Η IRES των picorna ιών περιέχει εκτεταμένες περιοχές δευτεροταγών δομών RNA, οι οποίες δεν είναι αυστηρά συντηρημένες αλλά είναι κρίσιμες για την πρόσδεση του ριβοσώματος. Ένα μοτίβο αλληλουχίας το οποίο είναι συντηρημένο μεταξύ των IRES των picorna ιών είναι μία αλληλουχία GNRA (G, γουανίνη, N, οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, R, πουρίνη, A, αδενίνη) στη θηλειά IV των IRES τύπου I. Ένα ακόμη συντηρημένο στοιχείο είναι ένα μοτίβο Yn-Xm-AUG, στο οποίο η Yn είναι μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη και το Xm είναι ένα διάστημα μήκους 15 έως 25 νουκλεοτίδια, ακολουθούμενο από ένα κωδικόνιο AUG.

Η έναρξη της μετάφρασης μέσω IRES τύπου I περιλαμβάνει τη δέσμευση της ριβοσωμικής υπομονάδας 40S στην IRES, ακολουθούμενη από το σκανάρισμα της υπομονάδας στο κωδικόνιο έναρξης. Η 40S υπομονάδα μπορεί να προσδεθεί απευθείας στο RNA, ή μέσω αλληλεπίδρασης με πρωτεΐνες έναρξης μετάφρασης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1-5, το σύμπλοκο eIF3-40S στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης της eIF4G με την IRES.

Οι πρωτεΐνες των picorna ιών συντίθενται μέσω της μετάφρασης ενός μοναδικού, μακρού ORF κωδικοποιούμενο από το θετικά φορτισμένο RNA γονιδίωμα, και ακολούθως του τεμαχισμού της πολυπρωτεΐνης μέσω πρωτεϊνασών που κωδικοποιούνται από τον ιό. Αυτή η στρατηγική επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνών από ένα μοναδικό RNA γονιδίωμα. Η πολυπρωτεΐνη δεν παρατηρείται σε μολυσμένα κύτταρα επειδή υφίσταται

επεξεργασία μόλις κωδικοποιηθούν οι αλληλουχίες των πρωτεασών. Ο πρόδρομος της πολυπρωτεΐνης υφίσταται επεξεργασία συγχρόνως με τη μετάφραση μέσω ενδομοριακών αντιδράσεων. Όλα τα γονιδιώματα picorna ιών κωδικοποιούν τουλάχιστον μία πρωτεΐνάση, την 3C^{pro}/3CD^{pro}, και κάποια κωδικοποιούν την L^{pro} ή την 2A^{pro}.



Εικόνα 1-5 : Μοντέλα συμπλόκων έναρξης μετάφρασης. Πάνω: Εξαρτώμενη από 5'καλύπτρα μετάφραση. Κάτω: Εξαρτώμενη από IRES μετάφραση [Hunt D.M. (2015)].

Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, η κύρια αποκοπή μεταξύ P1 και P2 διαμεσολαβείται από την 2A^{pro}. Κυτταρικές πρωτεΐνες κόβονται επίσης από την 2A^{pro}, συμπεριλαμβανομένων των eIF4GI, eIF4GII, Pabp, και νουκλεοπορινών [Gradi A et al (1998), Gustin KE et al (2001)]. Στον πρωτεϊνικό πρόδρομο του πολιοϊού και άλλων εντεροϊών, η θέση αποκοπής για την 2A^{pro} βρίσκεται μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Άλλες θέσεις οι οποίες αποκόβονται από την 2A^{pro} περιλαμβάνουν τις θρεονίνη-γλυκίνη και φαινυλαλανίνη-γλυκίνη σε ορισμένους Coxsackie και echo ιούς. Έχει προταθεί ότι η δομή της 2A^{pro} ομοιάζει με αυτή των μικρών βακτηριακών πρωτεϊνών τύπου χυμοτριψίνης. Ωστόσο, η 2A^{pro} διαφέρει από όλες τις γνωστές πρωτεϊνάσες τύπου χυμοτριψίνης στο N-τελικό άκρο της. Η καταλυτική τριάδα

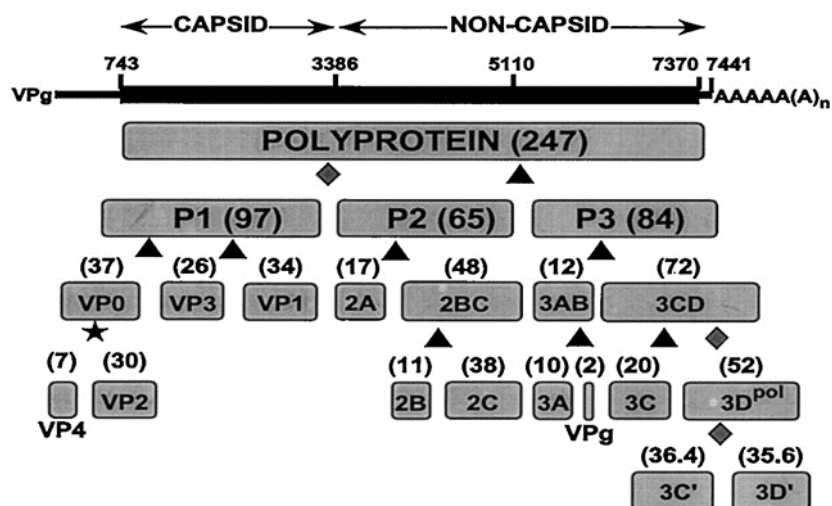
του ενεργού κέντρου βρίσκεται σε μία σχισμή μεταξύ των δυο περιοχών. Ακόμη ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό της 2A^{pro} είναι ένα στενά δεσμευμένο ιόν ψευδαργύρου στην αρχή της C-τελικής περιοχής. Βιοχημικές και δομικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητος για τη δομή του ενζύμου [Petersen JF et al, (1999)].

Όλοι οι ιοί picorna κωδικοποιούν την 3C^{pro}, η οποία εκτελεί μία αποκοπή μεταξύ των 2C και 3A. Σε αντίθεση με άλλες πρωτεΐνες των picorna ιών, η 3C^{pro} εκτελεί επίσης δευτερεύουσες αποκοπές των P1 και P2 προδρόμων. Η 3C^{pro} του πολιοϊού κόβει μόνο το διπεπτίδιο Gln- Gly.

Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 2A^{pro} είναι ενεργές στο νεοσυντεθέν πολυπεπτίδιο και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη μέσω αυτο-αποκοπής. Αφότου οι πρωτεΐνες απελευθερωθούν, αποκόπτουν την πολυπρωτεΐνη in trans. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός στον καταρράκτη επεξεργασίας είναι η απελευθέρωση του P1 προδρόμου από τη νεοσυντεθείσα P2-P3 πρωτεΐνη μέσω της 2A^{pro}. Στη συνέχεια, η 3CD^{pro} απελευθερώνεται από τον P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτική αποκοπή. Αυτή η πρωτεΐνη, η οποία περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, εκτελεί δευτερεύουσα αποκοπή των διπεπτιδίων γλουταμίνης-γλυκίνης στην P1 του πολιοϊού πολύ πιο αποτελεσματικά από την 3C^{pro} [Jore J et al (1988), Yrma-Wong MF et al (1988)]. Τόσο η 3C^{pro} όσο και η 3CD^{pro} επεξεργάζονται πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια αποτελεσματικότητα. Η παρουσία πολλαπλών λειτουργιών σε μία μοναδική πρωτεΐνη δεν εντοπίζεται μεταξύ των ευκαρυωτικών πρωτεϊνών και είναι ένα παράδειγμα του πως η ικανότητα

κωδικοποίησης μικρών ιικών γονιδιωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στην Εικόνα 1-6.

Ένα τελικό στάδιο επεξεργασίας λαμβάνει χώρα κατά την ωρίμανση, όταν η VP0 αποκόβεται ώστε να σχηματίσει τις VP4 και VP2.



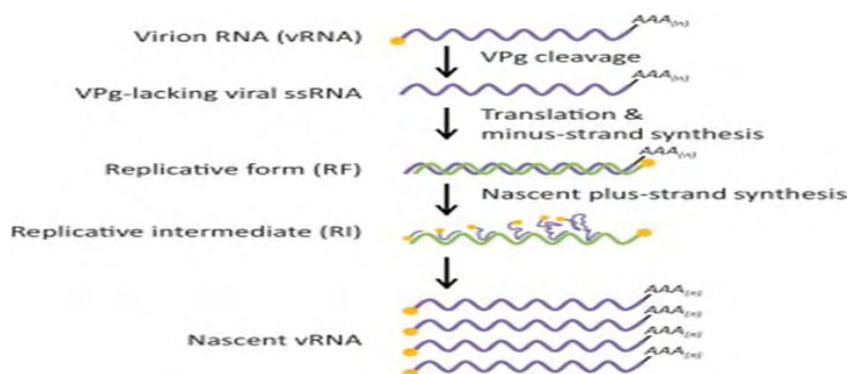
Εικόνα 1-6 : Σχηματική παρουσίαση του γονιδιώματος του πολιοϊού και των ιικών προϊόντων. Τα τρίγωνα αντιπροσωπεύουν γεγονότα επεξεργασίας μέσω 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Τα διαμάντια αντιπροσωπεύουν γεγονότα επεξεργασίας μέσω της 2A^{pro}. Το αστέρι αντιπροσωπεύει ένα γεγονός ωρίμανσης του ιικού σωματιδίου, το οποίο συμβαίνει μέσω αδιευκρίνιστου μηχανισμού [Parsley TB et al (1999)].

1.3.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Η αντιγραφή του ιικού γονιδιώματος λαμβάνει χώρα μέσω μίας ειδικής για τον ιό, RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης, καθώς η κυτταρική RNA σύνθεση είναι εξαρτώμενη από το DNA και λαμβάνει χώρα στον πυρήνα.

Σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό, το γονιδίωμα θετικής πολικότητας ενισχύεται σε περίπου 50.000 αντίγραφα ανά κύτταρο μέσω ενός ενδιάμεσου αρνητικού κλώνου. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1-7, τρεις μορφές ιικού RNA έχουν αναγνωριστεί στο κύτταρο: μονόκλωνο RNA, αντιγραφικό ενδιάμεσο (RI), και αντιγραφική μορφή (RF). Το μονόκλωνο RNA, η πιο άφθονη μορφή,

είναι αποκλειστικά θετικής πολικότητας. Ελεύθεροι αρνητικοί κλώνοι δεν έχουν ανιχνευτεί ποτέ σε μολυσμένα κύτταρα. Το RI είναι RNA πλήρους μήκους, από το οποίο έξι με οχτώ νέοι κλώνοι είναι προσκολλημένοι. Το RI είναι κυρίως θετικής πολικότητας με νέους αρνητικούς κλώνους, αν και η αντίθετη διαμόρφωση έχει ανιχνευτεί. Το RF είναι μία δίκλωνη μορφή, αποτελούμενη από ένα πλήρους μήκους αντίγραφο του θετικού και αρνητικού κλώνου. Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 70 φορές μεγαλύτερη από τη σύνθεση των αρνητικών κλώνων [Giachetti C, Semler BL (1991), Novak JE, Kirkegaard K. (1991)].



Εικόνα 1-7 : Μηχανισμός αντιγραφής του ιικού RNA [Feng Q et al (2014)].

Ένα κύριο συστατικό του συμπλόκου αντιγραφής είναι μια ιική πρωτεΐνη, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Άλλες ιικές πρωτεΐνες όπως οι 2BC, 2C, 3AB και 3C^{pro} και πρωτεΐνες του ξενιστή επίσης ανιχνεύονται στα σύμπλοκα αντιγραφής RNA.

Τα σύμπλοκα αντιγραφής αντέγραφαν μόνο ιικό RNA ήδη υπάρχον στο σύμπλοκο, και δεν ανταποκρίνονταν σε προστιθέμενο RNA. Επομένως, έγιναν προσπάθειες να απομονωθεί ένα ένζυμο εξαρτώμενο από υπόστρωμα, από μεμβρανικά τμήματα μολυσμένων κυττάρων, με χρήση ενός poly(A) υποστρώματος και ενός oligo(U) εκκινητή. Παρασκευάσματα υψηλής

καθαρότητας περιείχαν μόνο την p63, την κύρια ιική πρωτεΐνη που υπάρχει σε μεμβρανικά σύμπλοκα αντιγραφής [Van Dyke et al (1980)]. Αυτή η πρωτεΐνη είναι η RNA πολυμεράση του πολιοϊού, γνωστή ως 3D^{pol}. Απουσία ενός oligo(U) εκκινητή, η 3D^{pol} δε μπορεί να αντιγράψει το RNA του πολιοϊού.

Η RNA πολυμεράση 3D^{pol} παράγεται με τεμαχισμό μιας προδρόμου πρωτεΐνης, 3CD^{pro}, η οποία είναι πολύ δραστική ως πρωτεϊνάση, δεσμεύει το *cre*, όμως δεν έχει δράση ως πολυμεράση. Έχει προταθεί ότι η επεξεργασία της 3CD επηρεάζει τη θέση του N-τελικού άκρου της 3D^{pol}, το οποίο βρίσκεται σε μία επιφανειακή πτυχή της 3D^{pol}.

Η πρώτη δομή της 3D^{pol} του πολιοϊού αποκάλυψε ότι τα μόρια της πολυμεράσης αλληλεπιδρούν με τρόπο ώστε να σχηματίζουν ίνες. Ακολούθως, η πρωτεΐνη φάνηκε πως σχηματίζει ένα πλέγμα [Lyle JM et al (2002)]. Η υπόθεση ήταν ότι το RNA αντιγραφόταν καθώς μετακινούνταν κατά μήκος του πλέγματος, αντί να μετακινείται η πολυμεράση πάνω στο υπόστρωμα.

Η 3D^{pol} του πολιοϊού είναι ένα ένζυμο εξαρτώμενο από εκκινητή το οποίο δεν αντιγράφει το RNA του πολιοϊού χωρίς έναν oligo(U) εκκινητή. Η ανακάλυψη της VPg η οποία συνδέεται στο γενωμικό RNA του πολιοϊού, καθώς και στο 5' άκρο των νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων RNA, καθιστά πιθανή την εμπλοκή της VPg στην έναρξη της σύνθεσης. Ένας πρόδρομος της VPg, γνωστός ως 3AB, πιθανόν συμμετέχει στην αντίδραση έναρξης. Η 3AB είναι ένα πολυπεπτίδιο δεσμευμένο στη μεμβράνη, και επομένως, ένας ιδανικός υποψήφιος για να δράσει ως δότης της VPg σε μεμβρανικά σύμπλοκα αντιγραφής. Καθώς δεν έχει ανιχνευτεί πρωτεΐνη μεγαλύτερη της VPg συνδεδεμένη σε νέους κλώνους RNA, είναι πιθανόν ότι η

3AB αποκόβεται ταχύτατα μέσω της πρωτεΐνάσης 3C^{pro} ώστε να σχηματίσει RNA συνδεδεμένο με VPg.

Το υπόστρωμα για την ουριδυλίωση της VPg είναι μία RNA φουρκέτα, το cre (cis-acting replication element), το οποίο βρίσκεται στην κωδική περιοχή των picorna ιών [Wickman I (1907), Rieder E et al (2000)]. Εάν η εξαρτώμενη από το cre ουριδυλίωση της VPg εμπλέκεται μόνο στη σύνθεση του θετικού κλώνου, ή επίσης στη σύνθεση του αρνητικού κλώνου, είναι αμφισβητήσιμο [Morasco BJ et al (2003), Murray KE, Barton DJ (2003)].

Η σύνθεση RNA των picorna ιών λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα του κυτάρου. Η μόλυνση από picorna ιούς οδηγεί σε πολλαπλασιασμό και ανακατανομή των ενδοκυτταρικών μεμβρανών σε μολυσμένα κύτταρα. Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και η συσκευή Golgi καταστρέφονται σε αυτή τη διαδικασία, και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με διμεμβρανικά κυστίδια [Dales S et al (1965), Schlegel A et al (1996)]. Η αντιγραφή του ιικού RNA λαμβάνει χώρα στις κυτταροπλασματικές επιφάνειες αυτών των κυστιδίων [Bienz K et al (1987), Cho MW et al (1994), Egger D et al (2000)]. Η μεμβρανική θέση της αντιγραφής του ιικού RNA εξασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα των αντιδράσεων αντιγραφής. Έχει προταθεί επίσης ότι η μεμβρανική τοποθέτηση των πρωτεϊνών της αντιγραφής του ιικού RNA ίσως προωθεί τον ολιγομερισμό τους [Lyle JM et al (2002)].

Τουλάχιστον δυο ιικές πρωτεΐνες, 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο αντιγραφής σε μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μία υδρόφοβη πρωτεΐνη η οποία δεσμεύει την πρωτεΐνη εκκινήτη VPg στη μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η πρωτεΐνη 3AB δεσμεύει τη 3D^{pol} και τη 3CD^{pro}, συναρμολογώντας το

σύμπλοκο αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C έχει μία περιοχή η οποία δεσμεύεται στο RNA, η οποία θα μπορούσε επίσης να δεσμεύσει το ιικό RNA στις μεμβράνες στα σύμπλοκα αντιγραφής [Echeverri AC et al (1995)].

Το γενωμικό RNA των picorna ιών δεν είναι μόνο mRNA αλλά επίσης το υπόστρωμα για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου RNA. In vitro πειράματα με τη χρήση αναστολέων της πρωτεϊνοσύνθεσης δείχνουν πως, όταν τα ριβοσώματα παγώνουν πάνω στο ιικό RNA, η αντιγραφή του RNA αναστέλλεται. Αντίθετα, όταν τα ριβοσώματα απελευθερώνονται από το ιικό RNA, η αντιγραφή του αυξάνεται. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι η αντιγραφή και η μετάφραση δε μπορούν να συμβούν συγχρόνως στο ίδιο υπόστρωμα.

Ένας μηχανισμός για τη ρύθμιση της μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA περιλαμβάνει την αποκοπή της poly r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης. Αυτή η πρωτεΐνη δρα κατά την IRES-εξαρτώμενη μετάφραση μέσω δέσμευσης στο stem-loop IV [Gamarnik AV et al (1997)] και στη σύνθεση του ιικού RNA μέσω δέσμευσης στο stem-loop I [Parsley TB et al (1997)]. Η poly r(C)-δεσμευτική πρωτεΐνη αποκόβεται από την ιική 3C^{pro}. Η αποκομμένη πρωτεΐνη δε μπορεί πλέον να διεγείρει την IRES-εξαρτώμενη πρωτεϊνοσύνθεση, όμως είναι ικανή να συμμετάσχει στην έναρξη της σύνθεσης του ιικού RNA [Perera R et al (2007)].

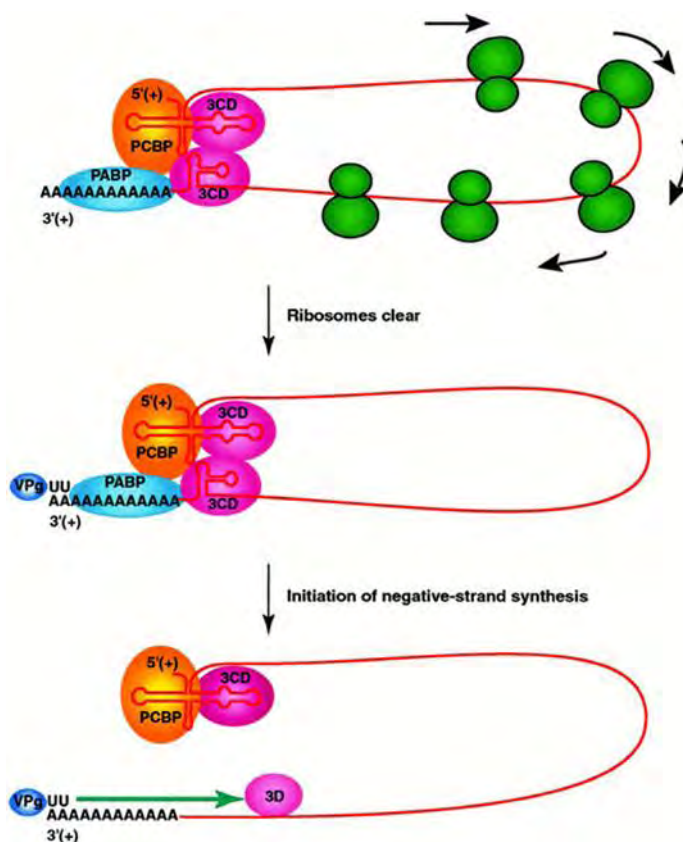
Οι RNA-εξαρτώμενες RNA πολυμεράσες των picorna ιών είναι ένζυμα ειδικά για υποστρώματα. Η 3D^{pol} του πολιοϊού αντιγράφει μόνο το ιικό RNA, και όχι κυτταρικό mRNA, σε μολυσμένα κύτταρα. Το κεκαθαρμένο ένζυμο, ωστόσο, αντιγράφει κάθε πολυαδενυλιωμένο RNA εφόσον έχει έναν oligo(U) εκκινήτη. Αυτή η παρατήρηση έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι η εξειδίκευση

υποστρώματος πιθανόν εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών αντιγραφής με στοιχεία αλληλουχίας στο ιικό RNA.

Τα στοιχεία του RNA τα οποία βρίσκονται στην κωδική περιοχή των riborna ιών, τα οποία κατευθύνουν την ουριδυλίωση της VPg, είναι σημεία δέσμωσης για την 3CD^{pro}. Η 3'μη κωδική περιοχή του ιικού RNA θετικής πολικότητας περιέχει μία ψευδοθηλειά RNA, η οποία είναι συντηρημένη μεταξύ των riborna ιών, και πιστεύεται πως διαδραματίζει ρόλο στην εξειδίκευση αντιγραφής από την 3D^{pol} [Jacobson SJ et al (1993)]. Διατάραξη της ψευδοθηλειάς λόγω μεταλλαξιγένεσης παράγει ιούς με ελαττωματική σύνθεση RNA, υποδεικνύοντας τη σημασία της δομής στη σύνθεση του RNA αρνητικού κλώνου.

Μία δομή τριφυλλιού (cloverleaf) που σχηματίζεται στην 5'μη κωδική περιοχή επίσης διαδραματίζει έναν σημαντικό ρόλο στην εξειδίκευση υποστρώματος. Έχει βρεθεί ότι η 3CD^{pro} δεσμεύει τη δομή τριφυλλιού στο θετικό κλώνο, μαζί με μία κυτταρική πρωτεΐνη, πλέον γνωστή ως poly r(C)-δεσμευτική πρωτεΐνη, η οποία απαιτείται για το σχηματισμό του συμπλόκου [Andino R et al (1993), Parsley TB et al (1997)]. Η περιοχή της 3CD^{pro} η οποία δεσμεύει το RNA περιέχεται στο 3C^{pro} τμήμα της πρωτεΐνης, στην αντίθετη πλευρά του μορίου από την περιοχή που εμπλέκεται στην πρωτεόλυση. Μεταλλάξεις μέσα σε αυτήν την περιοχή καταλύουν το σχηματισμό του συμπλόκου και την αντιγραφή του RNA χωρίς να επηρεάζουν την επεξεργασία των ιικών πρωτεϊνών. Η 3CD^{pro}, επομένως, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του ιικού RNA μέσω της συμμετοχής στο

σχηματισμό ενός ριβονουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου στο 5' άκρο του RNA θετικής πολικότητας. Τα παραπάνω παρουσιάζονται στην Εικόνα 1-8.



Εικόνα 1-8 : Μοντέλο κυκλικού συμπλόκου το οποίο χρησιμεύει για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA. Οι ιικές πρωτεΐνες 3CD και VPg, η poly (A) – binding protein και η poly r – (c) – binding protein αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και στη συνέχεια με τα άκρα του ιικού RNA ώστε να σχηματίσουν ένα κυκλικό σύμπλοκο. Η αναστολή της έναρξης μετάφρασης επιτρέπει την απομάκρυνση του ιικού RNA. Όταν το RNA υπόστρωμα απομακρυνθεί από τα ριβοσώματα, η VPg – pUpU συνεχίζεται με το 3' άκρο του ιικού RNA και ολοκληρώνει τον σχηματισμό του κυκλικού συμπλόκου έναρξης αντιγραφής [Barton DJ et al (2001)].

1.3.4 Κασιδίωση και απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, του προδρόμου των κασιδικών πρωτεϊνών, σχηματίζονται οι κεντρικές δομές β-βαρελίου, και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών αυτών των περιοχών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 απελευθερωθεί από την πρωτεΐνη 2A, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 αποκόπτονται από την πρωτεΐνη 3CD^{pro}. Αυτές οι θέσεις αποκοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Μετά την αποκοπή συμβαίνει σημαντική

κίνηση των αμινοτελικών και καρβοξυ-τελικών άκρων, όμως οι συνδέσεις μεταξύ των β-βαρελίων δε διαταράσσονται [Hogle JM et al (1985)]. Στο ώριμο καψίδιο, τα καρβοξυ-τελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ τα αμινοτελικά άκρα βρίσκονται στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτομερών. Αυτή η διαδικασία παράγει το πρώτο ενδιάμεσο συναρμολόγησης στο μονοπάτι του πολιοϊού, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα η οποία αποτελείται από ένα αντίγραφο από καθένα από τα VP0, VP3 και VP1. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-9, πέντε πρωτομερή στη συνέχεια συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν ένα πενταμερές, με συντελεστή καθίζησης 14S.

Το τελικό μορφογεννητικό βήμα περιλαμβάνει την αποκοπή των περισσότερων από τα VP0 μόρια σε VP4 + VP2. Η πρωτεΐνάση, η οποία εκτελεί αυτή την τελική αποκοπή ωρίμανσης, δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός απόσχισης των VP0 βρίσκεται στο εσωτερικό των κενών καψιδίων και των ώριμων ιικών σωματιδίων και δεν είναι προσβάσιμος σε ιικές ή κυτταρικές πρωτεΐνάσες.

Η διαδικασία καψιδίωσης των *picorna* ιών είναι πολύ εξειδικευμένη, έχοντας ως αποτέλεσμα το πακετάρισμα μόνο του RNA θετικής πολικότητας, και όχι το ιικό mRNA, το ιικό RNA αρνητικής πολικότητας, ή οποιοδήποτε κυτταρικό RNA [Nomoto A et al (1977), Novak JE et al (1991)]. Η VPg πιθανόν δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς το RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο περιέχει VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA ίσως εξηγεί το εκλεκτικό πακετάρισμα του ιικού RNA θετικής πολικότητας. Το ιικό RNA το οποίο είναι

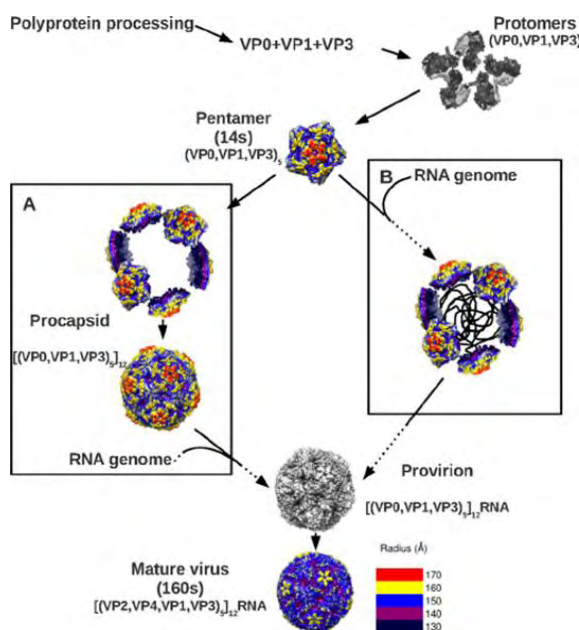
διαθέσιμο για πακετάρισμα, επομένως, είναι λίγο, και οι διαθέσιμες καψιδικές πρωτεΐνες είναι πολλές. Αυτά τα αποτελέσματα προτείνουν ότι το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος είναι συνδεδεμένο με τη σύνθεση του RNA, και εξηγούν γιατί μόνο το RNA που περιέχει VPg καψιδιώνεται.

Κατά τη σύνθεση της, ο πρόδρομος της P1 καψιδικής πρωτεΐνης συνδέεται με το μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό υπόλειμμα γλυκίνης του VP4, το οποίο είναι εκτεθειμένο μετά την απομάκρυνση του υπολείμματος έναρξης Met [Chow M et al (1987)]. Οι ομάδες μυριστικού, οι οποίες σχηματίζουν μέρος ενός δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ υπομονάδων οι οποίες σχηματίζονται όταν τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή, συγκεντρώνονται γύρω από το πενταπλό άξονα συμμετρίας και σταθεροποιούν το β-κύλινδρο, ο οποίος αποτελείται από αμινοτελικά άκρα πέντε αντιγράφων της VP3. Η μεταλλαξιγένεση υποδεικνύει ότι η ομάδα μυριστικού διαδραματίζει ρόλο στη σταθεροποίηση των πενταμερών και επομένως, των ιικών σωματιδίων [Ansardi DC et al (1994), Marc D et al (1991), Moscufo N et al (1992)].

Όταν τα κύτταρα μολύνονται με τον πολιοϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές γνωστές ως *κυτταροπαθογόνες επιδράσεις*. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, τη διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών, και τη συρρίκνωση όλου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων είναι άγνωστη. Μία υπόθεση είναι ότι η διαρροή του λυσοσωματικού περιεχόμενου είναι εν μέρει υπεύθυνη [Guskey LE et al (1970)]. Αν και η σύνθεση του

κυτταρικού RNA, πρωτεϊνών και DNA αναστέλλεται κατά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης, αυτό δεν επαρκεί για τις κυτταροπαθογόνες επιδράσεις.

Αν και ορισμένες εκδηλώσεις των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων και της απόπτωσης είναι παρόμοιες, τα μονοπάτια τα οποία οδηγούν στην πρόκληση τους διαφέρουν [Agol VI et al (1998)].



Εικόνα 1-9 : Διάγραμμα συναρμολόγησης των rotovirus ιών. Οι δομικές πρωτεΐνες συντάσσονται σε πρωτομερή, πέντε εκ των οποίων συναρμολογούνται σε ένα πενταμερές. Τα πενταμερή (14S) συναρμολογούνται στο προ-ϊικό σωματίδιο είτε με αυτοσυναρμολόγηση του προκαψιδίου που ακολουθείται από πακετάρισμα του γονιδιώματος (A) είτε με συγκέντρωση του καψιδίου γύρω από ένα γονιδίωμα (B). Το τελικό βήμα ωρίμανσης περιλαμβάνει την αποκοπή της VP0 ώστε να παράγει VP2 και VP4, ένα στάδιο το οποίο επάγεται από το πακεταρισμένο RNA [Cifuentes J et al (2013)].

1.4 Παθογένεια

Η μόλυνση από τον ιό συνήθως προϋποθέτει ότι το ιικό σωματίδιο μπορεί να προσκολληθεί στην επιφάνεια του κυττάρου, και για καιρό υπήρχε η υπόθεση ότι κάθε ιός θα είχε ένα μοναδικό υποδοχέα. Όσον αφορά τον πολιοϊό, αυτός δεσμεύεται στον υποδοχέα του πολιοϊού (πλέον ονομαζόμενο CD155), μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη στην υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών, η οποία διαμεσολαβεί την προσκόλληση των NK (natural killer) κυττάρων και πυροδοτεί τις λειτουργίες τους.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι ορισμένοι ιοί, ή ιικά στελέχη, πιθανόν να έχουν περισσότερους του ενός υποδοχείς, επεκτείνοντας το πιθανό εύρος ξενιστή τους. Στην πραγματικότητα, ορισμένοι ιοί φαίνεται να αλληλεπιδρούν με δυο διαφορετικά μόρια επιφάνειας σε ένα μοναδικό κύτταρο, πιθανόν σε σειρά, με τη μία πρωτεΐνη να δρα ως το ήμισυ της δέσμευσης, πριν «παραδώσει» τον ιό σε μία δεύτερη πρωτεΐνη η οποία διευκολύνει την είσοδο του στο κύτταρο.

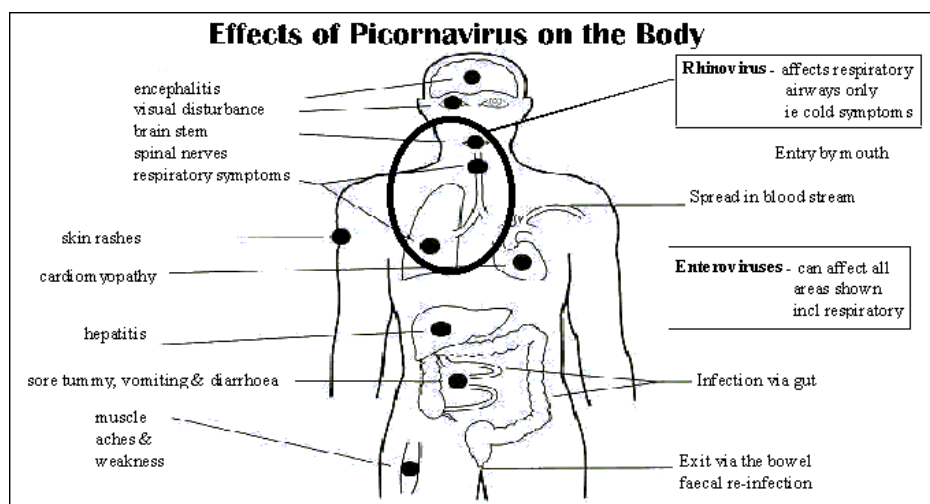
Οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι πολύ συχνές και οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές, όμως μπορεί να γίνουν σοβαρές και επικίνδυνες για τη ζωή [Pallansch MA et al (2013)]. Οι εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με ένα μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1-10, το οποίο περιλαμβάνει την άσηπτη μηνιγγίτιδα και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (CAV ιοί), τη μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα (CVB ιοί και Echo ιοί), συστηματικές νεογνικές λοιμώξεις (CVB ιοί και Echo ιοί), τη νόσο χεριών, ποδιών και στόματος (EV-71 και CVA ιοί), την παγκρεατίτιδα (CVB ιοί), την ηπατίτιδα και αναπνευστικές νόσους.

Ορισμένοι εντεροϊοί έχουν χαρακτηριστικό τροπισμό σε ιστούς. Οι εντεροϊοί μπορούν να μολύνουν μεγάλο αριθμό κυττάρων-στόχων, συμπεριλαμβανομένων νευρώνων, καρδιομυοκυττάρων και επιθηλιακών κυττάρων.

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί μεταδίδονται από του στόματος και μέσω αναπνευστικών σταγονιδίων, επομένως η συστηματική μόλυνση απαιτεί τη διέλευση του ιού από το γαστρεντερικό τοίχωμα, το μεγαλύτερο μέρος του οποίου καλύπτεται από επιθηλιακά κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ένα φραγμό ενάντια στην εισβολή. Η κύρια θέση της μόλυνσης και αντιγραφής του

πολιοϊού στο έντερο παραμένει άγνωστη. Ο πολιοϊός έχει ταυτοποιηθεί σε λεμφοειδείς ιστούς, όπως οι αμυγδαλές [Bodian D (1955)] και σε λεμφοειδή συσσωματώματα, επωνομαζόμενα πλάκες του Peyer (Peyer's patches, PPs), τα οποία βρίσκονται στον ειλεό του λεπτού εντέρου.

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 δίκτυοενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο-στόχο (νωτιαίος μυελός, εγκέφαλος, μήνιγγες, μυοκάρδιο και δέρμα). 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 [Melnick J L (1990)].



Εικόνα 1-10: Επιδράσεις των picorna ιών στον ανθρώπινο οργανισμό [Yin-Murphy M, Almond JW (1996)].

1.5 Επιδημιολογία

Παρά τη συνεχή παρουσία των λοιμώξεων των εντεροϊών και το μεγάλο εύρος των κλινικών εκδηλώσεων, τα δημογραφικά στοιχεία των διάφορων λοιμώξεων και ασθενειών διαθέτουν ορισμένα σταθερά

χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, ορισμένοι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας, του φύλου, και της κοινωνικοοικονομικής κατάστασης, έχουν σε μεγάλο βαθμό προβλέψιμα αποτελέσματα.

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που καθορίζουν το αποτέλεσμα της λοίμωξης των εντεροϊών είναι η ηλικία. Διαφορετικές ηλικιακές ομάδες εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στη μόλυνση, στη σοβαρότητα της ασθένειας, στις κλινικές εκδηλώσεις, και στην πρόγνωση που ακολουθεί τη λοίμωξη από εντεροϊούς.

Η διάδοση του ιού συμβαίνει στο μεγαλύτερο βαθμό κατά την πρωτογενή λοίμωξη με ένα συγκεκριμένο ορότυπο εντεροϊού. Καθώς η λοίμωξη είναι τόσο κοινή, οι περισσότερες πρωτογενείς λοιμώξεις συμβαίνουν κατά την παιδική ηλικία. Για αυτό το λόγο, τα νεαρά παιδιά είναι πιθανόν οι πιο σημαντικοί μεταδότες των εντεροϊών, ειδικά εντός των οικογενειών.

Η σοβαρότητα ενός αριθμού ασθενειών προκαλούμενων από εντεροϊούς πέραν της πολιομυελίτιδας μπορεί να σχετίζεται σημαντικά με την ηλικία. Μία έμμεση υπόδειξη είναι ότι η καθυστέρηση στην πρώτη μόλυνση με ένα αριθμό εντεροϊών αυξάνει τον κίνδυνο πιο σοβαρής ασθένειας. Για παράδειγμα, το εξάνθημα που σχετίζεται με CVA και echo ιούς είναι κυρίως πιο ήπιο σε παιδιά από ότι σε ενήλικες. Αντιθέτως, ορισμένοι εντεροϊοί προκαλούν πιο σοβαρές ασθένειες σε νεογέννητα από ότι σε μεγαλύτερα παιδιά και ενήλικες, πιθανώς προκαλώντας κεραυνοβόλο *ιική σήψη* με μυοκαρδίτιδα, εγκεφαλίτιδα και ορισμένες φορές θάνατο [Chiou CC et al (1998), Jankovic N et al (1999)].

Οι λοιμώξεις εντεροϊών είναι περισσότερο διαδεδομένες μεταξύ ατόμων χαμηλότερης κοινωνικοοικονομικής κατάστασης και κατοίκους αστικών περιοχών [Hall CE et al (1970), Jenista JA et al (1984)].

Οι ασθένειες των εντεροϊών, και πιθανόν οι λοιμώξεις τους, συμβαίνουν συχνότερα σε άντρες από ότι σε γυναίκες [Gondo K et al (1995)], ωστόσο έχουν περιγραφεί ορισμένες εξαιρέσεις [Dechkum N et al (1998)]. Η επικράτηση των αντρών τείνει να είναι μεγαλύτερη για τις περισσότερο σοβαρές ασθένειες (π.χ. ασθένειες του ΚΝΣ) από ότι για τις λιγότερο σοβαρές ασθένειες (π.χ. νόσος χεριών, ποδιών και στόματος).

Η προφανής επικράτηση των λοιμώξεων των εντεροϊών μεταξύ των αντρών μπορεί να έχει κοινωνιολογική και βιολογική εξήγηση. Ορισμένες εξηγήσεις έχουν προταθεί στη βάση μελετών λοιμώξεων σε υγιή παιδιά [Gelfand HM et al (1963)]: στα αγόρια παρατηρείται μεγαλύτερη διάρκεια της απέκκρισης του ιού σε σχέση με τα κορίτσια (οδηγώντας σε αυξημένη πιθανότητα αναγνώρισης της μόλυνσης) και επίσης παρατηρείται μεγαλύτερος ιικός τίτλος στα κόπρανα των αγοριών (οδηγώντας σε μία παρόμοια αύξηση της διάγνωσης).

Οι εντεροϊοί μπορούν να απομονωθούν τόσο από το κατώτερο και το ανώτερο πεπτικό σωλήνα και μπορούν να μεταδοθούν τόσο από του στόματος όσο και μέσω των αναπνευστικών οδών. Η μετάδοση από του στόματος μπορεί να κυριαρχεί σε περιοχές με φτωχές συνθήκες υγιεινής, ενώ η αναπνευστική μετάδοση μπορεί να κυριαρχεί σε περισσότερο αναπτυγμένες περιοχές [Horstmann DM et al (1967)]. Η σχετική σημασία των διαφορετικών τρόπων μετάδοσης πιθανόν ποικίλλει ανάλογα με το συγκεκριμένο εντεροϊό και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής των ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για τις ιικές ασθένειες. Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς: παρέχουν τη δυνατότητα για αναμφισβήτητη ταυτοποίηση του στελέχους, παρέχουν γνώσεις για την κατάταξη και ταξινόμηση των εντεροϊών, διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων, και επιτρέπουν την ταυτοποίηση στελεχών που μεταδίδονται μεταξύ των κρουσμάτων. Όσον αφορά τους εντεροϊούς, και συγκεκριμένα τον πολιοϊό, η κύρια μέθοδος για την παραγωγή επιδημιολογικών πληροφοριών είναι η άμεση ανάλυση της γονιδιωματικής παραλλαγής με τη χρήση αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων. Η εισαγωγή της τεχνικής της αλληλούχισης γονιδιωματικών νουκλεϊκών οξέων και η εφαρμογή της στη μελέτη απομονώσεων άγριων στελεχών πολιοϊού από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη των μοριακών μελετών [Rico-Hesse R et al (1987)].

Η τεχνολογία αλληλούχισης νουκλεϊκών οξέων έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες του πολιοϊού, όπου οι πληροφορίες έχουν αποδειχτεί πολύτιμες στην υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης του πολιοϊού [Kew O et al (1993), Kew OM et al (1995)]. Από αυτές τις μελέτες, είναι δυνατό να καθορίσουμε (α) εάν ένας απομονωμένος πολιοϊός σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ απομονώσεων σε μία επιδημία, και (γ) διαφορές μεταξύ απομονώσεων από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Με τη σύγκριση των αλλαγών οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ στελεχών του ιού, η γεωγραφική και χρονική προέλευση ενός ιού μπορεί να προσδιοριστεί.

Μελέτες στη μοριακή επιδημιολογία εντεροϊών εκτός του πολιοϊού, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση απομονώσεων του ιού μέσα σε έναν ορότυπο με το χρόνο, καθώς και από τη σύγκριση απομονώσεων διαφορετικών ορότυπων. Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες με τη χρήση αλληλούχισης έχουν αναφερθεί για τους CVB1, CVB5, echo 30, 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 ιού echo 30 έχουν δείξει μία αλληλεπικαλυπτόμενη διαδοχή μεταξύ των απομονώσεων από τις Ηνωμένες Πολιτείες [Oberste MS et al (1999)].

2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της εργασίας ήταν ο εντοπισμός εντεροϊών οι οποίοι προκαλούν ή δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε κύτταρα Rd, με τη χρήση κυτταροκαλλιέργειας και RT Real Time PCR.

3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Στελέχη Εντεροϊών

Στο πειραματικό μέρος της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν τα στελέχη εντεροϊών Sabin 1, Echo 12 και Coxsackie A 13:

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός Πρόσβασης στη GENBANK
PV-1	Sabin(Lsc, 2ab)	V01150
E 12	Travis(Philippines/53)	X79047
CAV 13	Flores(Mexico/52)	X87594

Πίνακας 3-1 : Πρότυπα στελέχη εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν

3.2 Καλλιέργεια Εντεροϊών

Η κυτταρική σειρά που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια των εντεροϊών ήταν η κυτταρική σειρά Rd. Αρχικά, μολύνεται μία πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιέργειας με 100 μl του ιού και τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C. Μετά από 24 ώρες εξετάζεται για την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος (CPE) και ακολουθεί ανακαλλιέργεια του ιού μέχρι να υπάρξει πλήρης καταστροφή των κυττάρων σε διάστημα 24 ωρών. Σκοπός είναι η αύξηση του ιικού τίτλου. Όταν παρατηρηθεί πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση σε διάστημα 24 ωρών, η πλαστική φιάλη καταψύχεται στους -20°C.

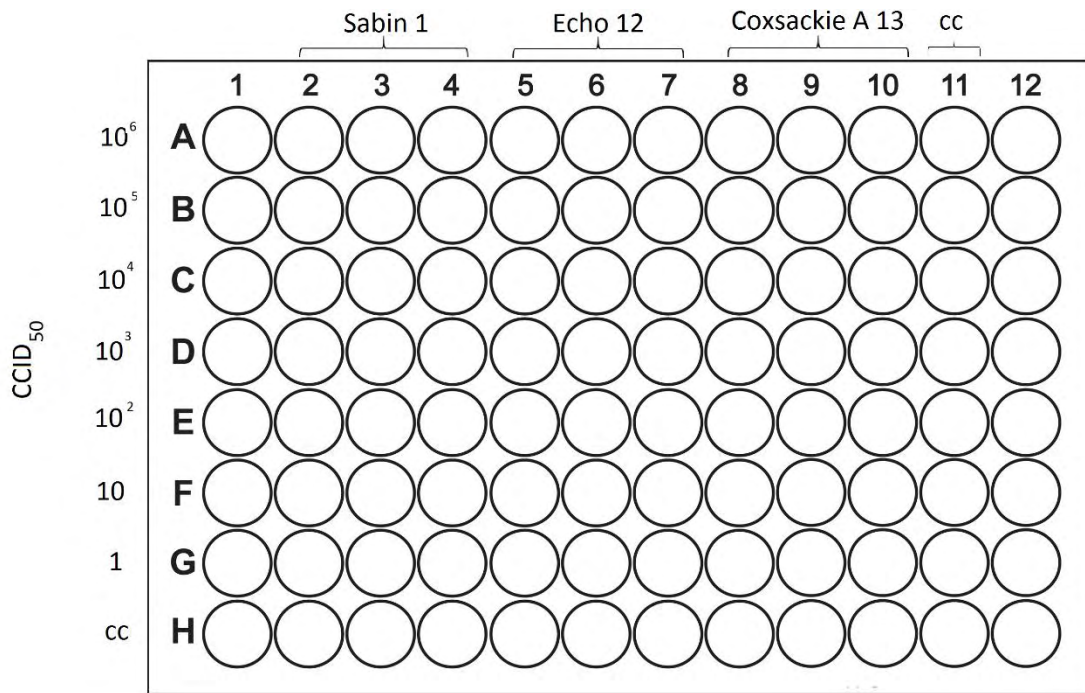
Η αρχική συγκέντρωση του ιού είναι άγνωστη. Για τον προσδιορισμό της, πραγματοποιούνται διαδοχικές αραιώσεις του περιεχομένου της φιάλης από 10^{-1} έως 10^{-8} , και στη συνέχεια πραγματοποιείται ενοφθαλμισμός σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων, η οποία τοποθετείται σε κλίβανο στους 37°C. Τα κύτταρα εξετάζονται καθημερινά για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, σύμφωνα και με τους αρνητικούς μάρτυρες. Όταν παρατηρηθεί

καταστροφή των κυττάρων μαρτύρων, γίνεται χρήση του τύπου για τον προσδιορισμό της αρχικής συγκέντρωσης του ιού σε CCID₅₀:

$$\text{LogCCID}_{50} = L-d (S-0.5)$$

Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε για τους ιούς Sabin 1 και Echo 12. Ο ιός Coxsackie A 13 δεν προκαλεί κυτταροπαθογόνο δράση στα κύτταρα Rd. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του, μολύνεται η πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιέργειας, πραγματοποιείται εκχύλιση του ιού και στη συνέχεια RT Real Time PCR. Ακολούθως, με τη χρήση πρότυπης καμπύλης γνωστών συγκεντρώσεων σε CCID₅₀ από το στέλεχος Sabin 1, πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του ιού.

Με γνωστή πλέον τη συγκέντρωση των ιικών στελεχών, πραγματοποιούνται αραιώσεις από 10⁶ έως 1 CCID₅₀, οι οποίες ενοφθαλμίζονται σε νέα πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων, η οποία τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C και εξετάζεται καθημερινά για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος.



Εικόνα 3-1 : Πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων όπου πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός των γνωστών αραιώσεων των ιών Sabin 1, Echo 12 και Coxsackie A 13. cc : αρνητικοί μάρτυρες

Η Εικόνα 3-1 παρουσιάζει την πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων. Οι στήλες 2, 3 και 4 ενοφθαλμίστηκαν με 100 μl του ιού Sabin 1, σε συγκεντρώσεις $CCID_{50}$ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 και 1 στις σειρές A, B, C, D, E, F, και G αντίστοιχα. Οι στήλες 5, 6 και 7 ενοφθαλμίστηκαν με 100 μl του ιού Echo 12 και οι στήλες 8, 9 και 10 με 100μl του ιού Coxsackie A 13. Οι στήλες 11 και 12, όπως και η σειρά H χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

3.3 Εκχύλιση του RNA

Η εκχύλιση του RNA έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης GuSCN [Casas I et al (1995)]. Αρχικά, σε σωληνάριο Eppendorf των 2 ml τοποθετήθηκαν 10 μl γλυκογόνου, 300 μl διαλύματος GuSCN και τέλος 100 μl δείγματος από την κυτταροκαλλιέργεια. Στη συνέχεια έγινε ανακίνηση σε vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Ακολούθως προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°), έγινε

ανακίνηση με vortex και το σωληνάριο τοποθετήθηκε σε πάγο για 20 λεπτά. Μετά την επώαση, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 14.000 rcf και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Στη συνέχεια προστέθηκαν 500 µl παγωμένης αιθανόλης 70%, το ίζημα επαναδιαλύθηκε και έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000 rcf. Ακολούθως, το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 µl απεσταγμένου νερού (ddH₂O). Το RNA των δειγμάτων αποθηκεύτηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.4 Αντίστροφη Μεταγραφή (RT)

Το γενετικό υλικό των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Επομένως, είναι απαραίτητη η μετατροπή του RNA σε cDNA μέσω της διαδικασίας της αντίστροφης μεταγραφής, πριν την εφαρμογή της Real Time PCR.

Αρχικά ετοιμάστηκε μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1µl random primers N10 (100 pmol/µl), 1µl 40 mM dNTPs και 5µl ddH₂O. Σε eppendorf των 500 µl προστέθηκαν 7µl/tube του παραπάνω μίγματος και 5 µl RNA (από κάθε δείγμα). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή. Αμέσως μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετήθηκαν σε πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα, το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 4µl 5X First strand Buffer, 2µl 0,1 MDTT, 0,5µl RNaseout 40units/µl, 0,5µlIM-MLV (Invitrogen) 200units/µl και 1µl ddH₂O. Αφού προστέθηκαν 8µl του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και στη συνέχεια ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: στους 25°C για 10 λεπτά, στους 37°C για 50 λεπτά και τέλος στους 70°C για 15 λεπτά.

3.5 Real Time PCR

Η Real Time PCR είναι μία μοριακή μέθοδος, η οποία βασίζεται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Με τη χρήση PCR, συγκεκριμένες αλληλουχίες σε ένα DNA υπόστρωμα ενισχύονται έως δισεκατομμύρια φορές. Στην PCR η ανίχνευση των ενισχυμένων αλληλουχιών πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης μετά τον τελευταίο PCR κύκλο. Στην Real Time PCR, τα προϊόντα της PCR μετρούνται σε κάθε κύκλο. Παρακολουθώντας την αντίδραση κατά τη φάση της εκθετικής ενίσχυσης, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η αρχική ποσότητα του στόχου με μεγάλη ακρίβεια. Στη Real Time PCR, η ποσότητα του DNA μετράται μέσω φθορίζοντων χρωστικών, οι οποίες αυξάνουν την απόδοση του φθορίζοντος σήματος σε άμεση αναλογία με τον αριθμό των μορίων του προϊόντος που παράγονται.

Η αντίδραση της Real Time PCR γίνεται σε σωληνάρια erpendorf των 200 μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθεται σε κάθε σωληνάριο 17 μl. Αυτά τα 17 μl αποτελούνται από 0,1 μl από τον καθένα από τους εκκινητές ENV1 και ENV2 (5 pmol/μl), 6,8 μl H₂O ελεύθερου νουκλεασών και 10μl 2X MasterMix SYBR Select (Thermo Fisher Scientific). Στη συνέχεια σε κάθε μικροσωληνάριο προστίθενται 3 μl cDNA αντίστοιχο του κάθε διαφορετικού δείγματος.

Στη συνέχεια τα σωληνάρια τοποθετούνται σε συσκευή MxPro 3005P στις εξής συνθήκες:

- Για έναν κύκλο, για 2 λεπτά στους 50°C, όπου γίνεται η ενεργοποίηση του UGG και στη συνέχεια για 2 λεπτά στους 95°C, όπου γίνεται η αρχική αποδιάταξη των κλώνων.
- Για 40 κύκλους, για 15 δευτερόλεπτα στους 95°C, όπου γίνεται η αποδιάταξη των νεοσυντιθέμενων κλώνων και για 1 λεπτό στους 60°C, όπου γίνεται η υβριδοποίηση των εκκινητών και η επιμήκυνση.
- Στους 55°C-95°C, όπου γίνεται η δημιουργία του Dissociation Curve.

3.6 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Ειδικότερα, 0,8 gr αγαρόζης και 30 ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμιγνύονται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου ένα λεπτό, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει και, όταν αυτό φτάσει σε θερμοκρασία περίπου 40°C, προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης ώστε να πήξει.

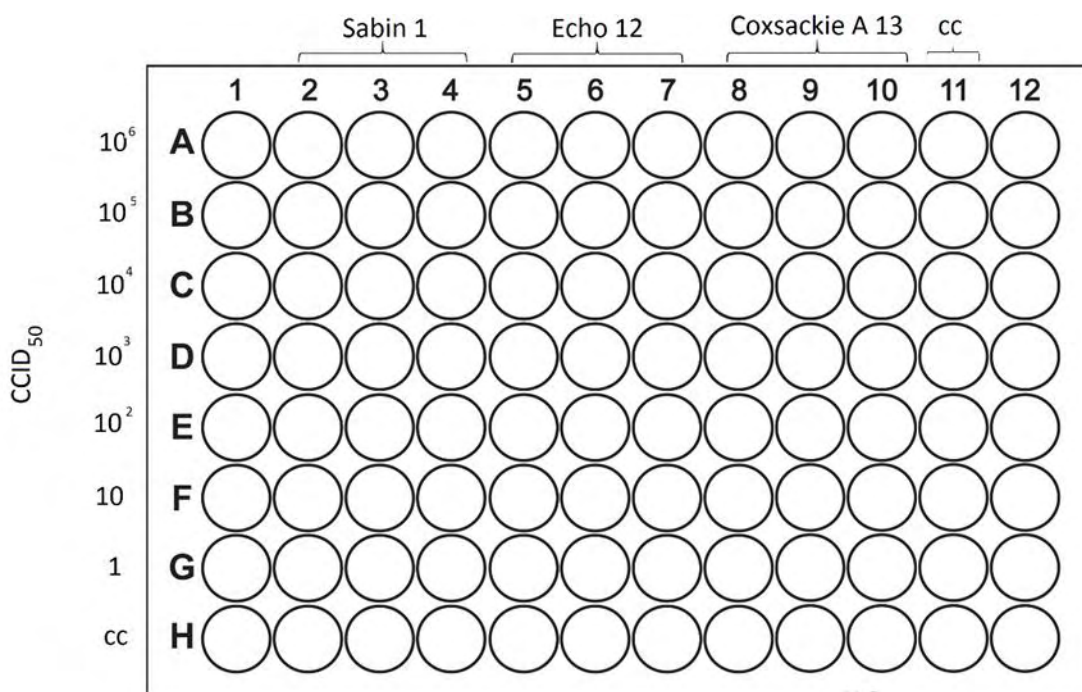
Αφού το πήκτωμα σταθεροποιηθεί, 10 μl από κάθε προϊόν αναμιγνύονται με 2μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα

μοριακού βάρους. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιείται ο 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts για περίπου 30 λεπτά. Τέλος, το πήκτωμα αгарόζης τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne) και στη συνέχεια φωτογραφίζεται.

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα CPE των ιών Sabin 1, Echo 12 και Coxsackie A 13

Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ιικών στελεχών, πραγματοποιούνται αραιώσεις από 10^6 έως 1 CCID₅₀, οι οποίες ενοφθαλμίζονται σε πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων, η οποία τοποθετείται στον κλίβανο στους 37°C και εξετάζεται καθημερινά για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος.



Εικόνα 4-1 : Πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων όπου πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός των γνωστών αραιώσεων των ιών Sabin 1, Echo 12 και Coxsackie A 13. cc: αρνητικοί μάρτυρες

Η Εικόνα 4-1 παρουσιάζει την πλάκα μικροπιλοποίησης 96 θέσεων. Οι στήλες 2, 3 και 4 ενοφθαλμίστηκαν με 100 μl του ιού Sabin 1, σε συγκεντρώσεις CCID₅₀ 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 και 1 στις σειρές A, B, C, D, E, F, και G αντίστοιχα. Οι στήλες 5, 6 και 7 ενοφθαλμίστηκαν με 100 μl του ιού

Echo 12 και οι στήλες 8, 9 και 10 με 100μl του ιού Coxsackie A 13. Οι στήλες 11 και 12, όπως και η σειρά H χρησίμευσαν ως αρνητικοί μάρτυρες.

Η πλάκα επωάστηκε στους 37°C. Η μικροσκοπική εξέταση έδωσε τα εξής αποτελέσματα:

Sabin 1:

- Την πρώτη ημέρα, εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10⁶, CPE 3⁺ στη συγκέντρωση 10⁵, και CPE 1⁺ στη συγκέντρωση 10⁴.
- Τη δεύτερη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10⁵, CPE 4⁺ στη συγκέντρωση 10⁴ και CPE 3⁺ στη συγκέντρωση 10³.
- Την τρίτη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στις συγκεντρώσεις CCID₅₀ 10³ και 10² και CPE 3⁺ στη συγκέντρωση 10.
- Την τέταρτη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10.
- Την πέμπτη ημέρα εμφάνιση CPE 1⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 1.

Echo 12:

- Την πρώτη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στις συγκεντρώσεις CCID₅₀ 10⁶ και 10⁵, CPE 3⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10⁴ και CPE 2⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10³.
- Τη δεύτερη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10⁴, CPE 3⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10³, CPE 2⁺

στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10² και CPE 1⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10.

- Την τρίτη ημέρα, εμφάνιση CPE 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10³, CPE 4⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10², CPE 2⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 10 και CPE 2⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 1.
- Την τέταρτη ημέρα, εμφάνιση CPE 2⁺ στην συγκέντρωση CCID₅₀ 10 και CPE 2⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 1.
- Την πέμπτη ημέρα, εμφάνιση CPE 3⁺ στην συγκέντρωση CCID₅₀ 10 και CPE 2⁺ στη συγκέντρωση CCID₅₀ 1.

Για τον ιό Coxsackie A 13, δεν παρατηρήθηκε κυτταροπαθολογικός δράση (CPE) σε καμία από τις συγκεντρώσεις του ιού.

Οι συγκεντρώσεις των ιών τις οποίες επιλέξαμε να ανιχνεύσουμε με τη μέθοδο της Real Time PCR είναι οι 10⁶ και 1 CCID₅₀.

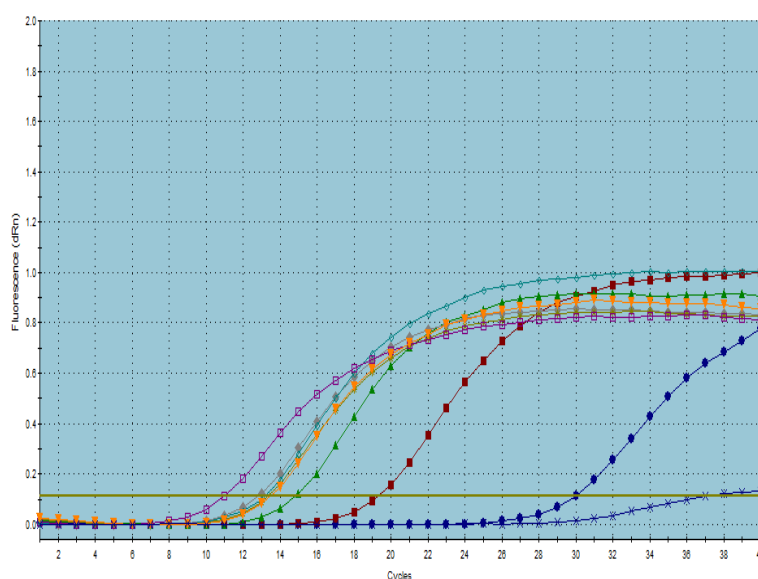
4.2 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Sabin 1 10⁶

Στέλεχος Sabin 1 10 ⁶	
1 ^η ημέρα	CPE 4 ⁺

Πίνακας 4-1 : Εμφάνιση CPE σε κύτταρα Rd μετά από ενοφθαλμισμό των κυττάρων με τον ιό Sabin 1 10⁶

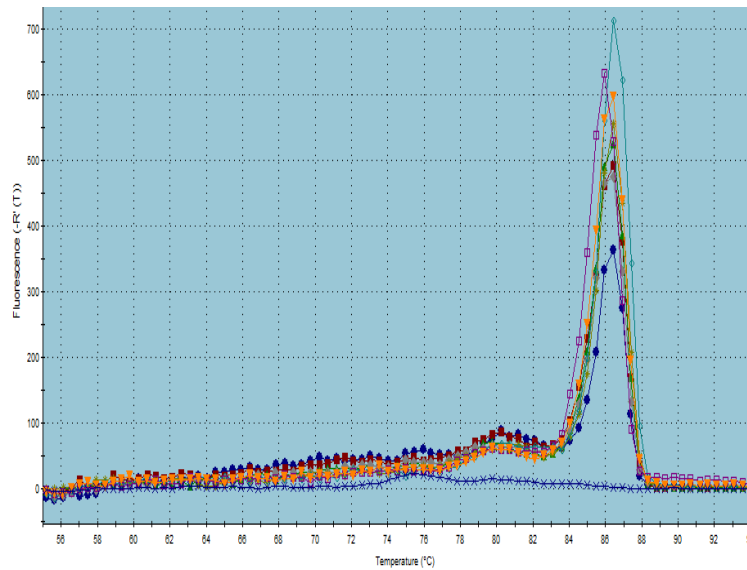
Μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού Sabin 1 10⁶ στην πλάκα μικροπιλοποίησης, αυτή επωάζεται σε κλίβανο στους 37°C και στη συνέχεια εξετάζεται για εμφάνιση CPE. Ο ιός Sabin 1 10⁶ προκαλεί εμφάνιση CPE 4⁺ μετά από 1 ημέρα. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-2, σύμφωνα με τα οποία παρατηρούμε αύξηση της ποσότητας του ιού στα κύτταρα μέχρι τις 24h και στη συνέχεια μείωση της ποσότητας του ιού στις 48h. Αυτό συμβαίνει διότι στις 48h έχει επέλθει λύση των κυττάρων και μια ποσότητα του ιού έχει εξέλθει από τα κύτταρα.

Εικόνα 4-2 : Κινητική μελέτη ανίχνευσης του ιού Sabin 1 10⁶. Ο ιός Sabin 1 10⁶ ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες. Οι καμπύλες των 8h, 10h και 12h συμπίπτουν, υποδεικνύοντας ότι η ποσότητα του ιού στα κύτταρα παραμένει η ίδια στις ώρες αυτές. Στις 48h ο κύκλος θετικοποίησης αυξάνεται, υποδεικνύοντας μείωση στην ποσότητα του ιού.

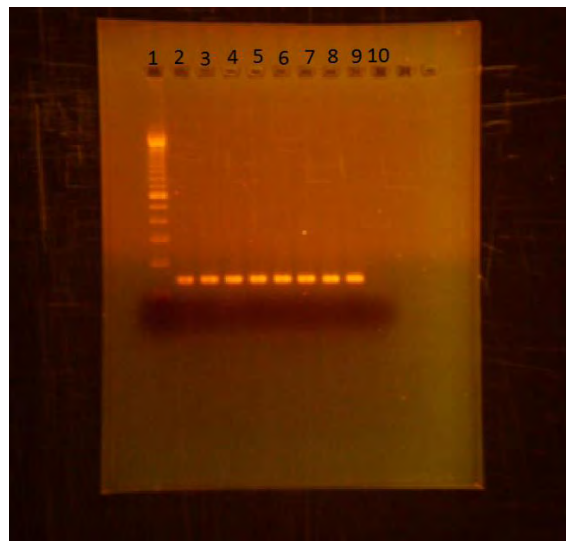


ΧΡΩΜΑ	cDNA
Έντονο Μπλε	Sabin 1 [10 ⁶] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [10 ⁶] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [10 ⁶] 6h
Γκρι	Sabin 1 [10 ⁶] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [10 ⁶] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [10 ⁶] 12h
Φούξια	Sabin 1 [10 ⁶] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [10 ⁶] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4-2 : Αντιστοίχιση των χρωμάτων στις καμπύλες των amplification plot με τις απομονώσεις του ιού Sabin 1 10⁶.



Εικόνα 4-3 : Dissociation Curve του ιού Sabin 1 10^6 που υποδηλώνει την εξειδίκευση των προϊόντων της Real Time PCR. T_m 86.4°C



Εικόνα 4-4 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. 1) Ladder 100 bp, 2) Sabin 1 10^6 2h, 3) 4h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h, 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνουν την ανίχνευση του ιού σε όλες τις ώρες. Προϊόν στις 147 bp.

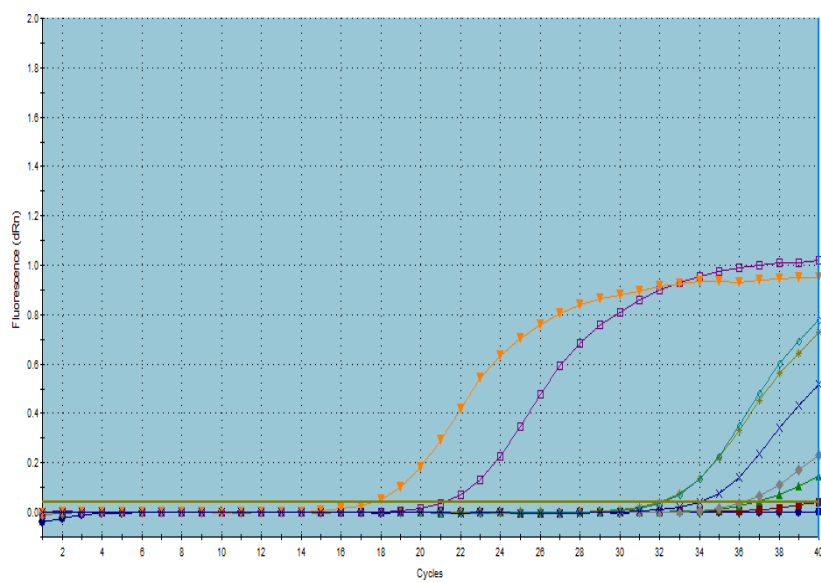
4.3 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Sabin 1 [1]

Στέλεχος Sabin 1 [1]	
1 ^η ημέρα	όχι CPE
2 ^η ημέρα	όχι CPE
3 ^η ημέρα	όχι CPE
4 ^η ημέρα	όχι CPE
5 ^η ημέρα	CPE 1+

Πίνακας 4-3 : Εμφάνιση CPE σε κύτταρα Rd μετά από ενοφθαλισμό των κυττάρων με τον ιό Sabin 1 [1].

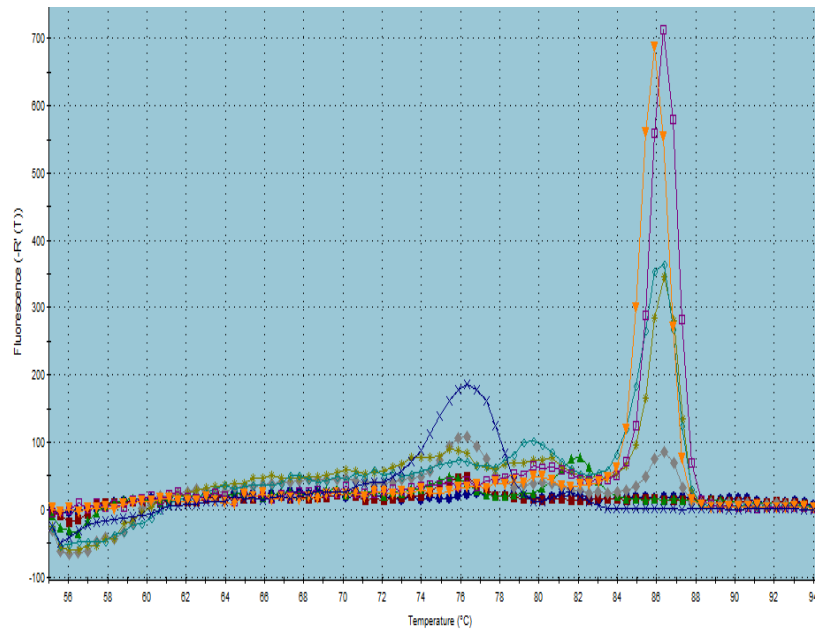
Μετά τον ενοφθαλισμό του ιού Sabin 1 [1] στην πλάκα μικροπιλοποίησης, αυτή επωάζεται στους 37°C και στη συνέχεια εξετάζεται για εμφάνιση CPE. Ο ιός Sabin 1 [1] δεν προκαλεί εμφάνιση CPE στα κύτταρα τις πρώτες τέσσερις ημέρες, όμως προκαλεί εμφάνιση CPE 1+ την πέμπτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, τα οποία παρουσιάζονται στην Εικόνα 4-5, σύμφωνα με τα οποία η ποσότητα του ιού στα κύτταρα συνεχίζει να αυξάνεται μέχρι τις 48h.

Εικόνα 4-5 : Κινητική μελέτη ανίχνευσης του ιού Sabin 1 [1]. Οι απομονώσεις στις οποίες ανιχνεύεται ο ιός είναι οι 10h, 12h, 24h και 48h. Οι καμπύλες των 10h και 12h συμπίπτουν, υποδεικνύοντας ότι η ποσότητα του ιού παραμένει η ίδια στις ώρες αυτές, ενώ στις 24h παρατηρείται μεγάλη μείωση στον κύκλο θετικοποίησης και επομένως μεγάλη αύξηση στη συγκέντρωση του ιού.

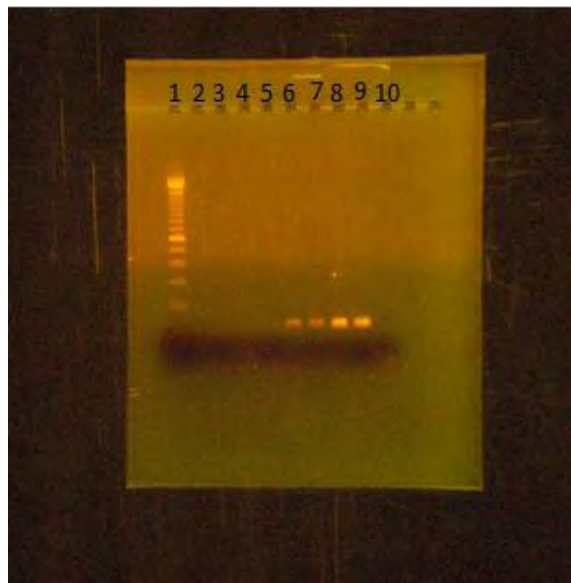


ΧΡΩΜΑ	cDNA
Έντονο Μπλε	Sabin 1 [1] 2h
Κόκκινο	Sabin 1 [1] 4h
Πράσινο	Sabin 1 [1] 6h
Γκρι	Sabin 1 [1] 8h
Χρυσό	Sabin 1 [1] 10h
Γαλάζιο	Sabin 1 [1] 12h
Φούξια	Sabin 1 [1] 24h
Κίτρινο	Sabin 1 [1] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4-4 : Αντιστοίχιση των χρωμάτων στις καμπύλες του amplification plot με τις απομονώσεις του ιού Sabin 1 [1].



Εικόνα 4-6 : Dissociation Curve που υποδηλώνει την εξειδίκευση των προϊόντων της Real Time PCR. Tm 86.4° C. Το peak με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει τα διμερή των εκκινητών. Tm 76.4° C.



Εικόνα 4-7 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. 1) Ladder 100 bp, 2) Sabin 1 [1] 2h, 3) 4h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, ο ιός ανιχνεύεται στις 10h, 12h, 24h και 48h, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα του amplification plot. Προϊόν στις 147 bp.

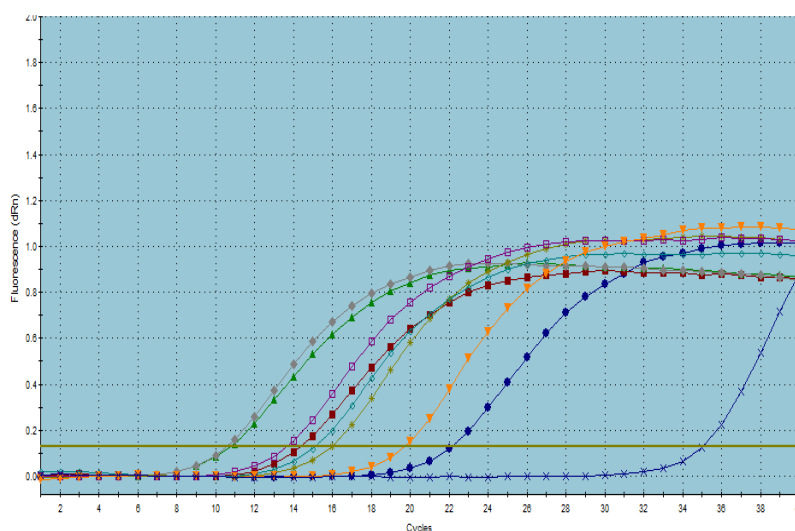
4.4 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Echo 12 10⁶

Στέλεχος Echo 12 10 ⁶	
1 ^η ημέρα	CPE 4 ⁺

Πίνακας 4-5 : Εμφάνιση CPE σε κύτταρα Rd μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με τον ιό Echo 12 10⁶.

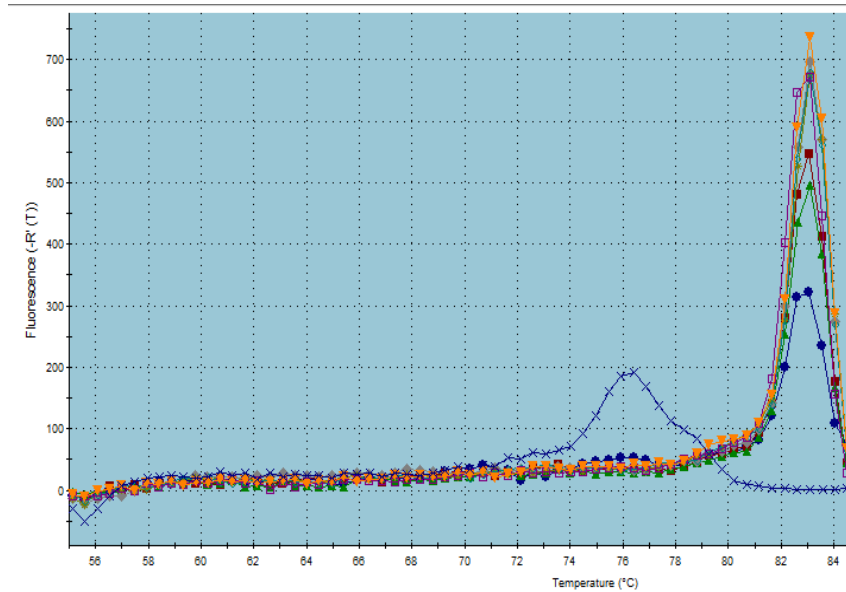
Μετά τον ενοφθαλμισμό της πλάκας μικροτιτλοποίησης με τον ιό Echo 12 10⁶, η πλάκα επωάζεται στον κλίβανο στους 37°C και στη συνέχεια εξετάζεται για εμφάνιση CPE. Ο ιός Echo 12 10⁶ προκαλεί εμφάνιση CPE 4⁺ μετά από μία ημέρα. Το γεγονός αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4-8, σύμφωνα με τα οποία ο ιός ανιχνεύεται από τις 2h και η ποσότητα του αυξάνεται μέχρι τις 8h, ενώ αρχίζει να μειώνεται από τις 10h. Αυτό αιτιολογείται καθώς στις 10h έχει επέλθει λύση των κυττάρων και ο ιός αρχίζει να εξέρχεται από τα κύτταρα.

Εικόνα 4-8 : Κινητική μελέτη ανίχνευσης του ιού Echo 12 10⁶. Ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες. Η ποσότητα του ιού αυξάνεται μέχρι τις 8h. Από τις 10h η ποσότητα του ιού αρχίζει να μειώνεται, όπως φαίνεται από την αύξηση του κύκλου θετικοποίησης του ιού.

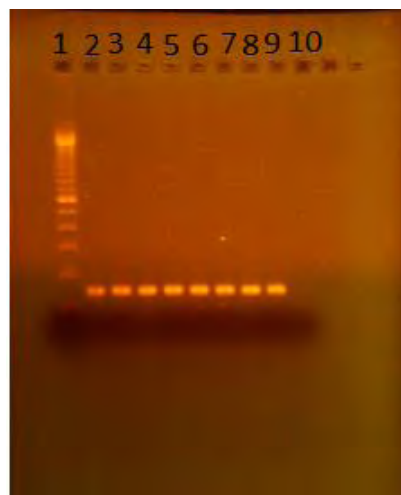


ΧΡΩΜΑ	cDNA
Έντονο Μπλε	Echo 12 [10 ⁶] 2h
Κόκκινο	Echo 12 [10 ⁶] 4h
Πράσινο	Echo 12 [10 ⁶] 6h
Γκρι	Echo 12 [10 ⁶] 8h
Χρυσό	Echo 12 [10 ⁶] 10h
Γαλάζιο	Echo 12 [10 ⁶] 12h
Φούξια	Echo 12 [10 ⁶] 24h
Κίτρινο	Echo 12 [10 ⁶] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4-6 : Αντιστοίχιση των χρωμάτων του amplification plot με τις απομονώσεις του ιού Echo 12 10⁶



Εικόνα 4-9 : Dissociation Curve που υποδηλώνει την εξειδίκευση των προϊόντων της Real Time PCR αντίδρασης. Tm 86.4° C. Το peak με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει τα διμερή των εκκινητών. Tm 76.4° C.



Εικόνα 4-10 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. 1) Ladder 100 bp, 2) Echo 12 10⁶ 2h, 3) 4h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h, 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Προϊόν στις 147 bp. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα του amplification plot.

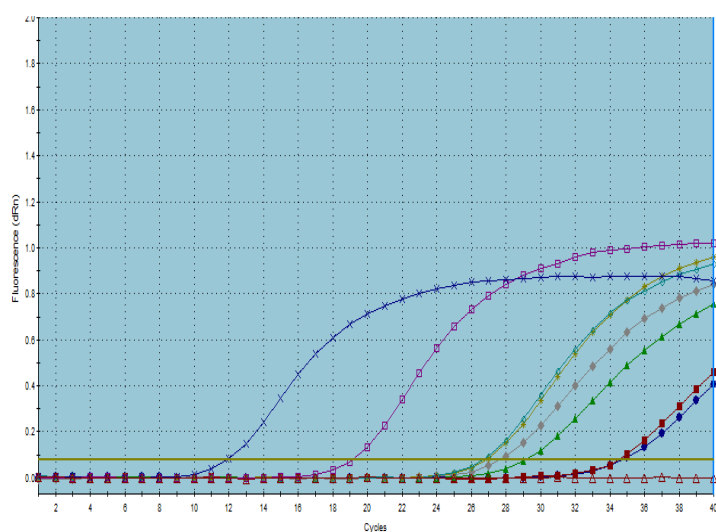
4.5 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Echo 12 [1]

Στέλεχος Echo 12 [1]	
1 ^η ημέρα	όχι CPE
2 ^η ημέρα	όχι CPE
3 ^η ημέρα	CPE 2+
4 ^η ημέρα	CPE 2+
5 ^η ημέρα	CPE 2+

Πίνακας 4-7 : Εμφάνιση CPE σε κύτταρα Rd μετά τον ενοφθαλμισμό των κυττάρων με τον ιό Echo 12 [1].

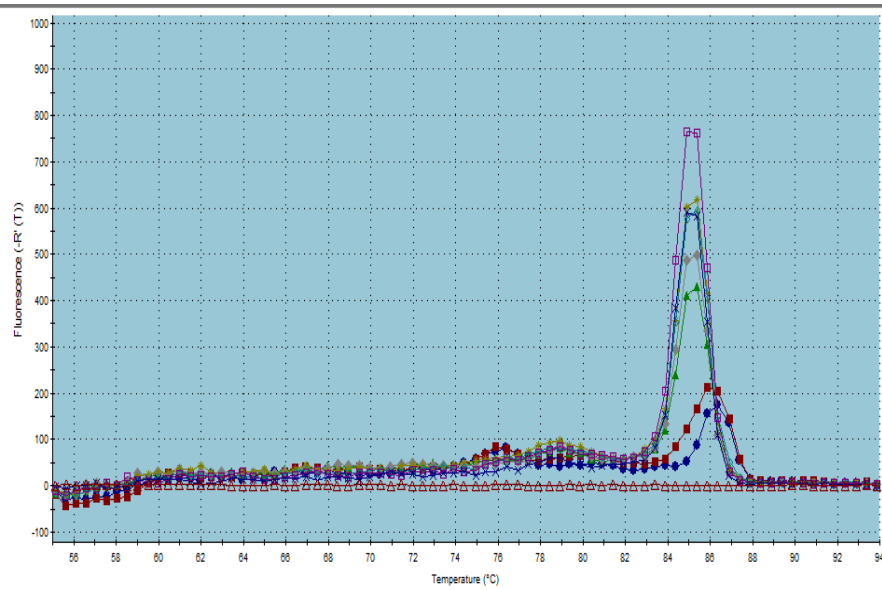
Μετά τον ενοφθαλμισμό της πλάκας μικροπιλοποίησης με τον ιό Echo 12 [1], ακολουθεί επώαση της πλάκας σε κλίβανο στους 37°C και στη συνέχεια εξέταση της για εμφάνιση CPE. Ο ιός Echo 12 [1] δεν προκάλεσε εμφάνιση CPE την πρώτη και δεύτερη ημέρα, όμως προκάλεσε εμφάνιση CPE 2⁺ την τρίτη ημέρα, η οποία παρέμεινε έως την πέμπτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4-11, σύμφωνα με τα οποία ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες.

Εικόνα 4-11 : Κινητική μελέτη ανίχνευσης του ιού Echo 12 [1]. Ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες.

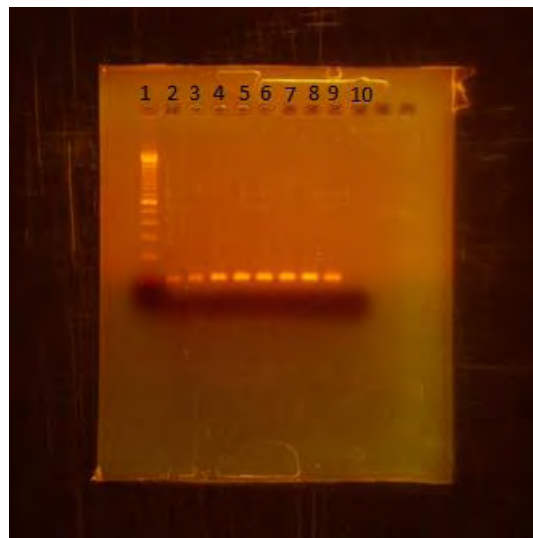


ΧΡΩΜΑ	cDNA
Έντονο Μπλε	Echo 12 [1] 2h
Κόκκινο	Echo 12 [1] 4h
Πράσινο	Echo12 [1] 6h
Γκρι	Echo 12 [1] 8h
Χρυσό	Echo 12 [1] 10h
Γαλάζιο	Echo 12 [1] 12h
Φούξια	Echo 12 [1] 24h
Κίτρινο	Echo 12 [1] 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4-8 : Αντιστοίχιση των χρωμάτων του amplification plot με τις απομονώσεις του ιού Echo 12 [1]



Εικόνα 4-12 : Dissociation Curve του ιού Echo 12 [1] που υποδηλώνει την εξειδίκευση των προϊόντων της Real Time PCR. Tm 86.4°C.



Εικόνα 4-13 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR του ιού Echo 12 [1]. 1) Ladder 100 bp, 2) Echo 12 [1] 2h, 3) 4h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h, 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες, γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα του amplification plot. Προϊόν στις 147 bp.

4.6 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Coxsackie A 13

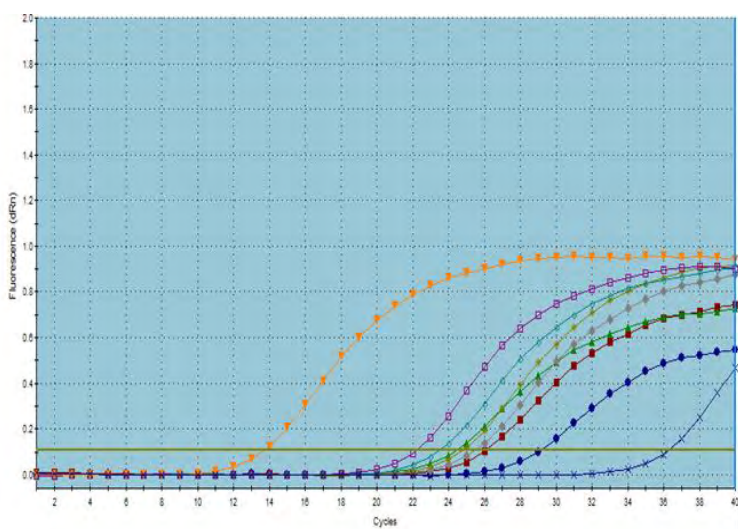
10^6

Στέλεχος Coxsackie A 13	
1 ^η ημέρα	όχι CPE
2 ^η ημέρα	όχι CPE
3 ^η ημέρα	όχι CPE
4 ^η ημέρα	όχι CPE
5 ^η ημέρα	όχι CPE

Πίνακας 4-9 : Παρατήρηση CPE σε κύτταρα Rd μετά τον ενοφθαλισμό των κυττάρων με τον ιό Coxsackie A 13 10^6 . Τα κύτταρα Rd δεν εμφανίζουν CPE μέχρι και την εμφάνιση αλλοιώσεων στους αρνητικούς μάρτυρες.

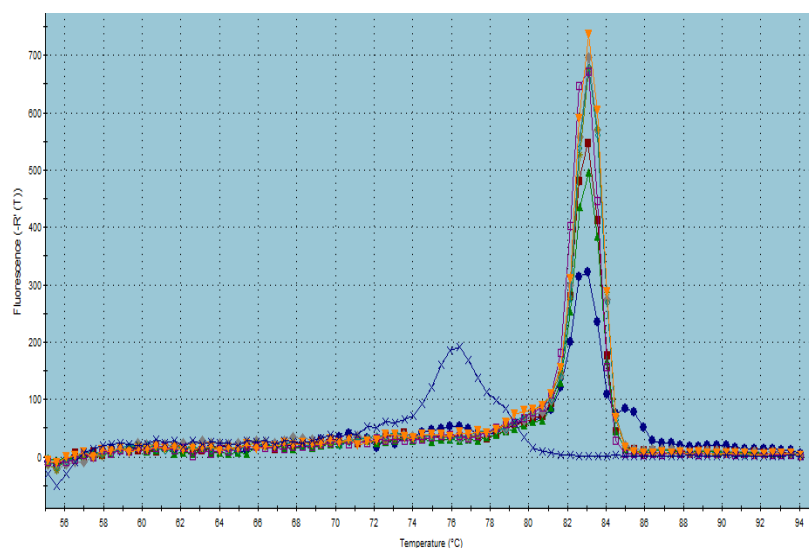
Μετά τον ενοφθαλισμό της πλάκας μικροτιλοποίησης με τον ιό Coxsackie A 13 10^6 , η πλάκα επωάζεται σε κλίβανο στους 37°C και στη συνέχεια εξετάζεται για εμφάνιση CPE. Ο ιός Coxsackie A 13 10^6 δεν προκαλεί εμφάνιση CPE σε καμία από τις ημέρες μέχρι την εμφάνιση αλλοιώσεων στους αρνητικούς μάρτυρες. Ωστόσο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 4-14, τα αποτελέσματα της Real Time PCR δείχνουν την ύπαρξη του ιού στα κύτταρα και την αύξηση της συγκέντρωσης του από τις 2h έως και τις 48h.

Εικόνα 4-14 : Κινητική μελέτη ανίχνευσης του ιού Coxsackie A 13 10^6 . Ο ιός εντοπίζεται σε όλες τις ώρες. Η ποσότητα του ιού αυξάνεται από τις 2h έως τις 48h

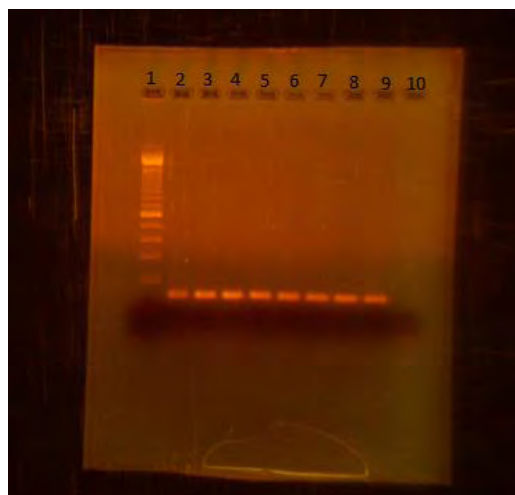


ΧΡΩΜΑ	cDNA
Έντονο Μπλε	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 2h
Κόκκινο	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 4h
Πράσινο	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 6h
Γκρι	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 8h
Χρυσό	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 10h
Γαλάζιο	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 12h
Φούξια	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 24h
Κίτρινο	Coxsackie A 13 $[10^6]$ 48h
Μπλε	ddH ₂ O

Πίνακας 4-10 : Αντιστοίχιση των χρωμάτων του amplification plot με τις απομονώσεις του ιού Coxsackie A 13 10^6



Εικόνα 4-15 : Dissociation Curve του ιού Coxsackie A $13 \cdot 10^6$ που υποδηλώνει την εξειδίκευση των προϊόντων της Real Time PCR. T_m 86.4° C. Το peak με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει διμερή εκκινητών. T_m 76.4°C.



Εικόνα 4-16 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. 1) Ladder 100bp, 2) Coxsackie A $13 \cdot 10^6$ 2h, 34h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h, 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης συμφωνούν με τα αποτελέσματα του amplification plot, καθώς παρατηρείται η ανίχνευση του ιού σε όλες τις ώρες. Προϊόν στις 147 bp.

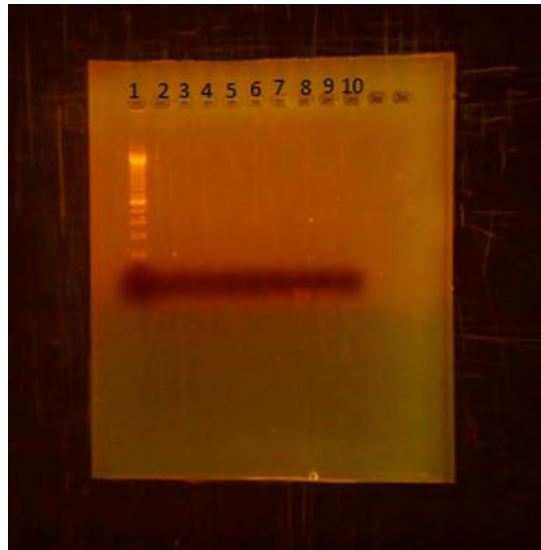
4.7 Αποτελέσματα CPE και Real Time PCR για τον ιό Coxsackie A 13

[1]

Στέλεχος Coxsackie A 13 [1]	
1 ^η ημέρα	όχι CPE
2 ^η ημέρα	όχι CPE
3 ^η ημέρα	όχι CPE
4 ^η ημέρα	όχι CPE
5 ^η ημέρα	όχι CPE

Πίνακας 4-11 : Παρατήρηση CPE σε κύτταρα Rd μετά τον ενοφθαλισμό των κυττάρων με τον ιό Coxsackie A 13 [1]. Τα κύτταρα Rd δεν εμφανίζουν CPE μέχρι και την εμφάνιση αλλοιώσεων στους αρνητικούς

Μετά τον ενοφθαλισμό του ιού Coxsackie A 13 [1] στην πλάκα μικροτιλοποίησης, η πλάκα επωάζεται στον κλίβανο στους 37°C και ακολούθως εξετάζεται για εμφάνιση CPE. Ο ιός Coxsackie A 13 [1] δεν προκαλεί εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd μέχρι και την εμφάνιση αλλοιώσεων στους αρνητικούς μάρτυρες. Από τα αποτελέσματα της Real Time PCR συμπεραίνουμε ότι κατά τη μόλυνση, ο χρόνος πριν την πλύση δεν επαρκεί ώστε ο ιός Coxsackie A 13 [1] να εισέλθει στα κύτταρα και απομακρύνεται κατά την πλύση. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, τα οποία φαίνονται στην Εικόνα 4-17, όπου δεν παρατηρείται ανίχνευση του ιού σε καμία από τις ώρες.



Εικόνα 4-17 : Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. 1) Ladder 100 bp
2) Coxsackie A 13 [1] 2h, 3) 4h, 4) 6h, 5) 8h, 6) 10h, 7) 12h, 8) 24h, 9) 48h, 10) ddH₂O. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνουν την απουσία του ιού Coxsackie A 13 [1] από τα κύτταρα, καθώς ο ιός δεν εντοπίζεται σε καμία από τις ώρες.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η οικογένεια Picornaviridae αποτελείται από ιούς χωρίς λιπιδικό έλυτρο, οι οποίοι διαθέτουν μονόκλωνο RNA γονιδίωμα θετικής πολικότητας. Τα σωματίδια των ιών είναι σφαιρικά, με διάμετρο περίπου 30 nm, και διαθέτουν πρωτεϊνικό καψίδιο το οποίο περιβάλλει το RNA γονιδίωμα. Το γονιδίωμα των picorna ιών περιλαμβάνει: την 5'-αμετάφραστη περιοχή, η οποία περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES), ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο κωδικοποιεί τις ιικές πρωτεΐνες, την 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά.

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια Picornaviridae και περιλαμβάνει δεκατρία είδη. Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ταξινομούνται σε τέσσερα είδη: Enterovirus A (EV-A), EV-B, EV-C και EV-D.

Οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι πολύ συχνές και οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές, όμως μπορεί να γίνουν σοβαρές και επικίνδυνες για τη ζωή [Pallansch MA et al (2013)]. Οι εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με ένα μεγάλο εύρος κλινικών εκδηλώσεων, όπως άσηπτη μηνιγγίτιδα, μυοκαρδίτιδα και άλλες νόσους. Το γεγονός αυτό καθιστά σημαντική τη διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η οποία αποδεικνύεται συχνά δύσκολη και περίπλοκη. Η δυσκολία της διάγνωσης οφείλεται στις πολύ συχνές ασυμπτωματικές λοιμώξεις εντεροϊών οι οποίες παρατηρούνται σε υγιείς ανθρώπους και επίσης στη μη ειδικότητα των συμπτωμάτων των λοιμώξεων των εντεροϊών, όταν οι λοιμώξεις αυτές οδηγούν στην εμφάνιση ασθενειών.

Η χρήση κυτταροκαλλιέργειας έχει υπάρξει η κύρια μέθοδος για την ανίχνευση ιών στο εργαστήριο, καθώς παρέχει μεγάλο αριθμό κυττάρων

κατάλληλων για την απομόνωση των ιών και προσφέρει τη δυνατότητα μικροσκοπικής εξέτασης για την απόδειξη του πολλαπλασιασμού των ιών [Freshney RI (2000)]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για τον εντοπισμό ιών, όπως μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης των ιικών νουκλεϊκών οξέων. Ωστόσο, η χρήση κυτταροκαλλιέργειας παραμένει το μέτρο σύγκρισης για όλες τις νέες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί [Hsiung G D (1984)].

Η μέθοδος της κυτταροκαλλιέργειας έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση των εντεροϊών, καθώς ένα από τα διακεκριμένα χαρακτηριστικά τους είναι η κυτταρολυτική φύση της ανάπτυξης σε κυτταροκαλλιέργεια. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, η μόλυνση συνήθως εκδηλώνεται σε 1 με 7 ημέρες με την εμφάνιση χαρακτηριστικού κυτταροπαθογόνου αποτελέσματος, το οποίο περιλαμβάνει ορατό στρογγύλεμα, συρρίκνωση, πυρηνική πύκνωση και κυτταρικό εκφυλισμό. Οι πρώιμες επιπτώσεις γίνονται ορατές σε λιγότερο από 24 ώρες εάν το ενοφθάλμισμα περιέχει πολλά μολυσματικά σωματίδια. Με λιγότερα ιικά σωματίδια, όμως, οι ορατές μεταβολές δεν αναγνωρίζονται για αρκετές ημέρες, παρόλο που ένας επαρκής αριθμός κυτάρων μολύνονται. Επιπλέον, κάποιοι εντεροϊοί δεν προκαλούν καθόλου κυτταροπαθογόνες επιπτώσεις.

Οι περισσότεροι ορότυποι των εντεροϊών μπορούν να καλλιεργηθούν σε τουλάχιστον μια συνεχή κυτταροκαλλιέργεια ανθρώπου ή πιθήκου. Καμία κυτταρική σειρά, όμως, δε μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη όλων των καλλιεργήσιμων εντεροϊών.

Η Real Time PCR είναι μία μοριακή μέθοδος, η οποία βασίζεται στην Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Συγκεκριμένα, η Real Time PCR είναι ικανή να ανιχνεύει προϊόντα PCR

συγκεκριμένης αλληλουχίας, καθώς αυτά συσσωρεύονται σε πραγματικό χρόνο (“real time”) κατά τη διαδικασία της ενίσχυσης στην PCR. Καθώς παράγονται τα προϊόντα της PCR, η Real Time PCR ανιχνεύει τη συσσώρευσή τους και ποσοτικοποιεί τον αριθμό των αντιγράφων τα οποία υπήρχαν στο αρχικό μίγμα, πριν αρχίσει η ενίσχυση.

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η ανίχνευση εντεροϊών που προκαλούν ή δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε κύτταρα Rd μέσω της χρήσης κυτταροκαλλιέργειας και RT Real Time PCR. Τα στελέχη ιών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν: το στέλεχος Sabin 1, το οποίο ανήκει στο είδος Enterovirus C, το στέλεχος Echo 12, το οποίο ανήκει στο είδος Enterovirus B και το στέλεχος Coxsackie A 13 το οποίο ανήκει στο είδος Enterovirus C. Το στέλεχος Coxsackie A 13 έχει την ιδιαιτερότητα ότι δεν προκαλεί εμφάνιση CPE στην κυτταρική σειρά Rd. Η περιοχή που επιλέχθηκε για να μελετηθεί ήταν η 5'UTR γονιδιωματική περιοχή, η οποία είναι μία πολύ συντηρημένη περιοχή μεταξύ των εντεροϊών, η οποία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση και στην αντιγραφή του θετικής πολικότητας κλώνου RNA των εντεροϊών. Με την ενίσχυση αυτής της γονιδιωματικής περιοχής αυξάνονται οι πιθανότητες της καθολικής ανίχνευσης εντεροϊών. Η ενίσχυση της 5'UTR περιοχής δεν μπορεί από μόνη της να καθορίσει τις οροτυπικές διαφορές μεταξύ των εντεροϊών [Siafakas N et al (2004)].

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια των τριών στελεχών σε κύτταρα Rd και εξετάστηκε η εμφάνιση CPE, ώστε να προσδιοριστεί η αρχική συγκέντρωση των ιών. Στη συνέχεια, έπειτα από αραιώσεις, γνωστές πλέον συγκεντρώσεις των ιών ενοφθαλμίστηκαν σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική εξέταση των

κυττάρων για εμφάνιση CPE. Στη συνέχεια, το RNA των ιών εκχυλίστηκε [Casas I et al (1995)], και με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT) μετατράπηκε σε cDNA, ώστε να εφαρμοστεί η τεχνική της Real Time PCR. Τα αποτελέσματα ήταν τα ακόλουθα:

Μετά τον ενοφθαλμισμό της πλάκας μικροπιλοποίησης με τον ιό Sabin 1 10^6 και την επώασή της σε κλίβανο στους 37°C , πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική εξέταση για εμφάνιση CPE όπου διαπιστώθηκε ότι ο ιός προκάλεσε την εμφάνιση CPE 4+ μετά την πρώτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, σύμφωνα με τα οποία ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες (2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h). Συγκεκριμένα, η ποσότητα του ιού αυξάνεται από τις 2h έως τις 24h και στη συνέχεια μειώνεται στις 48h. Το γεγονός αυτό αιτιολογείται, καθώς τα κύτταρα εμφανίζουν CPE 4+ ήδη από τις 24h, επομένως στις 48h μια ποσότητα του ιού έχει εξέλθει από τα κύτταρα τα οποία έχουν υποστεί λύση και έχει ανέλθει στο υπερκείμενο. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνουν περαιτέρω την ανίχνευση του ιού σε όλες τις ώρες.

Όσον αφορά τον ιό Sabin 1 [1], μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στην πλάκα μικροπιλοποίησης και την επώασή της σε κλίβανο στους 37°C , πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική εξέταση όπου παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE 1+ κατά την πέμπτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, κατά τα οποία ο ιός ανιχνεύεται στις 10h, 12h, 24h και 48h. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνεται και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR. Η ποσότητα του ιού είναι σταθερή κατά τις 10h και 12h και αυξάνεται στις 24h και στις 48h.

Ο ιός Echo 12 10^6 ενοφθαλμίστηκε στην πλάκα μικροτιτλοποίησης, η οποία επωάστηκε σε κλίβανο στους 37°C και ακολούθως εξετάστηκε μικροσκοπικά για εμφάνιση CPE. Ο ιός Echo 12 10^6 προκάλεσε εμφάνιση CPE 4+ μετά την πρώτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, σύμφωνα με τα οποία ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες. Συγκεκριμένα, η ποσότητα του ιού αυξάνεται ως τις 8h και εν συνεχεία αρχίζει να μειώνεται από τις 10h. Το γεγονός αυτό αιτιολογείται καθώς, ο ιός προκαλεί CPE 4+ κατά την πρώτη ημέρα, και συνεπώς τα ιικά σωματίδια αρχίζουν να εξέρχονται από τα κύτταρα που έχουν υποστεί λύση. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης επιβεβαιώνουν περαιτέρω την ανίχνευση του ιού σε όλες τις ώρες.

Σχετικώς προς τον ιό Echo 12 [1], μετά τον ενοφθαλμισμό του ιού στην πλάκα μικροτιτλοποίησης και την επώασή της σε κλίβανο στους 37°C , ακολούθησε μικροσκοπική εξέταση για εμφάνιση CPE. Κατά την εξέταση αυτή δε διαπιστώθηκε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd κατά την πρώτη και δεύτερη ημέρα, όμως διαπιστώθηκε εμφάνιση CPE 2+ κατά την τρίτη ημέρα έως και την πέμπτη ημέρα. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με τα αποτελέσματα της Real Time PCR, σύμφωνα με τα οποία ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες, με την ποσότητά του ιού να αυξάνεται από τις 2h έως τις 48h. Επιπλέον, τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της Real Time PCR, σύμφωνα με τα οποία ο ιός εντοπίζεται σε όλες τις ώρες.

Όσον αφορά τον ιό Coxsackie A 13 10^6 , ο ιός ενοφθαλμίστηκε στην πλάκα μικροτιτλοποίησης η οποία επωάστηκε σε κλίβανο στους 37°C και στη συνέχεια εξετάστηκε μικροσκοπικά για εμφάνιση CPE. Κατά την εξέταση αυτή, δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE, λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση

των αρνητικών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα της Real Time PCR, ωστόσο, αποδεικνύουν την παρουσία του ιού Coxsackie A 13 στα κύτταρα, όπως επίσης και την αύξηση της συγκέντρωσης του από τις 2h έως τις 48h. Τα αποτελέσματα της Real Time PCR επιβεβαιώνονται και από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης, σύμφωνα με την οποία ο ιός ανιχνεύεται σε όλες τις ώρες. Η μη εμφάνιση CPE οφείλεται στην ιδιότητα του Coxsackie A 13 να μην προκαλεί εμφάνιση CPE στο συγκεκριμένο τύπο κυτταρικής σειράς.

Σχετικά με τον ιό Coxsackie A 13 [1], ο ιός ενοφθαλμίστηκε στην πλάκα μικροπιλοποίησης, η οποία επώαστηκε σε κλίβανο στους 37°C και ακολούθως εξετάστηκε μικροσκοπικά για εμφάνιση CPE. Κατά την εξέταση των κυττάρων, δεν παρατηρήθηκε εμφάνιση CPE, λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των αρνητικών μαρτύρων. Τα αποτελέσματα της Real Time PCR δείχνουν τη μη ύπαρξη του ιού στα κύτταρα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, σύμφωνα με τα οποία ο ιός δεν ανιχνεύεται σε καμία από τις ώρες. Η μη ύπαρξη του ιού Coxsackie A 13 [1] στα κύτταρα πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη μόλυνση των κυττάρων ο ιός δεν προλαβαίνει να εισέλθει στα κύτταρα και απομακρύνεται κατά την πλύση.

Συμπερασματικά, στην εργασία έγινε χρήση καλλιέργειας σε κυτταρική σειρά Rd και ακολούθως χρήση της μεθόδου Real Time PCR για τον εντοπισμό τριών στελεχών εντεροϊών. Παρατηρήθηκε πως ο ιός Sabin 1 10^6 προκάλεσε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd σε 24h, ενώ με τη μέθοδο της Real Time PCR ο ιός ανιχνεύτηκε στις 2h. Ο ιός Sabin 1 [1] προκάλεσε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd την πέμπτη ημέρα, ωστόσο με τη Real Time PCR

ανιχνεύτηκε η παρουσία του ιού στις 10h. Ο ιός Echo 12 10^6 προκάλεσε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd σε 24h, ενώ ανιχνεύτηκε με τη Real Time PCR σε 2h. Ο ιός Echo 12 [1] προκάλεσε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd την τρίτη ημέρα, όμως ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο Real Time PCR σε 2h. Ο ιός Coxsackie A 13 10^6 δεν προκάλεσε εμφάνιση CPE στα κύτταρα Rd, ωστόσο ανιχνεύτηκε με τη μέθοδο της Real Time PCR σε 2h. Τέλος, ο ιός Coxsackie A 13 [1] δεν εισήλθε στα κύτταρα, επομένως δεν ανιχνεύτηκε με καμία από τις δυο μεθόδους. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν ότι η μέθοδος της κυτταροκαλλιέργειας είναι αρκετά χρονοβόρα, ενώ απαιτείται μεγάλη συγκέντρωση των ιών στα κύτταρα ώστε να εμφανιστεί CPE. Επιπλέον, όπως παρατηρήθηκε από τον ιό Coxsackie A 13, δεν προκαλούν όλοι οι εντεροϊοί κυτταροπαθογόνο δράση σε κυτταρικές σειρές. Όταν είναι πιθανή η παρουσία εντεροϊού σε ένα δείγμα, χρειάζεται να ενοφθαλμιστούν πολλαπλές κυτταρικές σειρές για την ανίχνευσή του [Kok TW et al (1998)]. Αντιθέτως, η Real Time PCR είναι μία γρήγορη και ακριβής τεχνική, ικανή για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των εντεροϊών, ενώ η επιλογή κατάλληλων εκκινητών δίνει τη δυνατότητα επιλογής της εξειδίκευσης υποστρώματος. Επομένως, η σύγκριση των δυο μεθόδων οδηγεί στο συμπέρασμα πως η μέθοδος της Real Time PCR υπερτερεί της χρήσης κυτταροκαλλιέργειας για τον εντοπισμό εντεροϊών σε ταχύτητα και ακρίβεια, ενώ προσφέρει πολλές δυνατότητες για τον καλύτερο και πιο αποτελεσματικό εντοπισμό ιών στο εργαστήριο.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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. **Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses **2014**.Arch Virol. 159: 2831-2841.
3. **Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P. and Carstens, E.B.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses **2015**.Arch. Virol. 160: 1837-1850.
4. **Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Harrach, B., Harrison, R.L., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Mushegian, A.R., Nibert, M., Sabanadzovic, S., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Gorbalenya, A.E., Davison, A.J.** Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses **2016**.Arch Virol. 161: 2921-2949.
5. **Agol VI, Belov GA, Bienz K, et al.** Two types of death of poliovirus infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. Virology **1998**; 252(2):343–353.

6. **Airaksinen A.** The VP1 intracapsid hook and uncoating of enteroviruses. Publications of the National Public Health Institute, Helsinki, Finland **2000** p.11.
7. **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.
8. **Andino R, Rieckhof GE, Achacoso PL, et al.** Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J* **1993**; 12(9):3587–3598.
9. **Ansardi DC, Luo M, Morrow CD.** Mutations in the poliovirus P1 capsid precursor at arginine residues VP4-ARG34, VP3-ARG223, and VP1-ARG129 affect virus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Virology* **1994**; 199(1):20–34.
10. **Barton DJ, O'Donnell BJ, Flanagan JB.** 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J* **2001**; 20, 1439-1448
11. **Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, et al.** Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **1997**; 275(5304):1320–1323.
12. **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.
13. **Bodian D.** Some emerging concepts of poliomyelitis infection. *Science* **1955**; 122:105–108.

14. **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.
15. **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol* **1995**. Meth. 53:25-36.
16. **Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, et al.** Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0Å resolution. *Science* **1989**; 245:154-159.
17. **Cifuentes J, Lee H, Yoder J, L Shingler K, et al** Structures of the Procapsid and Mature Virion of Enterovirus 71 Strain 1095. *J. Virol* **2013**. 87.
18. **Chiou CC, Liu WT, Chen SJ, et al.** Coxsackievirus B1 infection in infants less than 2 months of age. *American Journal of Perinatology* **1998**; 15(3):155–159.
19. **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.
20. **Chow M, Newman JF, Filman D, et al.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **1987**; 327:482–486.
21. **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.

- 22. 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.
- 23. Coyne CB, Bergelson JM.** Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* **2006**; 124(1):119–131.
- 24. Dales S, Eggers HJ, Tamm I, et al.** Electron Microscopic Study of the Formation of Poliovirus. *Virology* **1965**; 26:379–389.
- 25. Dechkum N, Pangsawan Y, Jayavasud C, Saganwongse S.** Coxsackie B virus infection and myopericarditis in Thailand, 1987–1989. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*. **1998**; 29(2): 273–276.
- 26. De Jesus NH.** Epidemics to Eradication: the modern history of poliomyelitis. *Viol. J.* **2007**; 4 (1): 70
- 27. Drebot MA, Campbell JJ, Lee SH.** A genotypic characterization of enteroviral antigenic variants isolated in eastern Canada. *Virus Res* **1999**; 59:131-140.
- 28. Echeverri AC, Dasgupta A.** Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* **1995**; 208:540–553.
- 29. 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.
- 30. Feng Q, Langereis MA, van Kuppeveld F.** Induction and suppression of innate antiviral responses by picornaviruses. *Cytokine and Growth Factor Reviews* Volume 25, Issue 5, **2014**, p577-585.

- 31. 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.
- 32. 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.
- 33. Freshney, R I 2000.** Culture of animal cells, a manual of basic technique, 4th ed. Wiley-Liss, New York, NY.
- 34. 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.
- 35. Gamarnik AV, Andino R.** Switch from translation to RNA replication in a positivestranded RNA virus. *Genes Dev***1998**; 12:2293–2304.
- 36. Gelfand HM, Holguin AH, Marchetti GE, Feorino PM.** A continuing surveillance of enterovirus infections in healthy children in six United States cities. I. Viruses isolated during 1960 and 1961. *Am J Hyg.* Nov**1963**; 78:358–375.
- 37. 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.
- 38. Gondo K, Kusuhara K, Take H, Ueda K.** Echovirus type 9 epidemic in Kagoshima, southern Japan: seroepidemiology and clinical observation of aseptic meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* **1995**;14(9):787–791

- 39. Gradi A, Svitkin YV, Imataka H, et al.** Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**; 95(19):11089–11094.
- 40. 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
- 41. Gustin KE, Sarnow P.** Effects of poliovirus infection on nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J* **2001**; 20(12):240–249.
- 42. Hall CE, Cooney MK, Fox JP.** The Seattle virus watch program. I. Infection and illness experience of virus watch families during a communitywide epidemic of echovirus type 30 aseptic meningitis. *American Journal of Public Health & the Nations Health.* **1970**;60(8):1456–1465
- 43. 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.
- 44. Hogle JM, Chow M, Filman DJ.** Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **1985**; 229:1358–1365.
- 45. Horstmann DM.** Enterovirus infections of the central nervous system. The present and future of poliomyelitis. *Medical Clinics of North America.* **1967**; 51(3):681–692.

- 46. Hsiung G D.** Diagnostic virology: from animals to automation. *Yale J. Biol. Med.* **1984**. 57:727-733.
- 47. Hunt, D.M.** Replication of polio, rhino and other picornaviruses. In: *Microbiology and Immunology On-line*, **2015** Hunt, R.C. editor.
- 48. 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.
- 49. 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
- 50. Jankovic B, Pasic S, Kanjuh B, et al.** Severe neonatal echovirus 17 infection during a nursery outbreak. *Pediatr Infect Dis J.***1999**; 18(4):393-394.
- 51. Jenista JA, Powell KR, Menegus MA.** Epidemiology of neonatal enterovirus infection. *J Pediatr.* **1984**; 104(5):685–690.
- 52. Jore J, De Geus B, Jackson RJ, et al.** Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. *J Gen Virol***1988**;69(Pt 7):1627–1636
- 53. 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.
- 54. 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.

- 55. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al.** Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature***1981**; 291:547–553.
- 56. 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. (2012).** Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
- 57. Koike S, Ise I, Nomoto A.** Functional domains of the poliovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A***1991**; 88:4104-4108.
- 58. Kok, T W, T. Pryor, and L. Payne.1998** Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney epithelial, A549 (human lung epithelial) cells and human embryonic lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. *J. Clin. Virol.* 11:61-65.
- 59. 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
- 60. 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.
- 61. 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.

- 62. Liao S, Racaniello V.** Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* **1997**; 71:9770–9777.
- 63. Lyle JM, Bullitt E, Bienz K, et al.** Visualization and functional analysis of RNA-dependent RNA polymerase lattices. *Science* **2002**; 296(5576):2218–2222.
- 64. Malnou C E et al** *J. Virol.* **2002**;76:10617-10626
- 65. Marc D, Girard M, van der Werf S.** A Gly1 to Ala substitution in poliovirus capsid protein VP0 blocks its myristoylation and prevents viral assembly. *J Gen Virol* **1991**; 72(Pt 5):1151–1157
- 66. McIntyre CL, Knowles NJ, Simmonds P.** *J Gen Virol.* **2013** Aug; 94(Pt 8):1791-806.
- 67. Melnick J. L.** **1990** Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.): 549 – 605
- 68. 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
- 69. Minor PD, Ferguson M, Evans DM, et al.** Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* **1986**;67(Pt 7):1283–1291
- 70. Minor PD, Schild GC, Bootman J, et al.** Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature* **1983**; 301(5902):674–679.
- 71. Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* **2003**; 77:5136–5144.

- 72. Morrison ME, Racaniello VR.** Molecular cloning and expression of a murine homolog of the human poliovirus receptor gene. *J Virol***1992**; 66:2807-2813.
- 73. Moscufo N, Chow M.** Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J Virol***1992**; 66(12):6849–6857.
- 74. 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.
- 75. 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.
- 76. 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.
- 77. 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.
- 78. 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.

- 79. 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.
- 80. Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA,** *J Virol* **1999** Mar; 73(3):1941-8.
- 81. Pallansch MA, Oberste MS, Whitton JL.** Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In *Fields Virology*, 6th edn, Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health: Philadelphia, PA, **2013**; 490–530.
- 82. Palmenberg AC1, Spiro D, Kuzmickas R, Wang S, Djikeng A, Rathe JA, Fraser-Liggett CM, Liggett SB,** Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science* **2009** Apr 3; 324(5923):55-9.
- 83. Parsley TB, Cornell CT, Semler BL et al** Modulation of the RNA Binding and Protein Processing Activities of Poliovirus Polypeptide 3CD by the Viral RNA Polymerase Domain. *J Biol Chem* **1999**; 274, 12867-12876.
- 84. Parsley TB, Towner JS, Blyn LB, et al.** Poly (r C) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* **1997**; 3(10):1124–1134.
- 85. Perera R, Daijogo S, Walter BL, et al.** Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly (r C) binding protein. *J Virol* **2007**; 81(17):8919–8932.

- 86. 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.
- 87. Petersen JF, Cherney MM, Liebig HD, et al.** The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: a proteinase responsible for the shut off of host-cell protein synthesis. *EMBO J* **1999**; 18(20):5463–5475.
- 88. Pettersson RF, Flanagan JB, Rose JK, et al.** 5'-Terminal nucleotide sequences of poliovirus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* **1977**; 268:270–272.
- 89. 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.
- 90. 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.
- 91. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al.** Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* **1987**; 160:311-322.
- 92. Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al.** Genetic and biochemical studies of poliovirus cisacting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* **2000**; 74:10371–10380.
- 93. 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.

- 94. Rueckert R. R.** Picornaviridae: the viruses and their replication. In Virology (1996) third edition, pp. 609-654. Ed. Fields B. N. et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 95. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM.** The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. Proc Natl Acad Sci USA 1969; 62:912–919.
- 96. 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.
- 97. Sherry B, Mosser AG, Colonno RJ, et al.** Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogens on a common cold picornavirus, human rhinovirus 14. J Virol 1986; 57(1):246–257.
- 98. 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
- 99. Simmonds P1, McIntyre C, Savolainen-Kopra C, Tapparel C, Mackay IM, Hovi T.,** J Gen Virol. 2010 Oct; 91(Pt 10):2409-19.
- 100. 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.
- 101. Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 1968; 59:966–971.
- 102. Van Dyke TA, Flanagan JB.** Identification of poliovirus polypeptide p63 as a soluble RNA-dependent RNA polymerase. J Virol 1980; 35: 732-740.

- 103. Yin-Murphy M, Almond JW.** Picornaviruses. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; **1996.** Chapter 53
- 104. Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly (U) in poliovirus minus RNA is 5' terminal. *Biochem Biophys Res Commun* **1974;** 61:1101–1109.
- 105. Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972;** 69:1877–1882.
- 106. Ypma-Wong MF, Dewalt PG, Johnson VH, et al.** Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology* **1988;** 166(1):265–270.
- 107. Wickman I.** Beitrage zur Kenntnis der Heine-Medinschen Krankheit (Poliomyelitisacuta und verwandter Erkernkungen). Berlin: Karger; **1907.**
- 108. Zell, R., Delwart, E., Gorbalenya, A.E., Hovi, T., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Reuter, G., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and ICTV Report Consortium.** ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae. *J. Gen. Virol.* **2017.**