

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ανίχνευση, απομόνωση
και γενωμική ανάλυση
εντεροϊών από
περιβαλλοντικά
δείγματα

ΜΠΛΕΤΣΑ ΜΑΓΔΑΛΗΝΗ
ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ (επιβλέπουσα):

ΕΙΔΙΚΟ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΚΑΙ ΔΙΔΑΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ (ΕΕΔΙΠ)

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ:

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οκτώβριος 2010... Είλικρινά δε γνωρίζω αν ο κ. Μαρκουλάτος μπορούσε να διανοηθεί εκείνον τον Οκτώβρη πως αναθέτοντάς μου το θέμα της πτυχιακής μου εργασίας, θα απαλλασσόταν από την έγνοια μου σχεδόν δύο χρόνια αργότερα. Είμαι πεπεισμένη παρ' όλα αυτά πως πρώτος ο ίδιος έχει πλήρη επίγνωση της σχετικής σημασίας που αποκτά ο χρόνος όταν «εγκλωβιστεί» μέσα σε ένα εργαστήριο ιολογίας. Η υποστήριξή του υπήρξε αμέριστη, πάνω απ' όλα ποιοτική κι η εμπιστοσύνη του προς το πρόσωπό μου ίσως το πιο ισχυρό «αντιβιοτικό» σε κάθε αντιξοότητα που συνάντησα στο δρόμο μου. Ένα «ευχαριστώ» γεμάτο από θαυμασμό κι ευγνωμοσύνη είναι ό,τι πιο περιεκτικό μπορώ να εκφράσω για το πρόσωπό του. Η διδάκτορας κα Κυριακοπούλου από την πλευρά της αξίζει ένα πηγαίο «ευχαριστώ» καθότι με την επιτήρηση και την ουσιαστική της καθοδήγηση ήταν μια αναπόσπαστη «πυξίδα» σ' αυτή τη μικροκοσμική διαδρομή. Οφείλω ακόμα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή «βιοτεχνολογίας των μικροβίων», κ. Μόσιαλο για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στη σύσταση της τριμελούς επιτροπής αξιολόγησης της εργασίας μου. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους αγαπητούς συναδέλφους και φίλους Δημήτρη Τσακογιάννη, Ειρήνη Ρούτερ, Κατερίνα Νικολούλη, Τηλέμαχο Δημητρίου, Ελένη Τόσκα και Κική Καρακασίδου οι οποίοι πέραν της επιστημονικής τους συνεισφοράς, διατήρησαν ακέραιη την επαφή μου με το μακρόκοσμο όλο αυτό το διάστημα. Μαμά, μπαμπά... Αυτό ήταν! Είστε οι ηθικοί αυτουργοί κι είμαι περήφανη γι' αυτό. Σας ευχαριστώ!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένος των εντεροϊών ανήκει στην οικογένεια των Picornaviridae, η οποία περιλαμβάνει μικρούς RNA ιούς θετικής πολικότητας μήκους 7500 νουκλεοτιδίων. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία συμπτωμάτων ως αποτέλεσμα της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου, των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών. Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτωχής υγιεινής και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών θερμοκρασιών. Η έκκριση των εντεροϊών στο περιβάλλον γίνεται μέσω των κοπράνων μολυσμένων ατόμων (συμπτωματικών ή μη). Για το λόγο αυτό, τα λύματα και τα υγρά και στερεά απόβλητα αποτελούν σημαντικές πηγές απομόνωσης εντεροϊών από το περιβάλλον. Η παρακολούθηση των εντεροϊών μέσω του περιβάλλοντος αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την μελέτη της εξέλιξης και των μοριακών μηχανισμών των εντεροϊών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση, η απομόνωση και η γενωμική ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων εντεροϊών, στα πλαίσια μια προσπάθειας κατανόησης της εξέλιξής τους. Αρχικά έγινε ανίχνευση των εντεροϊών σε 14 περιβαλλοντικά δείγματα, με μοριακές τεχνικές που στοχεύουν στην 5'UTR. Από αυτά αλληλουχήθηκε μερικώς το στέλεχος LRB2E στις περιοχές 5'UTR, VP4 και VP2 και το στέλεχος EIS6B σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Μετά την αλληλούχιση ενός τμήματος του στελέχους LRB2E, ακολούθησε γενωμική ανάλυση, φυλογενετική μελέτη των αλληλουχημένων περιοχών και SimPlot ανάλυση. Ακολούθως για το στέλεχος EIS6B, πραγματοποιήθηκε γενωμική ανάλυση, φυλογενετική και επιδημιολογική μελέτη και SimPlot ανάλυση. Πέρα από τη φυλογενετική και επιδημιολογική μελέτη του στελέχους EIS6B, η γενωμική ανάλυση ανέδειξε και την ύπαρξη ενός ανασυνδυασμού. Ο ανασυνδυασμός είναι ένας μηχανισμός που ευθύνεται για τη δημιουργία ιών με «μωσαϊκά» γονιδιώματα, οι οποίοι φέρουν άγνωστες ιδιότητες, και ίσως αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	7
2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	10
2.1 Δομή του καψιδίου	10
2.2 Το γονιδίωμα των εντεροϊών	11
2.2.1 Η 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR).....	12
2.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)	13
2.2.3 Η 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR).....	15
3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	16
4. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	17
4.1. Προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς και είσοδος του ιού στο κύτταρο	18
4.2. Απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου	18
4.3. Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεολυτική διάσπαση	19
4.4. Αντιγραφή του ιικού RNA	21
4.5. Συναρμολόγηση νέων ιικών σωματιδίων – Καψιδίωση	22
4.6. Ωρίμανση των νέων ιικών καψιδίων.....	23
4.7. Απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων για μόλυνση νέων κυττάρων	23
5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ	24
6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ.....	25
7. ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	26
8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	28
8.1 Κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα	28
8.2 Κυτταρικές σειρές	28
8.3 Οροτυπική ταυτοποίηση	29
8.4 Μοριακές τεχνικές.....	29
9. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	30
9.1. Μεταλλάξεις	30
9.2. Ανασυνδυασμός.....	31
ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	33

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2°	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	34
1. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	34
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ	35
2.1. Ενοφθαλμισμός περιβαλλοντικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες	35
2.2 Σειριακές αραιώσεις.....	35
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA.....	36
Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης:.....	37
4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ.....	37
5. ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	37
6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – PCR	40
7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	43
8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR	43
9. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	43
10. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	46
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°	48
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ	48
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LRB2E	48
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ EIS6B	52
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°	69
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	69
1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	69
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LRB2E	70
3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ EIS6B	71
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	73

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Σύμφωνα με την 9^η αναφορά της Διεθνούς Επιτροπής Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV) η τάξη των *Picornavirales* αποτελείται από τις οικογένειες *Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*, *Picornaviridae*, *Secoviridae* και από δύο μη προσδιορισμένα γένη τα *Bacillarnavirus* και *Labyrnavirus* (Le Gall et al., 2008; Sanfacion et al., 2011).

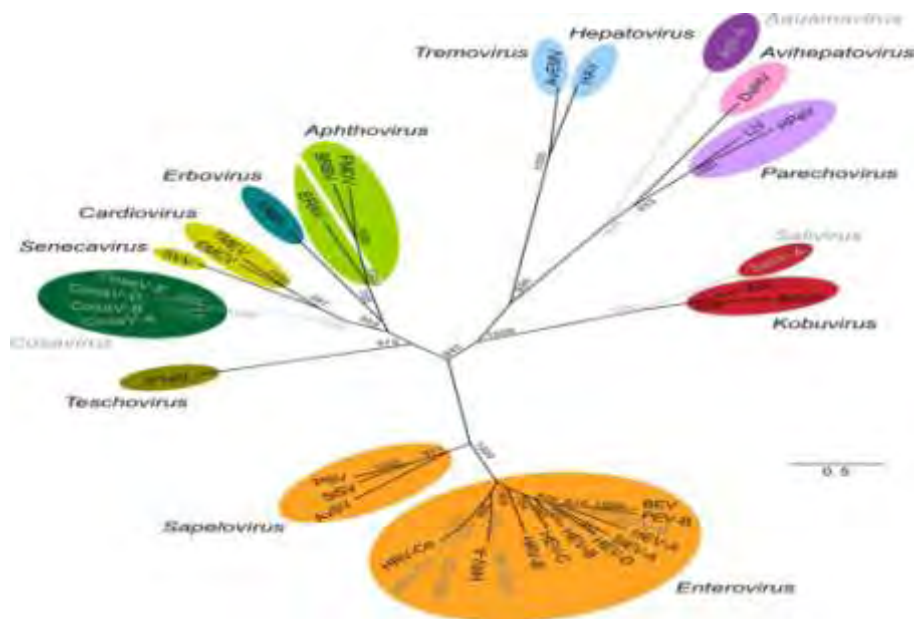
Η οικογένεια των *Picornaviridae* απαρτίζεται από μία μεγάλη ομάδα μικρών, μη-ελυτροφόρων, μονόκλωνων RNA – ιών θετικής πολικότητας. Οι *Εντεροϊοί* (*Enteroviruses*) αποτελούν ένα από τα δώδεκα γένη της οικογένειας αυτής. Οι *Picornaviridae* ιοί ταξινομούνται στα εξής δώδεκα γένη: τους *Αρθοϊούς* (*Arthoviruses*), τους ιούς της *Ηπατίτιδας Α* της *πάπιας* (*Anihepatoviruses*), τους *Καρδιοϊούς* (*Cardioviruses*), τους *Εντεροϊούς* (*Enteroviruses*), τους *Ερμποϊούς* (*Erboviruses*), τους ιούς της *Ηπατίτιδας Α* (*Hepatoviruses*), τους *Κομπουϊούς* (*Kobuviruses*), τους *Παρεκοϊούς* (*Parechoviruses*), τους *Σαπελοϊούς* (*Sapeloviruses*), τους *Σενεκαϊούς* (*Senecaviruses*), τους *Τεσκοϊούς* (*Tescoviruses*) και τους *Τρεμοϊούς* (*Tremoviruses*) (Knowles et al., 2012).

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικώς διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται με βάση τις ομοιότητες στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ισωματίου, της γενωμικής αλληλουχίας και της οργάνωσης του γονιδιώματος. Τα μέλη του γένους των εντεροϊών είχαν αρχικά ταξινομηθεί, με βάση τις ασθένειες που προκαλούσαν στους ανθρώπους και την παθογένειά τους σε πειραματόζωα, στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες: τους *Πολιοϊούς* (*PV*, ορότυποι 1-3), τους *Coxsackie Α ιούς* (*CAV*, ορότυποι 1-24), τους *Coxsackie Β ιούς* (*CBV*, ορότυποι 1-6) και τους *Echo ιούς* (*E*, ορότυποι 1-33) (Knipe and Howley, 2007).

Με την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης το ταξινομικό σύστημα εξελίχθηκε, με αποτέλεσμα το γένος των εντεροϊών να χωρίζεται σε 10 είδη εκ των οποίων τα επτά προσβάλλουν τον άνθρωπο (Εικόνα 1). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 335 ορότυποι *Picornaviridae* ιών (Knowles et al., 2012) (Πίνακας 1) εκ των οποίων οι 265 ανήκουν στο γένος των *Εντεροϊών* (Πίνακας 2).

ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΟΡΟΤΥΠΟΙ
Enteroviruses	<i>Bovine enterovirus</i>	2
	<i>Human enterovirus A</i>	22
	<i>Human enterovirus B</i>	60
	<i>Human enterovirus C</i>	22
	<i>Human enterovirus D</i>	4
	<i>Porcine enterovirus B</i>	4
	<i>Simian enterovirus A</i>	1
	<i>Human rhinovirus A</i>	77
	<i>Human rhinovirus B</i>	25
	<i>Human rhinovirus C</i>	49
Cardiovirus	<i>Encephalomyocarditis virus</i>	1
	<i>Theilovirus</i>	12
Aphthovirus	<i>Foot-and-mouth disease virus</i>	7
	<i>Equine rhinitis A virus</i>	1
	<i>Bovine rhinitis A virus</i>	2
	<i>Bovine rhinitis B virus</i>	1
Hepatovirus	<i>Hepatitis A virus</i>	1
Parechovirus	<i>Human parechovirus</i>	14
	<i>Ljungan virus</i>	4
Erbovirus	<i>Equine rhinitis B virus</i>	3
Kobuvirus	<i>Aichi virus</i>	1
	<i>Bovine kobuvirus</i>	1
Teschovirus	<i>Porcine teschovirus</i>	11
Sapelovirus	<i>Porcine sapelovirus</i>	1
	<i>Simian sapelovirus</i>	3
	<i>Avian sapelovirus</i>	1
Senecavirus	<i>Seneca Valley virus</i>	1
Tremovirus	<i>Avian encephalomyelitis virus</i>	1
Avihepatovirus	<i>Duck hepatitis A virus</i>	3

Πίνακας 1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας Picornaviridae.



Εικόνα 1: Φυλογενετικό δέντρο όπου απεικονίζονται οι σχέσεις και οι αποστάσεις μεταξύ των γενών της οικογένειας Picornaviridae.

ΓΕΝΟΣ	ΕΙΔΟΣ	ΟΡΟΤΥΠΟΙ
Εντεροϊοί (Enteroviruses)	Βόειος εντεροϊός (Bovine enterovirus)	Βόειος εντεροϊός (Bovine enterovirus): (BEV) 1-2
	Ανθρώπινοι εντεροϊοί είδους Α (Human enterovirus A)	Coxsackie ιοί: A2 (CV-A2), CV-A3, CV-A4, CV-A5, CV-A6, CV-A7, CV-A8, CV-A10, CV-A12, CV-A14, CV-A16, οι εντεροϊοί: (EV) A71, EV-A76, EV-A89, EV-A90, EV-A91, EV-114 και οι εντεροϊοί που προσβάλλουν πιθήκους (Simian enteroviruses): EV-A92, SV19, SV43, SV46 and A13
	Ανθρώπινοι εντεροϊοί είδους Β (Human enterovirus B)	Coxsackie ιοί: B1 (CV-B1), CV-B2, CV-B3, CV-B4, CV-B5 (incl. SVDV), CV-B6, CV-A9, Echovirus 1 (E-1; incl. E-8), E-2, E-3, E-4, E-5, E-6, E-7, E-9 (incl. CV-A23), E-11, E-12, E-13, E-14, E-15, E-16, E-17, E-18, E-19, E-20, E-21, E-24, E-25, E-26, E-27, E-29, E-30, E-31, E-32, E-33, οι εντεροϊοί: B69 (EV-B69), EV-B73, EV-B74, EV-B75, EV-B77, EV-B78, EV-B79, EV-B80, EV-B81, EV-B82, EV-B83, EV-B84, EV-B85, EV-B86, EV-B87, EV-B88, EV-B93, EV-B97, EV-B98, EV-B100, EV-B101, EV-B106, EV-B107, EV-B110 (από χιμπαντζή) και ο εντεροϊός που προσβάλλει πιθήκους SA5
	Ανθρώπινοι εντεροϊοί είδους C (Human enterovirus C)	Πολιοϊός (PV) 1, PV-2, PV-3, Coxsackie ιός A1, CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116 and EV-C117
	Ανθρώπινοι εντεροϊοί είδους D (Human enterovirus D)	Εντεροϊός (EV) D68, D70, D94 & D111
	Χοίρειος εντεροϊός είδους Β (Porcine enterovirus B)	Χοίρειος εντεροϊός (Porcine enterovirus): (PEV) 9-10, 14-15
	Εντεροϊός που προσβάλλει τον πίθηκο είδους Α (Simian enterovirus A)	Εντεροϊός που προσβάλλει τον πίθηκο (Simian enterovirus): (SEV) A1
	Ανθρώπινος ρινοϊός είδους Α (Human rhinovirus A)	Ανθρώπινος ρινοϊός (Human rhinovirus): (HRV) A1, A2, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A15, A16, A18, A19, A20, A21, A22, A23, A24, A25, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A36, A38, A39, A40, A41, A43, A44, A45, A46, A47, A49, A50, A51, A53, A54, A55, A56, A57, A58, A59, A60, A61, A62, A63, A64, A65, A66, A67, A68, A71, A73, A74, A75, A76, A77, A78, A80, A81, A82, A85, A88, A89, A90, A94, A95, A96, A98, A100, A101, A102 and A103
	Ανθρώπινος ρινοϊός είδους Β (Human rhinovirus B)	Ανθρώπινος ρινοϊός (Human rhinovirus): (HRV) B3, B4, B5, B6, B14, B17, B26, B27, B35, B37, B42, B48, B52, B69, B70, B72, B79, B83, B84, B86, B91, B92, B93, B97 and B99
	Ανθρώπινος ρινοϊός είδους C (Human rhinovirus C)	Ανθρώπινος ρινοϊός (Human rhinovirus): (HRV) C1-C49

Πίνακα 2: Ταξινόμηση όλων των οροτύπων του γένους των Εντεροϊών.

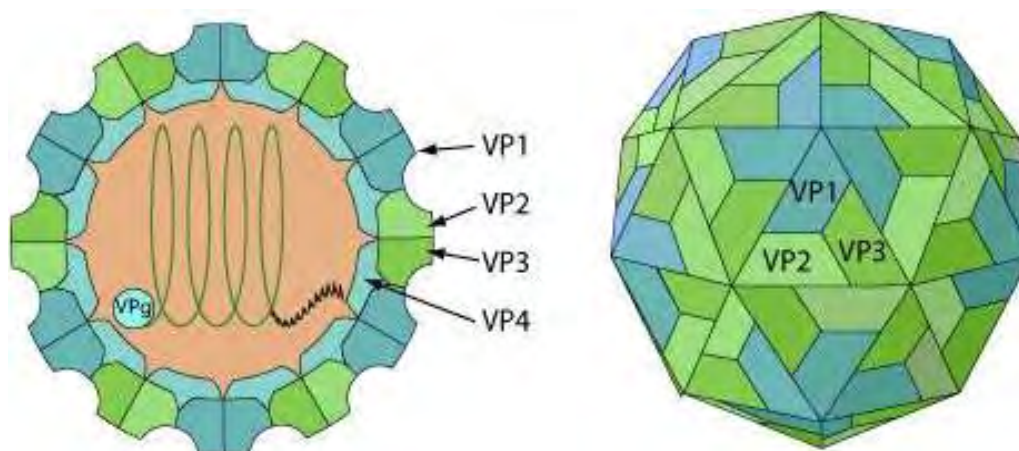
2. ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

2.1 Δομή του καψιδίου

Μετά από μελέτες κρυσταλλογραφίας ακτίνων Χ, με τις οποίες ανακαλύφθηκε η τρισδιάστατη δομή αρκετών οροτύπων των εντεροϊών, βρέθηκε ότι τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά, διαμέτρου περίπου 30nm και δεν περιβάλλονται από λιπιδικό έλυτρο. Οι εντεροϊοί διαθέτουν ένα εικοσαεδρικό καψίδιο διπλής, τριπλής και πενταπλής συμμετρίας, το οποίο σχηματίζεται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών, των VP1, VP2, VP3 και VP4 (Rueckert R.R., 1985). Η συγκρότηση του ώριμου καψιδίου γίνεται μέσω των ονομαζόμενων πρωτομερών, τα οποία απαρτίζονται από αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, της VP0 στην οποία οι VP4 και VP2 είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες και αποτελούν τη βασική μονάδα του καψιδίου (Rossman et al., 1989). Πέντε πρωτομερή (VP0, VP1, VP3) ενώνονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ένα πενταμερές [(VP0, VP1, VP3)₅] και δώδεκα πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂. Η διάσπαση της VP0 στις VP4 και VP2 αποτελεί το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του γενετικού υλικού στο καψίδιο και της σταθεροποίησης του ώριμου πλέον ιού. Οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου (εικόνα 2) (Stanway G., 1990).

Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται από προεξοχές και αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά «αυλάκωση» (canyon) που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1 και VP3. Αυτή η «αυλάκωση» εμπλέκεται στην προσκόλληση του ιού σε υποδοχείς των κυττάρων – ξενιστών. Πιο συγκεκριμένα, οι μικρές διαστάσεις της αυλάκωσης δεν επιτρέπουν την προσκόλληση στο εσωτερικό της αρκετά ογκωδών αντισωμάτων. Ωστόσο, στο εσωτερικό της «αυλάκωσης» υπάρχουν κατάλληλες περιοχές που μπορούν να ενωθούν με μικρά, συγκεκριμένα τμήματα που προεξέχουν από τους κυτταρικούς υποδοχείς, επιτρέποντας έτσι, την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο – ξενιστή (Stanway G., 1990). Οι περιοχές αυτές στο εσωτερικό της αυλάκωσης, λόγω της μεγάλης εξειδίκευσης της αλληλεπίδρασής τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς, διατηρούνται φυλογενετικά μεταξύ διαφορετικών στελεχών. Αντίθετα, τμήματα του γενετικού υλικού τα οποία κωδικοποιούν πρωτεϊνικά τμήματα του καψιδίου που δεν έχουν μεγάλη λειτουργική σημασία για τον ιό, συσσωρεύουν μεταλλάξεις και συνεπώς είναι ποικιλόμορφα ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων και ως προς την τρισδιάστατη δομή τους. Η δυνατότητα αυτής της σημαντικής μεταβολής τους φαίνεται πως είναι ένα χαρακτηριστικό που εξελίχθηκε έτσι, ώστε οι

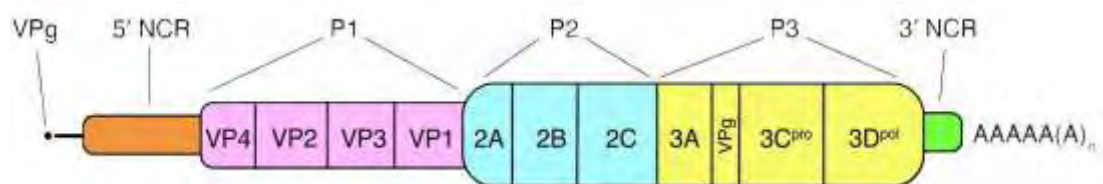
περιοχές αυτές να λειτουργήσουν ως επίτοποι. Αν και οι επίτοποι αυτοί βρίσκονται σε σημεία ευπρόσιτα για τα αντισώματα, η ανοσολογική αντίδραση μπορεί να αποφευχθεί εξαιτίας της ευμεταβλητότητας των περιοχών αυτών.



Εικόνα 2: Δομή του καψιδίου των *Rotovirus* ιών. Αποτελείται από 12 πενταμερή όπου το κάθε πενταμερές περιλαμβάνει 5 πρωτομερή των πρωτεϊνών VP1, VP3 και VP0 (VP2 + VP4).

2.2 Το γονιδίωμα των εντεροϊών

Το καψίδιο των *Rotovirus* ιών εσωκλείει ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας που στους εντεροϊούς έχει μήκος περίπου 7500 νουκλεοτίδια (Melnick J.L., 1990). Τα επιμέρους τμήματα του γενετικού υλικού των εντεροϊών περιλαμβάνουν: την 5' μη κωδική περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame – ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3' untranslated region – 3'UTR) και την πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract) (εικόνα 3). Το νουκλεοτίδιο στο 5'- άκρο του γενετικού υλικού συνδέεται ομοιοπολικά με μια μικρή, κωδικοποιούμενη από τον ιό πρωτεΐνη, την VPg, η οποία πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και στον εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο (Nomoto et al., 1977). Το τμήμα του γενετικού υλικού προς το 5' άκρο χαρακτηρίζεται από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' untranslated region – 5'UTR ή 5' non-coding region – 5'NCR). Ακολουθεί το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που περιέχει τις πληροφορίες για τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Στο 3' άκρο του γενώματος υπάρχει μια 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' untranslated region – 3'UTR ή 3' non-coding region – 3'NCR) που καταλήγει σε μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A)-tract) (εικόνα 3).

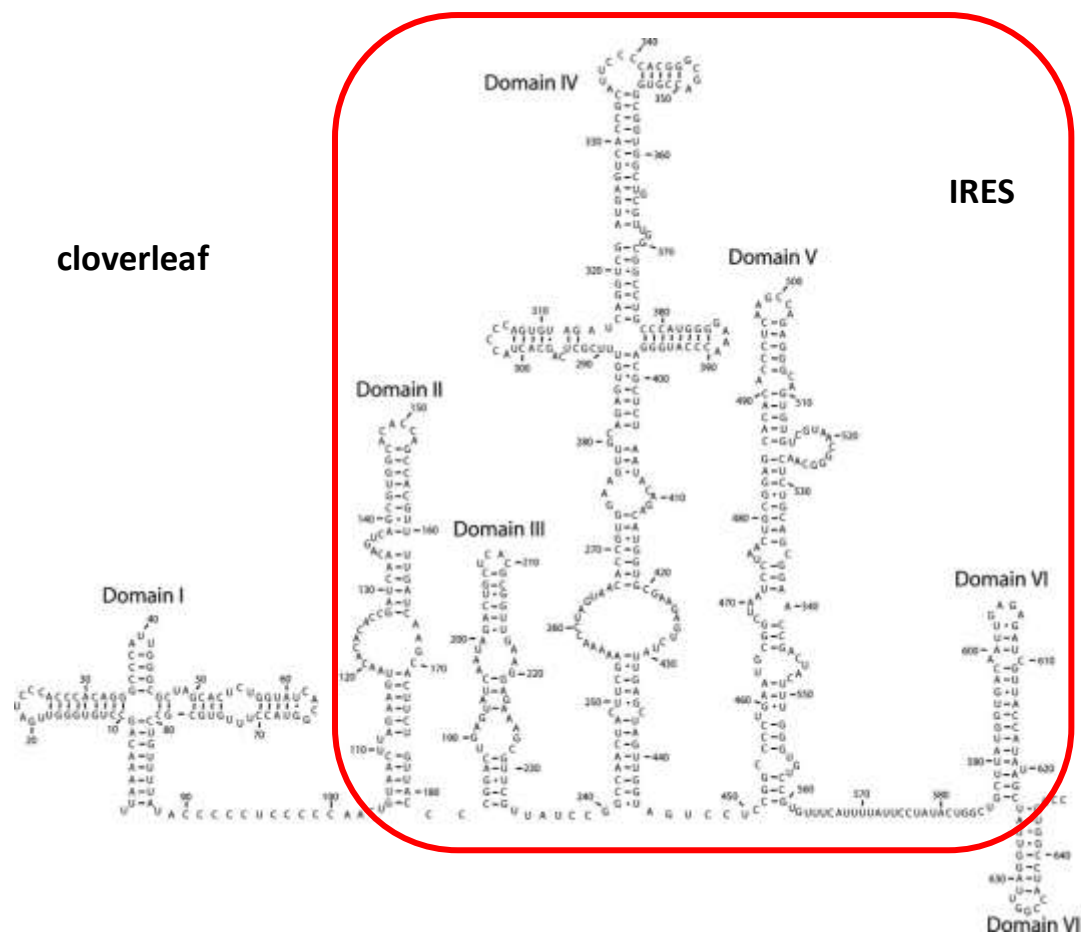


Εικόνα 3: Χάρτης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5'UTR είναι προσδεσμένη η VPg πρωτεΐνη και στο 3' άκρο της 3'UTR βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη περιοχή. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

2.2.1 Η 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR)

Η 5'UTR των εντεροϊών, και γενικά όλων των *Picornoviridae* ιών, είναι αρκετά μεγάλη σε μήκος σε σύγκριση με πολλές αντίστοιχες 5'UTR άλλων κυττάρων ή ιών. Αποτελεί το 8-12% του γενετικού υλικού των *Picornoviridae* ιών. Μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών η 5'UTR παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων, καθώς περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων που διατηρούνται πλήρως ή μερικώς από είδος σε είδος (Stanway et al., 1984). Το συγκεκριμένο γεγονός υποδηλώνει ότι η 5'UTR επηρεάζει την παθογένεια του ιού, η οποία είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων αυτής της περιοχής. Οι συντηρημένες αυτές αλληλουχίες της 5'UTR εμπλέκονται στον εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού. Ένα άλλο χαρακτηριστικό της 5'UTR των εντεροϊών (και γενικά όλων των *Picornoviridae* ιών) είναι ότι έχει, σε κάποιο βαθμό, διαφορετική σύσταση νουκλεοτιδίων από το υπόλοιπο γένωμα. Περιέχει χαμηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις την αδενίνη και την θυμίνη (A+T) και σημαντικά υψηλότερο ποσοστό νουκλεοτιδίων με αζωτούχες βάσεις τη γουανίνη και την κυτοσίνη (G+C) (Stanway et al., 1984), γεγονός που αντικατοπτρίζει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής (Palmenberg A.C., 1987). Το μήκος της 5'UTR είναι περίπου 750 νουκλεοτίδια και αποτελείται από επτά δομικά στοιχεία (domain I – VII) (εικόνα 4). Τα πρώτα 88 νουκλεοτίδια σχηματίζουν μια δομή με σχήμα τριφυλλιού (cloverleaf, domain I), τα νουκλεοτίδια 127 έως 608 αναδιπλώνονται σχηματίζοντας το Internal Ribosome Entry Site (στοιχείο IRES, domain II-VI) και το τελευταίο τμήμα (domain VII) περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf αποτελεί μια δομή σχήματος τριφυλλιού η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers et al., 2006). Το στοιχείο IRES είναι υπεύθυνο για τη μετάφραση και τη μολυσματικότητα του ιού (Kauder and Racaniello, 2004). Πιο συγκεκριμένα, τα ριβοσώματα και οι κυτταρικοί παράγοντες της μετάφρασης, αρχικά προσδέονται στο εσωτερικό του IRES και στη συνέχεια μετακινούνται μέχρι το κωδικόνιο έναρξης ώστε να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης.



Εικόνα 4: Δευτεροταγής δομή της 5'UTR του CBV3.

2.2.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται σε μία μεγάλη πολυπρωτεΐνη η οποία χωρίζεται σε τρεις περιοχές την P1, την P2 και την P3 περιοχή. Η πολυπρωτεΐνη διασπάται αυτοκαταλυτικά από τις δύο κύριες ιικές πρωτεάσες, την 2A, η οποία πραγματοποιεί το αρχικό πρωτεολυτικό ρήγμα μεταξύ δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών και την 3C, η οποία εκτελεί το μεγαλύτερο κομμάτι της υπόλοιπης επεξεργασίας της αρχικής πολυπρωτεΐνης (Σιαφάκας και συν., 1999). Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 διασπάται για να αποδώσει τις

δομικές πρωτεΐνες του ιού. Οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$, $3CD^{pro}$) και την αντιγραφή του γενώματος ($2B$, $2C$, $3AB$, $3B^{VPg}$, $3CD^{pro}$, $3D^{pol}$).

Η δομική περιοχή P1 του ORF κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιού VP1, VP2, VP3 και VP4 (εικόνα 5). Η P1 γενωμική περιοχή παρέχει αξιόπιστη συσχέτιση της αλληλουχίας με τον ορότυπο. Μοριακές μελέτες προτείνουν ότι η νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφόρων οροτύπων εντεροϊών (Oberste et al., 1999).



Εικόνα 5: Χάρτης του γονιδιώματος των εντεροϊών. Παρουσιάζεται η VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, η 5'UTR, οι θέσεις των γονιδίων των δομικών και μη δομικών/(λειτουργικών) πρωτεϊνών καθώς και η 3'UTR και η πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο.

Οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών κωδικοποιούνται από τις P2 και P3 μη δομικές περιοχές του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (εικόνα 5). Υπάρχουν 7 βασικές λειτουργικές πρωτεΐνες, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, ενώ σε μερικές περιπτώσεις απαιτούνται και τα λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD) (Stanway G., 1990). Συγκριτικές μελέτες μεταξύ μη δομικών πρωτεϊνών από διάφορους *Picornia* ιούς έδειξαν ότι οι πρωτεΐνες αυτές διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες, αντικατοπτρίζοντας την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα των θηλαστικών που προσβάλλονται από εντεροϊούς, προς τις πρωτεΐνες αυτές. Στον ακόλουθο πίνακα (πίνακας 3) αναφέρονται οι λειτουργίες των μη δομικών πρωτεϊνών των εντεροϊών.

ΜΗ ΔΟΜΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ	ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
2A^{pro}	Πρωτεάση: Πραγματοποιεί το αρχικό πρωτεολυτικό ρήγμα στην πολυπρωτεΐνη και αναστέλλει την πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου – ξενιστή (Toyoda et al., 1986).
2B	Εμπλέκεται σε αρχικό στάδιο της σύνθεσης του ιικού RNA και αυξάνει τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Barco et al., 1995).
2C	Ελικάση: Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας του ιικού RNA (Pfister and Wimmer, 1999).
2BC	Πρόδρομο μόριο των 2B και 2C πρωτεϊνών. Προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών του ενδοπλασματικού δικτύου και τη δημιουργία κυστιδίων στα οποία επιτελείται η ιική αντιγραφή (Paul et al., 1998)
3A	Εμποδίζει τη μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύστημα Golgi και μειώνει τις εκκρίσεις του κυττάρου (Belon et al., 2007).
3B^{VPg}	Λαμβάνει μέρος στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου καθώς και στην αντιγραφή του RNA παίζοντας, πιθανώς, το ρόλο εκκινητικού μορίου (Paul et al., 1998).
3AB	Συμβάλλει στη σταθεροποίηση της VPg στις μεμβράνες για την έναρξη της σύνθεσης του RNA.
3C^{pro}	Πρωτεάση κυστεΐνης: Διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων (Stanway G., 1990).
3D^{pol}	Ιική RNA εξαρτώμενη πολυμεράση: Υπεύθυνη για την αντιγραφή του γενώματος του ιού (Pfister et al., 1999).
3CD^{pro}	Πρωτεάση: Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή (Marcotte et al., 2007).

Πίνακας 3: Οι λειτουργίες των μη δομικών πρωτεϊνών των εντεροϊών.

2.2.3 Η 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR)

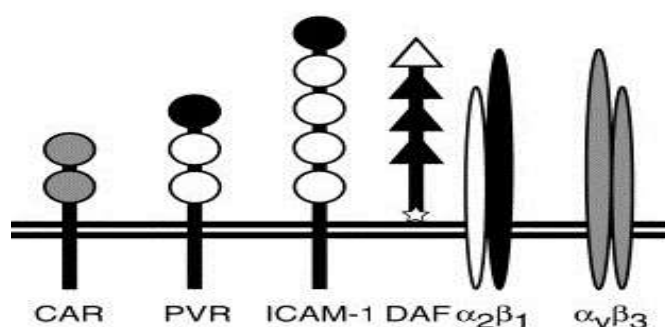
Η 3'UTR, που βρίσκεται στο 3' άκρο του γενώματος των *Picornia* ιών, διαφέρει σε μήκος μεταξύ των διαφορετικών εκπροσώπων της οικογένειας αυτής. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA (Oberste et al., 2006). Ενώ η αλληλουχία της 3'UTR ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων στελεχών των εντεροϊών, η ύπαρξη πολύ συντηρημένων δευτεροταγών δομών υποδηλώνει ότι αυτές οι δομές είναι οι λειτουργικές μονάδες που εμπλέκονται στην αντιγραφή. Τέλος, στο 3' άκρο της η 3'UTR φέρει μια poly(A) ουρά, η οποία κυμαίνεται από 35 νουκλεοτίδια στους Καρδιοϊούς έως 100 νουκλεοτίδια στους Αφθοϊούς και φαίνεται να παίζει κι αυτή σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού (Rohll et al., 1995).

3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η είσοδος ενός ιού σε έναν οργανισμό αρχίζει με την προσκόλληση του ιού σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή. Οι υποδοχείς είναι μακριά μόρια που προεξέχουν από την εξωκυτταρική επιφάνεια και συμμετέχουν στις φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου (Rossman et al., 2002), όπως ισχύει στην περίπτωση των υποδοχέων με δομή όμοια με των ανοσοσφαιρινών (ICAM-1, CAR, PVR) (Εικόνα 6). Ωστόσο, υπάρχουν και υποδοχείς οι οποίοι συνδέονται εξωτερικά της «αυλάκωσης» και δεν αποσταθεροποιούν το ιικό καψίδιο, όπως ο υποδοχέας DAF (Decay-Acceleration Factor ή CD55). Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με τον υποδοχέα δεν είναι πάντα επαρκής για τη είσοδό του στο κύτταρο και απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου ή υποδοχέα (συνυποδοχέα). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4) αναφέρονται οι κυτταρικοί υποδοχείς και συνυποδοχείς των εντεροϊών.

ΙΟΣ	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ	ΤΥΠΟΣ ΥΠΟΔΟΧΕΑ	ΣΥΝΥΠΟΔΟΧΕΑΣ
Πολιοϊοί 1-3	PVR	Ig-like	
Coxsackie A9	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin	Integrin	$\alpha_v\beta_6$ -Integrin
Enterovirus 70	CD55	SCR-like	
Coxsackie A21	CD55	SCR-like	ICAM-1
Coxsackie B1, B3, B5	CD55	SCR-like	$\alpha_v\beta_6$ -Integrin
Echo 6, 7, 11, 12, 20, 21	CD55	SCR-like	β_2 -Microglobulin
Echo 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin	Integrin	β_2 -Microglobulin
Coxsackie B1-B6	CXADR ή CAR	Ig-like	
HRV-87	Sialic acids		

Πίνακας 4: Οι κυτταρικοί υποδοχείς και συνυποδοχείς των εντεροϊών (Ig=Immunoglobulin, SCR=Short Concensus Repeat)

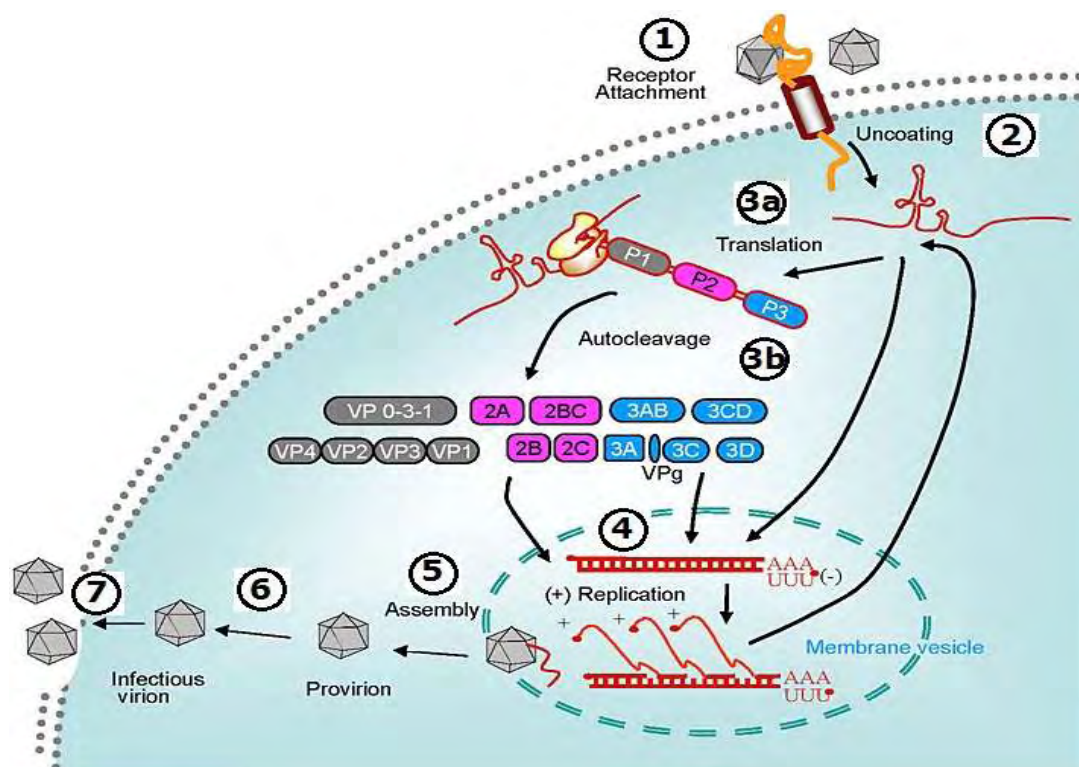


Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνών που είναι γνωστό ότι λειτουργούν σαν υποδοχείς των Picorna ιών.

4. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών μπορεί να συνοψιστεί στα ακόλουθα στάδια (εικόνα 7):

1. Το καψίδιο του ιού προσκολλάται στον κατάλληλο υποδοχέα στη επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή και εισέρχεται στο κύτταρο με ενδοκύττωση.
2. Αλλαγές που συμβαίνουν στη χωροδιάταξη του καψιδίου, οδηγούν στην απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου.
3. Το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και η μετάφρασή του οδηγεί σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες, ώστε να παραχθούν οι δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες.
4. Το ικό γένωμα αντιγράφεται σε μεμβρανικά κυστίδια χρησιμοποιώντας σαν μήτρα το RNA (+) πολικότητας, για την παραγωγή του RNA (-) πολικότητας. Η αντιγραφή του RNA συμβαίνει σύμφωνα με το εξής μονοπάτι: RNA (+) → RNA (-) → RNA (+).
5. Δημιουργία των ικών καψιδίων και εγκλεισμός του RNA (+) πολικότητας στο καψίδιο (συναρμολόγηση των νέων ικών σωματιδίων).
6. Η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4, απαραίτητο βήμα για την ωρίμανση των ικών καψιδίων, τα οποία είναι πλέον μολυσματικά.
7. Τέλος, τα νέα ικά σωματίδια απελευθερώνονται για να μολύνουν νέα κύτταρα.



Εικόνα 7: Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών.

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν ολοκληρωμένο κύκλο αντιγραφής των εντεροϊών ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, όπως τον ορότυπο του εντεροϊού, τη θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο – ξενιστή και την πολλαπλότητα της μόλυνσης.

4.1. Προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου στους κυτταρικούς υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου – ξενιστή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η έκφραση (ή η απουσία) των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων καθορίζει και τον τροπισμό ενός ιού, δηλαδή τον τύπο του κυττάρου – ξενιστή στον οποίο ο ιός μπορεί να αντιγραφεί. Επομένως, αυτό το αρχικό στάδιο της αναγνώρισης του υποδοχέα και της μετέπειτα αντιγραφής του ιού στο κύτταρο – ξενιστή θα έχει και σημαντική επίδραση στην παθογένεια του ιού. Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» (Rossmann et al., 2002), όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Οι υποδοχείς αυτοί έχουν παρόμοια δομή και περιέχουν μια σειρά από περιοχές όμοιες των ανοσοσφαιρινών. Οι ιοί που μόλις έχουν προσκολληθεί αρχικά είναι κατανεμημένοι σχετικά ομοιόμορφα στην κυτταρική επιφάνεια. Στη συνέχεια, οι υποδοχείς συγκεντρώνονται σε περιοχές της κυτταρικής μεμβράνης, οι οποίες είναι επενδυμένες στην εσωτερική τους περιοχή με κλαθρίνη. Η συγκέντρωση αυτή των υποδοχέων στις συγκεκριμένες περιοχές, οδηγεί στην πτύχωση της κυτταρικής μεμβράνης γύρω από τον προσκολλημένο ιό και την είσοδό του μέσω ενδοκυττάρωσης στο εσωτερικό του ξενιστή, εντός κυστιδίων επενδυμένων με κλαθρίνη.

4.2. Απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου

Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Πιο συγκεκριμένα, μια αντλία πρωτονίων (H⁺) που απαιτεί ενέργεια (ATP) οδηγεί στη δημιουργία όξινου περιβάλλοντος εντός των κυστιδίων. Το όξινο αυτό περιβάλλον παρέχει τα ερεθίσματα για την απελευθέρωση της καψιδικής πρωτεΐνης VP4 και την αποδιάταξη των υδροφοβικών καψιδικών περιοχών που βρίσκονται εντός του καψιδίου. Η σύντηξη της λιπιδικής διπλοστιβάδας του κυστιδίου, που περιέχει τον ιό που εισήλθε στο κύτταρο, με αυτές τις υδρόφοβες περιοχές προκαλεί τη μεταφορά του RNA από το ιικό σωματίδιο στο κυτταρόπλασμα. Συγκεκριμένα, όταν οι Πολιοϊοί προσδεθούν στον υποδοχέα τους, PVR, αλλάζουν στερεοδιάταξη και μετατρέπονται σε μορφές γνωστές ως « Α σωματίδια » (Wimmer

et al., 1993). Τα σωμάτια αυτά περιέχουν το ιικό RNA έχουν χάσει όμως την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Ταυτόχρονα, το N – τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, μεταφέρεται στην επιφάνεια του «Α σωματίου» και προσδίδει στο «Α σωμάτιο» υδρόφοβες ιδιότητες και συνεπώς αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες (Fricks et al., 1990). Έτσι το εκτεθειμένο λιπόφιλο N – τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο διαμέσου του οποίου το RNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα, όπου τα ριβοσώματα μπορούν να αρχίσουν τη μετάφραση του γενώματος (εικόνα 7).

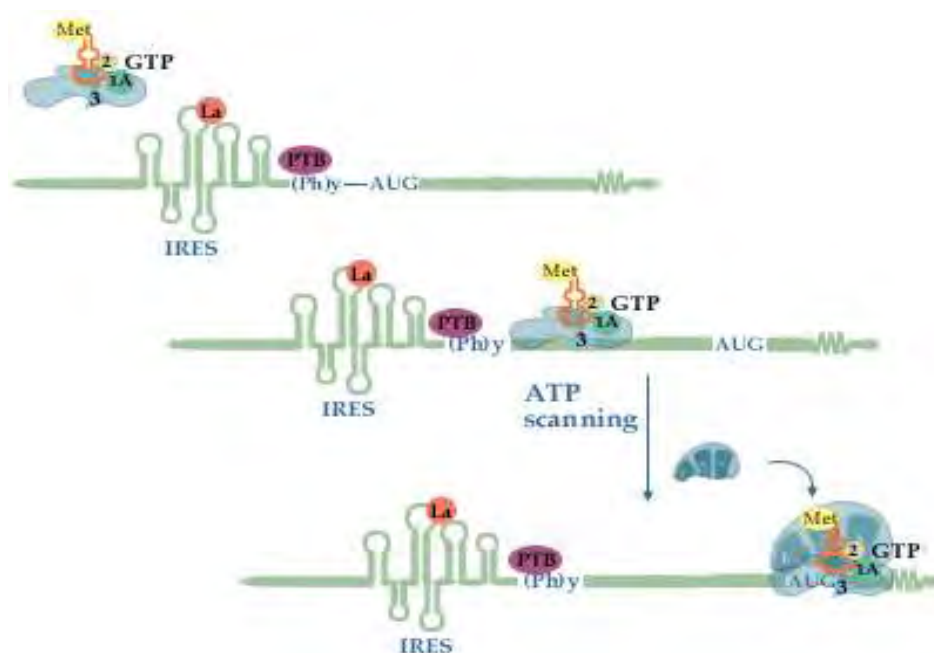
4.3. Μετάφραση του ιικού RNA και πρωτεολυτική διάσπαση

Από τη στιγμή που το (+) πολικότητας RNA γένωμα του ιού απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα, πρέπει να μεταφραστεί επειδή δεν μπορεί να αντιγραφεί από καμία κυτταρική RNA πολυμεράση και επειδή ο ιός δε μεταφέρει στο κύτταρο, μέσω του καψιδίου, κανένα ιικό ένζυμο. Το γενετικό υλικό των εντεροϊών δρα ως mRNA και η μετάφρασή του οδηγεί στη δημιουργία μιας πολυπρωτεΐνης, η οποία έχει μήκος 210 kDa και διασπάται αυτοκαταλυτικά. Όμως, οι εντεροϊοί στερούνται κάποιων βασικών στοιχείων τα οποία συναντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά mRNAs. Τα ευκαρυωτικά mRNAs φέρουν στο 5'- άκρο τους μία καλύπτρα, γνωστή ως cap, η οποία περιέχει μια μεθυλιωμένη γουανωσίνη. Τα ριβοσώματα αναγνωρίζουν την καλύπτρα στο 5'- άκρο και «σαρώνουν» κατά μήκος τη νουκλεοτιδική αλληλουχία μέχρι να φτάσουν σε ένα κωδικόνιο έναρξης AUG. Το 5'- άκρο των εντεροϊών δε φέρει καλύπτρα και επομένως δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα κατά τον ίδιο τρόπο, αλλά τροποποιείται με την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη VPg αφαιρείται από ένα κυτταρικό ένζυμο, που ονομάζεται VPg-Unlinkase, του οποίου ο ρόλος δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί (Gulevich et al., 2001). Τα ριβοσώματα αντί να «σαρώνουν» κατά μήκος την 5'- UTR για τον εντοπισμό των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης, χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμευσης στο 5'- άκρο (Internal Ribosome Entry Site – IRES), όπου προσδέεται η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος και ξεκινάει η μετάφραση.

Στην έναρξη της μετάφρασης των εντεροϊών εμπλέκονται οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης (eIFs), που κανονικά εμπλέκονται στην cap-εξαρτώμενη μετάφραση, με εξαίρεση την πρωτεΐνη eIF4E (Ochs et al., 2002). Μετά τη μόλυνση από εντεροϊό παρατηρείται κόψιμο του παράγοντα eIF4G1, και έτσι προκύπτει ένα N – τελικό και ένα C – τελικό τμήμα. Το C – τελικό τμήμα του eIF4G1 περιέχει θέσεις πρόσδεσης για τους παράγοντες eIF3 και

eIF4A (Lamphear et al., 1995). Το ιικό RNA συνδέεται απευθείας με τον παράγοντα eIF4G1, στην περιοχή IRES, και στρατολογεί τους παράγοντες eIF3 και eIF4A, μέσω της αλληλεπίδρασης με το C – τελικό τμήμα του eIF4G1, σχηματίζοντας το σύμπλοκο eIF4F. Στη συνέχεια, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S, σε σύμπλοκο με τους παράγοντες eIF1A και eIF2-GTP-Met-tRNA, συνδέεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F – ιικό RNA, δημιουργώντας το 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο (εικόνα 8). Το σύμπλοκο αυτό, κινείται με κατεύθυνση 5' – 3' κατά μήκος του IRES, ώσπου να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης (Prevot et al., 2003).

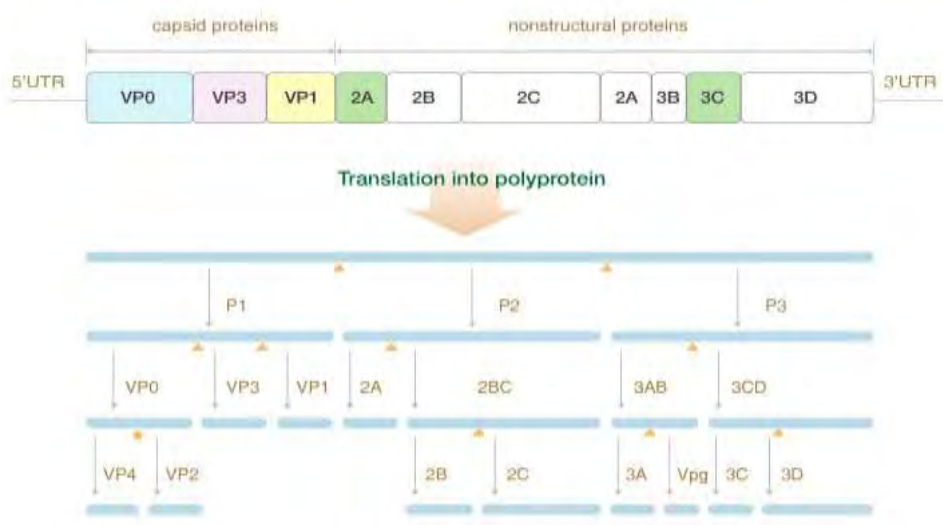
Εκτός από τους παράγοντες eIFs, στο στοιχείο IRES των εντεροϊών προσδένονται και κάποιες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες ενισχύουν τη μετάφραση ή ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί τέσσερις πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: η πρωτεΐνη των 57 kDa που προσδέεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract – Binding protein), το αυτοαντιγόνο La των 52 kDa (La auto antigen), η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP (Poly(rC) Binding Protein) και η πρωτεΐνη Unr (Upstream of N-Ras) (εικόνα 8) (Ochs et al., 2002).



Εικόνα 8: Οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης και η πρόσδεσή τους στο στοιχείο IRES.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης ORF μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται παράγοντας τις δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Για τον τεμαχισμό της πολυπρωτεΐνης, είναι υπεύθυνες οι ικές

πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro}, οι οποίες κωδικοποιούνται από τον ιό. Η πρώτη τομή δημιουργεί την P1 περιοχή, που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του καψιδίου, και καταλύεται από την πρωτεάση 2A^{pro} (εικόνα 9). Το δεύτερο βήμα της πρωτεολυτικής διάσπασης καταλύεται από τις πρωτεάσες 3C^{pro} και 3CD^{pro} και είναι απαραίτητο για τη δημιουργία των δομικών πρωτεϊνών από την P1 περιοχή και των λειτουργικών πρωτεϊνών από τις P2 και P3 περιοχές. Τέλος, η VP0 διασπάται αυτοκαταλυτικά στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες (Pfister et al., 1999). Αυτό το τελευταίο στάδιο είναι απαραίτητο για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων και γι' αυτό αναφέρεται ως διαδικασία ωρίμανσης.



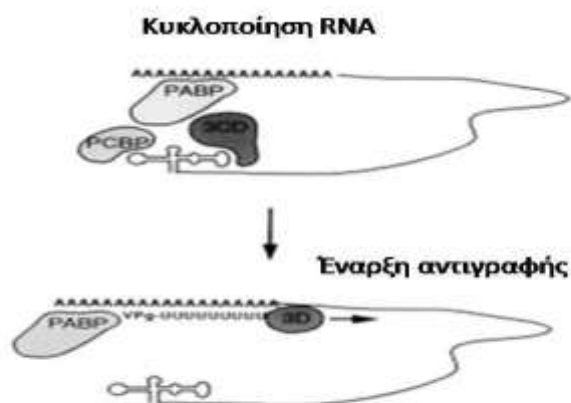
Εικόνα 9: Πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης.

4.4. Αντιγραφή του ιικού RNA

Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γενώματος, το ιικό RNA χρησιμεύει σαν μήτρα για την παραγωγή ενός συμπληρωματικού μορίου RNA (-) πολικότητας, το οποίο στη συνέχεια δρα ως εκμαγείο για τη σύνθεση των νέων κλώνων (+) πολικότητας (Murray K. E and Barton D.J., 2003). Ένα μοντέλο αντιγραφής του RNA, θα μπορούσε να είναι το εξής μονοπάτι: RNA (+) → RNA (-) → RNA (+).

Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο του κυττάρου – ξενιστή. Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου απαιτεί την κυκλοποίηση του γενώματος μέσω της δημιουργίας ενός συμπλόκου αντιγραφής στο οποίο συμμετέχουν οι πρωτεΐνες RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, 3CD^{pro}, PCBP, PABP (Poly(A) Binding Protein) καθώς και οι δομές 5' cloverleaf και 3' UTR του ιικού γενώματος.

Πιο συγκεκριμένα, η ιική πολυμεράση 3D^{pol}, που περιέχεται στο πεπτίδιο 3CD προσδένεται μαζί με τον κυτταρικό παράγοντα PCBP στη δομή cloverleaf του 5' άκρου. Η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών 3CD, PCBP, και PABP φέρουν κοντά το 3' και το 5' άκρο, προκαλώντας την κυκλοποίηση του ιικού RNA (εικόνα 10). Παράλληλα, η μικρή πρωτεΐνη VPg ουριδιλιώνεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο τυροσίνης, ώστε να προκύψει η μορφή VPgrUpU. Το αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων είναι να πλησιάσει η 3D^{pol} στην poly(A) ουρά του 3' άκρου, επιτρέποντας τη δημιουργία της VPgrUpU και την έναρξη της σύνθεσης του κλώνου RNA (-) πολικότητας (Herold and Andino, 2001). Το VPgrUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινήτης και για τη σύνθεση του RNA (+) πολικότητας. Για τη σύνθεση των κλώνων (+) πολικότητας χρησιμοποιείται διαφορετικός μηχανισμός ουριδιλίωσης της πρωτεΐνης VPg (Goodfellow et al., 2000).

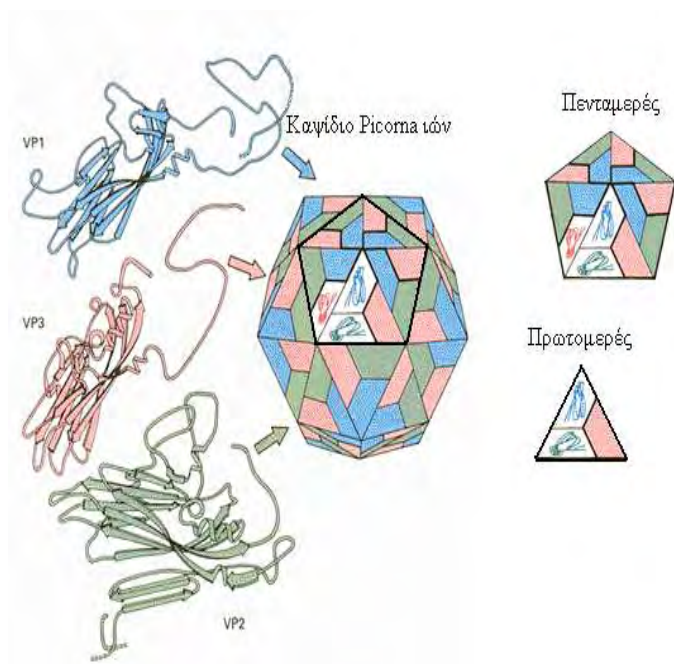


Εικόνα 10: Μοντέλο κυκλοποίησης του ιικού RNA, κατά την αντιγραφή των εντεροϊών.

4.5. Συναρμολόγηση νέων ιικών σωματιδίων – Καψιδίωση

Η διαδικασία της συναρμολόγησης περιλαμβάνει τη συλλογή όλων των συστατικών που είναι απαραίτητα για το σχηματισμό του ιικού καψιδίου σε μια συγκεκριμένη θέση στο κύτταρο. Στους εντεροϊούς η συναρμολόγηση γίνεται στο κυτταρόπλασμα και είναι άμεσα συνδεδεμένη με την αντιγραφή του ιικού RNA. Το στοιχείο IRES φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην είσοδο του RNA στο καψίδιο (Gromeier et al., 1996) και η όλη διαδικασία φαίνεται να εξαρτάται και από άλλους παράγοντες, όπως η VPg.

Το πρώτο στάδιο της συναρμολόγησης του ιικού καψιδίου περιλαμβάνει την διάσπαση της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης από την 3CD^{pro} και τη δημιουργία ενός πρωτομερούς αποτελούμενο από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Στη συνέχεια, τα πρωτομερή συναρμολογούνται σε πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)₅], που είναι απαραίτητα για την καψιδίωση του RNA των εντεροϊών. Δώδεκα πενταμερή [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂ απαιτούνται για την κατασκευή ενός εικοσαεδρικού «προκαψιδίου» (εικόνα 11) (Pfister et al., 1999).



Εικόνα 11 : Δομή του καψιδίου των Picorna ιών. Αποτελείται από 12 πενταμερή όπου το κάθε πενταμερές περιλαμβάνει 5 πρωτομερή των πρωτεϊνών VP1, VP3 και VP0 (VP2 + VP4).

4.6. Ωρίμανση των νέων ιικών καψιδίων

Η ωρίμανση των ιικών καψιδίων αποτελεί το στάδιο του κύκλου ζωής των εντεροϊών, κατά το οποίο ο ιός γίνεται μολυσματικός. Η ωρίμανση περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο ιικό σωματίδιο που προκύπτουν από την πρωτεολυτική διάσπαση ορισμένων πρωτεϊνών του καψιδίου. Πιο συγκεκριμένα, η δημιουργία των ώριμων ιικών σωματιδίων συνοδεύεται από την πρωτεολυτική διάσπαση της VP0 σε VP2 και VP4, η οποία φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και τη μολυσματικότητα του ιού (Curry et al., 1997).

4.7. Απελευθέρωση των νέων ιικών σωματιδίων για μόλυνση νέων κυττάρων

Κατά τη διάρκεια της μόλυνσης η διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης των κυττάρων εμποδίζεται από την πρωτεάση 2A, η οποία προκαλεί ρήγμα σε έναν από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης του γενετικού υλικού (Hellen et al., 1991). Επομένως, η διαδικασία πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου τερματίζεται και μόνο οι ιικές πρωτεΐνες

συνθέτονται στο προσβεβλημένο κύτταρο, αφού οι *Picorn* ιοί πραγματοποιούν την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσής τους ανεξάρτητα από το σχηματισμό της καλύπτρας. Συνεπώς, λόγω της αναστολής των διαδικασιών της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου – ξενιστή και λόγω του μεγάλου αριθμού των ιών που παράγονται ανά κύτταρο, ο ξενιστής τελικά καταστρέφεται, επιτρέποντας την απελευθέρωση των ιών.

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η είσοδος των εντεροϊών γίνεται από το στόμα και η μόλυνση προχωρά μέσω του πεπτικού συστήματος. Εξάιρεση αποτελούν ο ιός Coxsackie A21 (CAV21), ο οποίος μεταδίδεται κυρίως από εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος, και ο εντεροϊός 70 (EV70), ο οποίος εκκρίνεται στα δάκρυα και μεταδίδεται μέσω των δακτύλων και των κοπράνων (Kipre and Howley, 2007). Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό των εντεροϊών στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο, προκαλείται αιμία, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού 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. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, σε άτομα που έχουν είτε κλινικές είτε υποκλινικές ενδείξεις, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών (Melnick J.L., 1990).

Κάθε εντεροϊός έχει και το δικό του όργανο-στόχο. Δύο ή περισσότεροι εντεροϊοί μπορούν να πολλαπλασιαστούν ταυτόχρονα στο πεπτικό σύστημα, αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες, ο πολλαπλασιασμός του ενός ιού μπορεί να είναι ανταγωνιστικός έναντι των άλλων (Σιαφάκας και συν. 1999).

Γενικά, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα μέλη της ομάδας των εντεροϊών στον άνθρωπο, ποικίλουν σε μεγάλο βαθμό και χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό ποσοστό υποκλινικών ενδείξεων. Οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές και γι' αυτό οι εντεροϊοί θεωρούνται από πολλούς ως μη σημαντικοί για να βρεθούν στο επίκεντρο συστηματικής έρευνας. Παρόλα αυτά, οι εντεροϊοί προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων, ως αποτέλεσμα της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου, των

σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών (Muir et al., 1998). Αν και κάποιοι εντεροϊοί είναι πιο συχνά υπεύθυνοι για περιστατικά επιδημιών που αφορούν ένα συγκεκριμένο σύνδρομο, σε άλλες παραμέτρους τόπου και χρόνου οι ίδιοι ορότυποι εντεροϊών μπορεί να εμπλέκονται σε σποραδικές ή επιδημικές λοιμώξεις, οι οποίες έχουν εντελώς διαφορετικές κλινικές ενδείξεις ή καθόλου συμπτώματα. Οι εντεροϊοί είναι υπεύθυνοι για τις εξής ασθένειες:

- Οξεία μυοκαρδίτιδα (Brown E. H., 1973)
- Ασηπτική μηνιγγίτιδα (Brown E. H., 1973)
- Παραλυτική πολιομυελίτιδα (Brown E. H., 1973)
- Διατακτική καρδιομυοπάθεια (Baboonian et al., 1997)
- Σακχαρώδης διαβήτης τύπου I (Dotta et al., 2007)
- Ασθένειες του αναπνευστικού (Oberste et al., 2004)
- HFMD (Hand Foot Mouth Disease) (Chan et al., 2003)

6. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Παρά την ευρέως διαδεδομένη φύση των λοιμώξεων από εντεροϊούς και την μεγάλη ποικιλία των κλινικών τους συμπτωμάτων, υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες όπως η ηλικία, το φύλο και η κοινωνικο-οικονομική κατάσταση, που παίζουν σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού (Knipe and Howley, 2007). Οι εντεροϊοί μεταδίδονται σε συνθήκες φτωχής υγιεινής και μπορούν να επιζήσουν ακόμα και σε συνθήκες εξαιρετικά χαμηλών εξωτερικών θερμοκρασιών το χειμώνα. Σε τροπικά κλίματα προσβάλλουν ανθρώπους ενεργά όλες τις εποχές του χρόνου, αλλά σε ψυχρότερα κλίματα οι εξάρσεις των ασθενειών συμβαίνουν συχνότερα το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Σε αναπτυσσόμενες περιοχές, όπου το κοινωνικο-οικονομικό υπόβαθρο είναι χαμηλό, οι μολύνσεις από εντεροϊούς είναι εξαιρετικά διαδεδομένες. Όσον αφορά την ηλικία των προσβαλλόμενων ατόμων, πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς είναι τα άτομα μικρής ηλικίας, τα οποία είναι λιγότερο πιθανό να έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις.

Έχει παρατηρηθεί ότι και το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση του ιού. Φαινομενικά, οι λοιμώξεις από εντεροϊούς κυριαρχούν μεταξύ των ανδρών. Μετά από μετρήσεις των λοιμώξεων που έγιναν με βάση τον πληθυσμό (π.χ. ορολογικές έρευνες), οι οποίες ήταν ανεξάρτητες από το φύλο των προσβαλλόμενων ατόμων, έδειξαν μια αυξημένη τάση των ανδρών να μολύνονται από εντεροϊούς. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει

επειδή εκτίθενται περισσότερο στο παθογόνο σε σχέση με τα θηλυκά άτομα, ίσως λόγω διαφορών στη μεταχείριση των γονέων ως προς τις συνθήκες παιχνιδιού των νεαρών αγοριών. Εκτός από αυτό, οι άνδρες είναι πιο πιθανό να αναπτύξουν σοβαρή ασθένεια, λόγω μόλυνσης από εντεροϊό, σε σχέση με το γυναικείο φύλο. Για παράδειγμα, ο λόγος που η μυοκαρδίτιδα είναι πιο συχνή σε ενήλικους και έφηβους άνδρες σε σχέση με τις αντίστοιχες ηλικίες των γυναικών (εκτός από εγκύους), μπορεί να οφείλεται σε ενδοκρινείς ενέργειες που σχετίζονται με το φύλο, οι οποίες οδηγούν σε διαφορές ως προς την ευαισθησία στη μόλυνση από εντεροϊούς (Wong et al., 1977).

7. ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Οι εντεροϊοί απομονώνονται από τον κατώτερο και ανώτερο πεπτικό σωλήνα και μπορούν να μεταδοθούν μέσω της κοπρανοστοματικής οδού (όταν το παθογόνο από τα κόπρανα του ενός ξενιστή εισαχθεί στη στοματική κοιλότητα ενός άλλου πιθανού ξενιστή) αλλά και μέσω της αναπνευστικής οδού. Η μετάδοση του ιού μέσω της κοπρανοστοματικής οδού επικρατεί σε αναπτυσσόμενες περιοχές με φτωχές συνθήκες υγιεινής, ενώ η μετάδοση μέσω του αναπνευστικού επικρατεί σε αναπτυγμένες περιοχές. Η σχετική σημασία των διαφορετικών τρόπων μετάδοσης του ιού, πιθανόν να ποικίλλει ανάλογα με το στέλεχος του εντεροϊού και το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται (Meijer et al., 2012).

Αν και οι ανθρώπινοι εντεροϊοί έχουν κατά καιρούς απομονωθεί από διάφορες περιβαλλοντικές πηγές, οι άνθρωποι θεωρείται ότι αποτελούν τη σημαντικότερη φυσική δεξαμενή αυτών των ιών (Feachem et al., 1981). Οι εντεροϊοί μπορούν να επιβιώσουν στο περιβάλλον για εβδομάδες σε συνθήκες με ουδέτερο pH, υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία, κυρίως με την παρουσία οργανικής ύλης, η οποία τους προστατεύει από την αδρανοποίηση (Knipe and Howley, 2007).

Η έκκριση των εντεροϊών στο περιβάλλον, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, γίνεται μέσω των κοπράνων μολυσμένων ατόμων, είτε είναι συμπτωματικά είτε όχι. Γι' αυτό το λόγο, τα λύματα και τα υγρά και στερεά απόβλητα αποτελούν σημαντικές πηγές απομόνωσης εντεροϊών από το περιβάλλον. Μελέτες έχουν δείξει ότι, τα λύματα και τα στερεά και υγρά απόβλητα μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, διότι μετά την επεξεργασία τους απορρίπτονται σε ποτάμια, λίμνες και θάλασσες με αποτέλεσμα οι εντεροϊοί να επανέρχονται στην τροφική αλυσίδα (Griffin et al., 2003).

Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από επιφανειακά και υπόγεια νερά. Ακόμη και μετά την χλωρίωση, είναι πιθανό να βρεθούν στα νερά των πισινών. Στις βιομηχανοποιημένες περιοχές η μετάδοση των εντεροϊών μέσω του πόσιμου νερού είναι φαινομενικά ασυνήθης, αλλά αποτελεί ανησυχία για τους ερευνητές που ασχολούνται με τη δημόσια υγεία, επειδή οι συνθήκες χλωρίωσης του πόσιμου νερού ίσως να μην είναι επαρκείς για την αδρανοποίηση των εντεροϊών (Knipe and Howley, 2007).

Εντεροϊοί έχουν επίσης απομονωθεί από ωμά ή μερικώς μαγειρεμένα μαλάκια και οστρακόδερμα και τα υπερκείμενα νερά τους (Dubois et al., 2004; Umeshia et al., 2008). Τα οστρακόδερμα συγκεντρώνουν πολλούς ιούς, συμπεριλαμβανομένων των εντεροϊών, οι οποίοι μπορούν να επιβιώσουν σε στρείδια για 3 εβδομάδες σε θερμοκρασίες 1-21°C. Ευνοϊκές συνθήκες για την ανάπτυξη των εντεροϊών παρέχουν και το χώμα και οι καλλιέργειες. Οι εντεροϊοί επιβιώνουν σε λάσπες, σε χώμα που έχει επεξεργαστεί με λάσπες, ακόμη και στις ίδιες τις καλλιέργειες (Moore et al., 1979). Ωστόσο, η επιβίωση των εντεροϊών στα λαχανικά που εκτίθενται σε μολυσμένα νερά ή λιπάσματα, δεν έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται με την μετάδοση του ιού.

Υπάρχουν αρκετοί προφανείς λόγοι που αποδεικνύουν ότι είναι σημαντικό να μελετούμε τους εντεροϊούς στο περιβάλλον. Οι κυριότεροι λόγοι είναι οι εξής:

- Η παρακολούθηση των κυκλοφορούντων στελεχών εντεροϊών στον πληθυσμό που μελετάμε (Aw and Gin, 2010).
- Ο έλεγχος της δραστηριότητας των εμβολιασμών σε επιδημίες πολιομυελίτιδας (Lodder et al., 2012).
- Η ανίχνευση και η απομόνωση αγρίων στελεχών πολιοϊών σε πληθυσμούς απαλλαγμένους από πολιοϊούς αγρίου τύπου (Grabow et al., 1999).

Εκτός από τα ανωτέρω, το περιβάλλον αποτελεί μια ανεξάντλητη δεξαμενή γενετικής ετερογένειας εντεροϊών, η παρακολούθηση του οποίου μπορεί να μας δώσει πληροφορίες όσον αφορά:

- την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των εντεροϊών (Apostol et al., 2012)
- την παροχή βαθύτερης γνώσης γύρω από την ταξινόμηση των εντεροϊών (Knipe and Howley, 2007).

8. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ, ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

8.1 Κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα

Η ανίχνευση εντεροϊών στο πεπτικό σύστημα (από φαρυγγικά επιχρίσματα, πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων) ενδείκνυται για τη διάγνωση λοιμώξεων από εντεροϊούς. Η ισχυρότερη ένδειξη λοίμωξης παρέχεται από την απομόνωση εντεροϊών από προσβεβλημένα όργανα και τα συσχετιζόμενα υγρά του σώματος, όπως είναι το εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Η απομόνωση από δείγματα αίματος σε καταστάσεις ιαιμίας είναι επίσης χρήσιμη σε περιπτώσεις συστηματικών μολύνσεων. Όσον αφορά τα περιβαλλοντικά δείγματα, μεγάλοι όγκοι πόσιμου νερού από ποτάμια, λίμνες και θάλασσες έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση εντεροϊών, αλλά τα λύματα θεωρούνται η καταλληλότερη πηγή απομόνωσης, λόγω της παρουσίας μεγαλύτερης συγκέντρωσης κοπράνων που αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών (Muir et al., 1998).

8.2 Κυτταρικές σειρές

Οι παραδοσιακές τεχνικές ανίχνευσης και απομόνωσης εντεροϊών περιλαμβάνουν τις χρονοβόρες διαδικασίες της απομόνωσης ενός ιού από μια κυτταροκαλλιέργεια ή της εξουδετέρωσης της δράσης των ιών με τη χρήση αντιορών. Η διαδικασία απομόνωσης ενός εντεροϊού βασίζεται στον ενοφθαλμισμό κατάλληλων δειγμάτων σε δεκτικές κυτταρικές σειρές. Η επιλογή της κυτταρικής σειράς που θα χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των εντεροϊών είναι αρκετά σημαντική, διότι δεν πολλαπλασιάζονται όλοι οι ορότυποι των εντεροϊών στην ίδια κυτταρική σειρά. Συνήθως χρησιμοποιούνται πολλοί διαφορετικοί συνδυασμοί κυτταρικών σειρών, για να αυξηθεί το φάσμα των ιών που μπορεί να ανιχνευθούν (Knipe and Howley, 2007). Αρκετοί ορότυποι των Coxsackie A ιών αν και μπορούν να απομονωθούν και να πολλαπλασιαστούν με ενοφθαλμισμό σε νεογνά ποντίκια, αδυνατούν να αναπτυχθούν σε κυτταρικές σειρές (Muir et al., 1998). Οι σημαντικότερες κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση εντεροϊών είναι τα κύτταρα RD (κύτταρα ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος), τα κύτταρα HEP-2 (κύτταρα ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος) και η L₂₀B κυτταρική σειρά (κύτταρα ποντικού που έχουν ανασυνδυαστεί για να εκφράζουν τον ανθρώπινο υποδοχέα των πολιοϊών, PVR) (Knipe and Howley, 2007).

8.3 Οροτυπική ταυτοποίηση

Η ταυτοποίηση των εντεροϊών μπορεί να γίνει με εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντιορούς. Υπάρχουν τουλάχιστον 66 γνωστοί ορότυποι εντεροϊών και δεν θα ήταν πρακτικό να χρησιμοποιηθεί η διαδικασία της εξουδετέρωσης για όλους τους πιθανούς αντιορούς ξεχωριστά. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, χρησιμοποιούνται μείγματα αντιορών που έχουν παραχθεί σε άλογα, που περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς αντισωμάτων (Muir et al., 1998). Η μέθοδος των Lim Benyesh – Melnick (LBM) αποτελείται από οχτώ μείγματα αντιορών (από το Α έως το Η), τα οποία περιέχουν εξουδετερωτικούς ορούς για 42 διαφορετικούς τύπους εντεροϊών (Melnick et al., 1973). Αν δεν μπορεί να επιτευχθεί η ταυτοποίηση των δειγμάτων με τα παραπάνω μείγματα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν επτά επιπρόσθετοι αντιοροί (από J έως P), οι οποίοι περιέχουν επιπλέον αντισώματα εναντίον 19 οροτύπων ιών Coxsackie A. Αυτή η μέθοδος ταυτοποίησης είναι γενικά αξιόπιστη, αλλά μειονεκτεί στο ότι είναι αρκετά χρονοβόρα και απαιτητική. Αδυνατεί, επίσης, να ταυτοποιήσει νέα στελέχη εντεροϊών τα οποία δε μπορούν να αναγνωριστούν με τους ήδη υπάρχοντες αντιορούς. Για τους παραπάνω λόγους, οι μοριακές τεχνικές διάγνωσης που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), πλεονεκτούν έναντι των παραδοσιακών τεχνικών και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία (Muir et al., 1998).

8.4 Μοριακές τεχνικές

Οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων εντεροϊών επιτρέπουν τη χρήση μοριακών τεχνικών, όπως είναι η *in situ* υβριδοποίηση με τη χρήση cDNA ανιχνευτών και ο υβριδισμός με νουκλεϊκά οξέα, για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση δειγμάτων εντεροϊών (Rotbart H. A., 1991). Η πιο ευαίσθητη μέθοδος ανίχνευσης του γενετικού υλικού των εντεροϊών είναι η τεχνική της Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (RT – PCR), κατά την οποία το RNA του ιού μετατρέπεται *in vitro* σε cDNA. Η σύγκριση των δημοσιευμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος των εντεροϊών επέτρεψε την αναγνώριση εξελικτικά συντηρημένων περιοχών μεταξύ των διαφορετικών οροτύπων. Μια τέτοια περιοχή είναι η 5'UTR, στην οποία στοχεύουν τα εκκινητικά μόρια της PCR που χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση των εντεροϊών (Kyriakopoulou et al., 2012). Ωστόσο, εκτός από την ανίχνευση απαραίτητη είναι και η ταυτοποίηση των οροτύπων. Η ενδο-

οροτυπική ποικιλότητα στην 5'UTR είναι αρκετά μεγάλη ώστε να μπορέσουμε να συσχετίσουμε την περιοχή αυτή με τον ορότυπο (Oberste et al., 1999). Η ταυτοποίηση του οροτύπου κάθε εντεροϊού βασίζεται στην ενίσχυση με RT-PCR της VP1 καψιδικής περιοχής, αλληλούχιση της περιοχής αυτής και σύγκριση με τις αλληλουχίες (της VP1 περιοχής) των κατατεθειμένων εντεροϊών (Oberste et al., 1999). Για να καταλήξουμε στην οροτυπική ταυτοποίηση ενός εντεροϊού, θα πρέπει η νουκλεοτιδική ομοιότητα της αλληλουχίας της VP1 περιοχής να είναι >75% (>85% αμινοξική ομοιότητα) μεταξύ ενός δείγματος και του πρότυπου στελέχους, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει άλλο πρότυπο στέλεχος με ομοιότητα >70%. Εάν η νουκλεοτιδική ομοιότητα είναι <70%, τότε αναφερόμαστε σε νέο ορότυπο (Oberste et al., 2004).

9. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τη γενετική και βιολογική ποικιλομορφία των εντεροϊών είναι δύο: 1. οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιού και 2. ο γενετικός ανασυνδυασμός (Stanway G., 1990).

9.1. Μεταλλάξεις

Όπως όλοι οι RNA ιοί, έτσι και οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από την συσσώρευση σημειακών μεταλλάξεων που συμβαίνουν λόγω του υψηλού ποσοστού ενσωμάτωσης λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και της απουσίας μηχανισμών επιδιόρθωσης των λαθών αυτών (μηχανισμός proof-reading). Η απουσία ενός μηχανισμού ελέγχου της RNA πολυμεράσης για την πιστότητα της αντιγραφής του ιικού RNA οδηγεί σε ρυθμούς μεταλλάξεων πολύ μεγαλύτερους από αυτούς που παρατηρούνται κατά την αντιγραφή του DNA από τις αντίστοιχες DNA πολυμεράσες. Η συχνότητα λάθους υπολογίστηκε περίπου 10^{-4} έως 10^{-5} ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής (Stanway G., 1990). Η μεγάλη συχνότητα λαθών της RNA πολυμεράσης οδηγεί στη δημιουργία ετερογενών πληθυσμών. Ο όρος quasi-species (σχεδόν είδος) έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές (Domingo et al., 1985).

Η αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού είναι πιο συντηρημένη και παρουσιάζει μικρότερη ποικιλομορφία σε σχέση με την αλληλουχία που κωδικοποιεί για τις δομικές πρωτεΐνες. Οι καψιδικές πρωτεΐνες (συγκεκριμένα η VP1, VP2

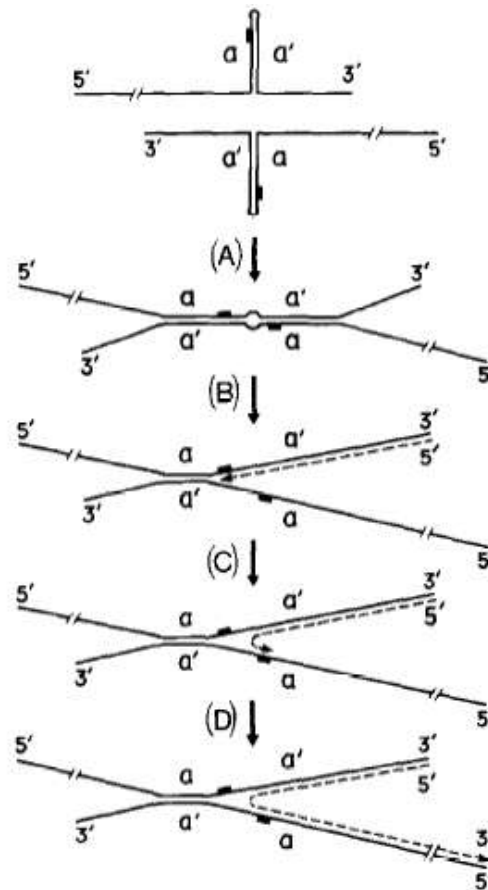
και η VP3) εξελίσσονται πιο γρήγορα λόγω της ισχυρής εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (Muir et al., 1998). Γι' αυτό το λόγο, οι καψιδικές πρωτεΐνες θεωρούνται οι σημαντικότεροι παράγοντες της εξέλιξης των εντεροϊών, σε σύγκριση με την 5'UTR, η οποία παρουσιάζει τους χαμηλότερους ρυθμούς εξέλιξης.

9.2. Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός, δηλαδή η ανταλλαγή νουκλεοτιδικών αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών μορίων RNA, παρατηρήθηκε πρώτη φορά σε κύτταρα μολυσμένα με πολιοϊό (Hirst G., 1962), αλλά γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών (Lukashev A., 2005). Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον βαθμό ομολογίας των πατρικών κλώνων RNA (Knipe and Howley, 2007). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στον γενετικό ανασυνδυασμό, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard and Baltimore, 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

- **Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (ή αντιγραφικός μηχανισμός):** Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, η 3D πολυμεράση ξεκινά τη σύνθεση ενός ιικού RNA και ξαφνικά σταματά, αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή χρησιμοποιώντας ως εκμαγείο ένα άλλο ιικό RNA. Ο τερματισμός της επιμήκυνσης του αρχικού ιικού RNA οφείλεται στο ότι η 3D πολυμεράση συναντά κάποιο εμπόδιο και αποδεσμεύεται. Το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια δευτεροταγής δομή RNA (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου στο νεοσυντιθέμενο ιικό RNA (Piliipenko et al., 1995).

- **Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (ή μη αντιγραφικός μηχανισμός):** Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, τα μόρια του RNA κόβονται σε κάποια σημεία και τα εκτεθειμένα τους άκρα ενώνονται. Με άλλα λόγια, ένα ανασυνδυασμένο γονιδίωμα προκύπτει από τη σύνδεση τμημάτων RNA που προέρχονται από τη διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 12: Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού αλλαγής μήτρας. Οι μαύρες γραμμές αναπαριστούν τα δύο μόρια RNA. Οι δύο ανάστροφες επαναλήψεις παριστάνονται ως α και α'. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA (Romanova et al., 1986).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η γενωμική ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων εντεροϊών, στα πλαίσια μια προσπάθειας κατανόησης της εξέλιξής τους. Αρχικά έγινε ανίχνευση των εντεροϊών στα περιβαλλοντικά δείγματα με μοριακές τεχνικές που στοχεύουν στην 5'UTR και ακολούθησε η απομόνωση και η ταυτοποίηση των ιών αυτών, με τελικό στόχο τη νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη του γενώματος των ιών, βάσει κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Εξετάστηκαν συνολικά 14 περιβαλλοντικά δείγματα για την παρουσία εντεροϊών. Οι τύποι των δειγμάτων ήταν λύματα, αστικά λύματα και βοθρολύματα. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από τον Βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας (12 δείγματα), των Τρικάλων (1 δείγμα) και του Γενικού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (1 δείγμα). Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5) παρουσιάζεται η κωδικοποίηση, ο τύπος των δειγμάτων, ο τόπος προέλευσής τους, η ημερομηνία λήψης τους και η μέθοδος επεξεργασίας τους.

Τα περιβαλλοντικά δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί επεξεργασία, σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου, με τις μεθόδους: διαχωρισμού δύο φάσεων (two phase separation method, 2psm) ή προσρόφησης – έκλουσης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα για να αυξηθεί η συγκέντρωση του ιού στα δείγματα αυτά.

ΔΕΙΓΜΑ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ
LR2	8/9/2005	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	Φίλτρα
LR7	4/7/2006	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	2psm
LR13	14/2/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Αστικά λύματα	2psm
LRB2	1/8/2007	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας	Βοθρολύματα	Φίλτρα
GN1	21/9/2006	Βιολ. Καθαρισμός Τρικάλων	Λύματα	Φίλτρα
TR1	15/9/2006	Βιολ. Καθαρισμός Γ.Π.Ν. Ιωαννίνων	Αστικά λύματα	Φίλτρα
EIS6	17/6/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/είσοδος	Λύματα	Φίλτρα
AB7	17/6/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/είσοδος	Λύματα	Φίλτρα
AB8	9/7/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/Α'βαθμια	Λύματα	Φίλτρα
AB9	9/7/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/Α'βαθμια	Λύματα	Φίλτρα
AB10	17/6/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/Α'βαθμια	Λύματα	Φίλτρα
EX12	9/7/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/έξοδος	Λύματα	Φίλτρα
AB18	5/8/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/Α'βαθμια	Λύματα	Φίλτρα
AB19	5/8/2009	Βιολ. Καθαρισμός Λάρισας/Α'βαθμια	Λύματα	Φίλτρα

Πίνακας 5: Πληροφορίες περιβαλλοντικών δειγμάτων.

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

2.1. Ενοφθαλμισμός περιβαλλοντικών δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες

Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση των εντεροϊών ήταν: η κυτταρική σειρά RD (κύτταρα ραβδομυοσαρκώματος) και η κυτταρική σειρά HEP-2 (κύτταρα ανθρώπινου επιδερμικού καρκινώματος). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε άσηπτες συνθήκες σε θάλαμο καθέτου νηματικής ροής επιπέδου βιοασφάλειας 2 και με τη χρήση αποστειρωμένων υλικών.

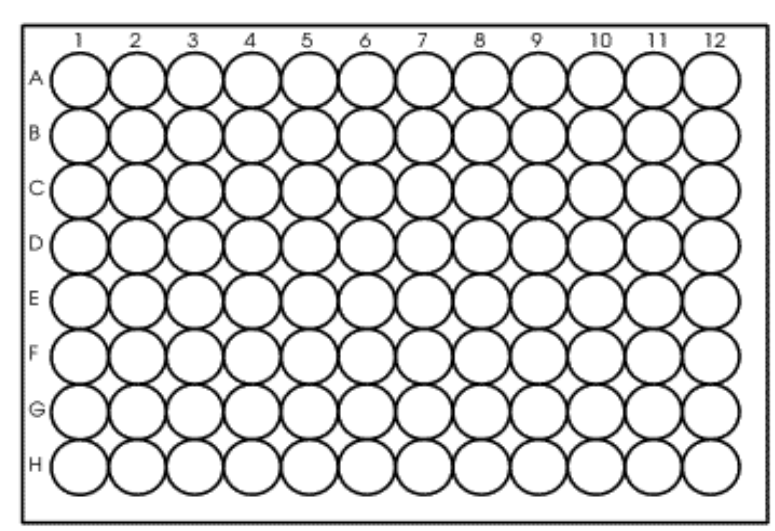
Για την επιτυχημένη μόλυνση των κυττάρων ενοφθαλμίσαμε τα περιβαλλοντικά δείγματα στα κύτταρα εις διπλούν για κάθε δείγμα (σωλήνες A και σωλήνες B), σύμφωνα με την εξής μεθοδολογία: Σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας μεταφέρθηκαν 0,5 ml επεξεργασμένων περιβαλλοντικών δειγμάτων σε 2 ml θρεπτικού υλικού MEM χωρίς ορό (για την κυτταρική σειρά HEP-2) και D-MEM χωρίς ορό (για την κυτταρική σειρά RD). Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 2 h. Στη συνέχεια ανανεώθηκε το θρεπτικό υλικό στους σωλήνες A και B και όλοι οι σωλήνες μεταφέρθηκαν σε κλίβανο επώασης στους 37 °C, όπου τοποθετήθηκαν σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Οι σωλήνες εξετάζονταν καθημερινά, μέσω ανάστροφου μικροσκοπίου, για την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Όταν παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση, οι σωλήνες ψύχθηκαν στους -20 °C. Μετά την αρχική μόλυνση των κυττάρων ακολούθησαν τέσσερις ανακαλλιέργειες για την αύξηση του ιικού τίτλου.

2.2 Σειριακές αραιώσεις

Για να ελαχιστοποιηθεί η πιθανότητα να υπάρχουν μείγματα εντεροϊών μετά τον ενοφθαλμισμό των δειγμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες, έγιναν σειριακές αραιώσεις. Με τη διαδικασία αυτή, απομονώνεται ένα στέλεχος από ένα μείγμα ιών, το οποίο βρίσκεται στην υψηλότερη συγκέντρωση.

Αρχικά έγιναν αραιώσεις του κάθε δείγματος σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml (ependorf), που κυμάνθηκαν από 10^{-1} έως 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενοφθαλμισμός σε πλάκες μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων (Εικόνα 13) μεταφέροντας 100 μl από τους πλαστικούς σωλήνες που αντιπροσωπεύουν τις αραιώσεις από 10^{-1} έως 10^{-10} για κάθε δείγμα. Οι στήλες 11 και 12 αποτέλεσαν τους αρνητικούς

μάρτυρες. Οι πλάκες επωάστηκαν στους 37 °C. Η υψηλότερη συγκέντρωση του ιού στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση (CPE), ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικούς σωλήνες κυττάρων HEP-2 και RD, δημιουργώντας έτσι, ένα απόθεμα (stock) ικών στελεχών.



Εικόνα 13: Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων.

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του RNA των κυτταροκαλλιεργειών αλλά και των επεξεργασμένων περιβαλλοντικών δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Συγκεκριμένα, σε erpendorf των 2 ml αναμείχθηκαν 10 μl γλυκογόνου (100 mg/ml), 100 μl από κάθε δείγμα και 300 μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN). Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min, ώστε να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών, η αποδιάταξη των πρωτεϊνών και να απελευθερωθεί το ικό RNA. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20 °C), ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και τα erpendorf τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20 °C. Ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 500 μl παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 min στις 14.000 rcf στους 4 °C. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διπλά απεσταγμένου νερού (ddH₂O) ελεύθερου νουκλεασών. Το RNA των δειγμάτων αποθηκεύθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης:

4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

4. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι θετικής πολικότητας RNA, θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, ώστε να ακολουθήσει η ενίσχυση με PCR συγκεκριμένων περιοχών του γενώματος του ιού.

Σε eppendorf των 500 μl προστέθηκαν 5 μl RNA (από κάθε δείγμα) και 7 μl από το μείγμα (M1), το οποίο περιείχε τυχαίους εκκινητές HEPTAN (N7) (Metabion) (100 pmol), 10mM από κάθε dNTP και 5 μl ddH₂O. Στη συνέχεια τα δείγματα (eppendorf) φυγοκεντρήθηκαν και επωάστηκαν στους 65 °C για 5 min σε θερμοκυκλοποιητή. Αμέσως μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετήθηκαν στον πάγο και προστέθηκε το δεύτερο μείγμα (M2). Το M2 περιείχε 4 μl 5x first strand buffer, 2 μl 0,1M DTT, 1 μl ddH₂O, 0,5 μl RNase out (20 u/μl) καθώς και 100 u ένζυμο RT M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, USA). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση αρχικά στους 25 °C για 10 min, μετά στους 37 °C για 50 min και τέλος στους 70 °C για 15 min.

Εκτός από την αντίστροφη μεταγραφή με τυχαίους εκκινητές πραγματοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία με συγκεκριμένους αντικωδικούς εκκινητές, τους EUC2a και EUC2b, σε συγκέντρωση 10 pmol και σε θερμοκρασία επώασης 42 °C, πριν την εφαρμογή της PCR με τους εκκινητές EUC2 – EUC3a,b,c (Caro et al., 2001).

5. ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχυθούν συγκεκριμένες περιοχές μέσω PCR, προήλθαν κυρίως από την υπάρχουσα βιβλιογραφία αλλά σχεδιάστηκαν και κάποια ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος του EIS6B στελέχους (Echo 3), με τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer/>).

Τα εκκινητικά μόρια TS1/TS3 που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των εντεροϊών στοχεύουν στην συντηρημένη περιοχή 5'UTR. Για την αύξηση της ευαισθησίας χρησιμοποιήθηκε και ένας εσωτερικός αντικωδικός εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε στη semi-nested PCR. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια για την ανίχνευση των εντεροϊών, η θέση που αναγνωρίζουν πάνω στο γονιδίωμα των εντεροϊών, η πολικότητά τους και η αλληλουχία τους. Στους πίνακες 7 και 8, παρουσιάζονται τα ζεύγη εκκινητικών μορίων με τα οποία έγινε η ενίσχυση του στελέχους LRB2E και ολόκληρου του γονιδιώματος του EIS6B, αντίστοιχα.

ΟΝΟΜΑ	ΘΕΣΗ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5' – 3'	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
TS1	70 – 90	Sense	TACCCTTGACGCCTGTTTT	Kyriakopoulou et al., 2012
HEV-C-9	553 – 530	Antisense	GGACACCCAAAGTAGTCGGTTC	Kyriakopoulou et al., 2012
TS3	621 – 603	Antisense	TTCTCACCATAAGCAGCC	*

Πίνακας 6: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση των εντεροϊών. * Ο εκκινητής TS3 σχεδιάστηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας, στα πλαίσια προηγούμενων διπλωματικών εργασιών.

ΟΝΟΜΑ	ΘΕΣΗ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5' – 3'	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
TS1	70 – 90	Sense	TACCCTTGACGCCTGTTTT	Kyriakopoulou et al., 2012
3100R	3047 – 3025	Antisense	AARTIIGACCASCRCRTARAA	Lukashev et al., 2005

Πίνακας 7: Εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση 1175 nt του στελέχους LRB2E.

ΟΝΟΜΑ	ΘΕΣΗ	ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ 5' – 3'	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ
72437	1 – 20	Sense	TTAAAACAGCTCTGGGGTTG	Mulders et al., 1999
ENV2	451 – 469	Sense	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Bessaud et al., 2008
ENVflapR	459 – 474	Antisense	GGATTRGCCGCATTC	Afonina et al., 2007

HEV-C-10	499 – 521	Sense	GAGTAGGTTGTCGTAATGCGTA	*
HEV-C-11	820 – 798	Antisense	CGCTGTCTTTGTAGTAGTTGAT	*
BL1369	1369 – 1389	Sense	GAGGTTGTCGCAGCTTCTCT	Κυριακοπουλου et al., 2010
EIS6B 1496R	1496 – 1476	Antisense	GAGGTTTCCAACCTCCACAC	Παρούσα μελέτη
BR2580	2580 – 2560	Antisense	GGGAACCACTTGTGAGGTGT	Κυριακοπουλου et al., 2010
EUG3a	2946 – 2965	Sense	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Caro et al., 2001
EUG3b	2946 – 2965	Sense	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Caro et al., 2001
EUG3c	2946 – 2965	Sense	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Caro et al., 2001
BR3231	3231 – 3211	Antisense	GCTTTTACATACGGGCTAA	Κυριακοπουλου et al., 2010
EIS6B 3498F	3498 – 3519	Sense	CTACTGGCGTCTATTTTTGTG	Παρούσα μελέτη
EIS6B 4040R	4040 – 4032	Antisense	TTGCGATACCTTCTGCTT	Παρούσα μελέτη
CHR1	4284 – 4308	Sense	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Kottaridi et al., 2007
EUC2	4413 – 4433	Antisense	TTTGCACTTGAACCTGTATGTA	Caro et al., 2001
BL4709	4709 – 4729	Sense	TACATCCCATTGTGTTGG	Κυριακοπουλου et al., 2010
CHR3	5047 – 5065	Sense	CIACYCTWGARGCRCTVTT	Κυριακοπουλου et al., 2010
CHR2	5084 – 5061	Antisense	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	Kottaridi et al., 2007
EIS6B 5189R	5189 – 5171	Antisense	AAGCCAGCCCTTTTCCTT	Παρούσα μελέτη
EIS6B 5420F	5420 – 5439	Sense	ATGAAAAGAAACGCCAGCA	Παρούσα μελέτη
CHR4	5860 – 5841	Antisense	GACRTGAGIACHCCRCCRCA	Κυριακοπουλου

				et al., 2010
EIS6B 6622R	6622 – 6602	Antisense	TGCCCATCTAACATAACAGG	Παρούσα μελέτη
CHR5	6485 – 6507	Sense	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	Kyriakopoulou et al., 2010
CHR6	7250 – 7227	Antisense	GAAATCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Kyriakopoulou et al., 2010
HEV-B 481	7325 – 7356	Sense	ACCCTACYGYAYTAACCGAAC	Oberste et al., 2006
HEV-B 424	7389–7367	Antisense	CCGCACCGAAYGCGGAKAATTTAC	Oberste et al., 2006

Πίνακας 8: Εκκινητικά μόρια για την ενίσχυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους EIS6B.

* Ο εκκινητές HEV-C-10 και HEV-C-11 σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας – Ιολογίας, στα πλαίσια προηγούμενων διπλωματικών εργασιών.

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – PCR

Μετά την παραγωγή του cDNA, ακολουθεί η ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γονιδιώματος των ιών με τη χρήση ειδικών εκκινητικών μορίων. Η τεχνική αυτή ονομάζεται Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) λόγω του ενζύμου της αντίδρασης, την DNA πολυμεράση, η οποία είναι υπεύθυνη για τον πολλαπλασιασμό μιας γνωστής νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μέχρι και δισεκατομμύρια φορές μετά από 30-40 κύκλους. Για την ενίσχυση του τμήματος 1175 nt του στελέχους LRB2E χρησιμοποιήθηκε η Herculase Fusion II DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA), ενώ για όλες τις υπόλοιπες αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε η Paq5000 Polymerase (Agilent Technologies, USA).

6.1 PCR

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε erpendorf των 200 μl. Σε όλες τις αντιδράσεις το μείγμα αποτελείται από 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 50 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράση (Paq5000 Polymerase, Agilent Technologies, USA), 3 μl cDNA από κάθε δείγμα και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Σε κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του μορίου – στόχου στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, για 50 κύκλους, με συνθήκες διαφορετικές για κάθε ζεύγος εκκινητών (πίνακας 9). Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση για 5 min στους 72 °C.

6.2 semi-nested PCR

Για την ανίχνευση των εντεροϊών, έγιναν επίσης και αντιδράσεις semi-nested PCR. Δηλαδή το προϊόν της πρώτης αντίδρασης PCR χρησιμοποιήθηκε σαν υπόστρωμα για τη δεύτερη αντίδραση και ο ένας εκ των δύο εκκινητών (HEV-C-9) ήταν εσωτερικός του πρώτου ζεύγους των εκκινητών (TS1/TS3). Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl προϊόντος της PCR με το ζεύγος εκκινητών TS1/TS3, 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 25 pmol), 5 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq reaction buffer), 5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 2,5 units Taq DNA πολυμεράση (Pac5000 Polymerase, Agilent Technologies, USA), και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Σε κάθε αντίδραση semi-nested PCR πραγματοποιήθηκε ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του DNA στους 95 °C για 2 min. Ακολούθησαν τα εξής τρία στάδια: αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επιμήκυνσης, με συνθήκες διαφορετικές για κάθε ζεύγος εκκινητών. Το τελευταίο στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις ήταν μια επώαση για 5 min στους 72 °C.

Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 9) παρουσιάζονται οι συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για κάθε ζευγάρι εκκινητών.

ΖΕΥΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ PCR
TS1/TS3 (ανίχνευση)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54 °C για 40 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30 sec 20 κύκλοι
TS1/HEV-C-9 (ανίχνευση)	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40 °C για 40 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30 sec 40 κύκλοι
BL1369/BR2580	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 58 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min 40 κύκλοι

BL1369/BR3231	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1min κ 30 sec	40 κύκλοι
CHR5/ HEV-B-424	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 40 sec	50 κύκλοι
ENV2/EIS6B-1496R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 54 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min	50 κύκλοι
EIS6B-5420F/EIS6B-6622R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 48 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min	50 κύκλοι
HEV-C-10/HEV-C-11	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 40 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 30 sec	40 κύκλοι
HEV-B-481/HEV-B-424	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 42 °C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 10 sec	50 κύκλοι
72437/ENVflapR EIS6B-3498F/EIS6B-4040R BL4709/EIS6B-5189R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 20 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50 °C για 20 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 20 sec	50 κύκλοι
EUG3a,b,c/EUC2 CHR1/CHR2 CHR3/CHR4 CHR5/CHR6	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 20 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 45 °C για 1 min Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1 min	50 κύκλοι
TS1/3100R	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95 °C για 20 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 20 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 3 min	50 κύκλοι

Πίνακας 9: Συνθήκες της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για κάθε ζευγάρι εκκινητικών μορίων.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η εξέταση των αποτελεσμάτων της PCR έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε πηκτή αγαρόζης. Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζουμε ποιοτικά εάν ενισχύθηκε η περιοχή του DNA που μας ενδιαφέρει και εξακριβώνουμε ότι δεν πολλαπλασιάστηκαν, παράλληλα, μη ειδικά τμήματα DNA.

Η συγκέντρωση του πηκτώματος ήταν 2%. Συγκεκριμένα, για ένα πήκτωμα 2% διαλύονται 1,2 gr αγαρόζης σε 60 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (Tris Boric EDTA). Προστίθενται επίσης και 100 μl βρωμιούχου αιθιδίου (1 μg/ml), το οποίο ενσωματώνεται στο DNA και φθορίζει σε μήκος κύματος 290 nm. Αφού στερεοποιηθεί το πήκτωμα, φορτώνουμε 10 μl του κάθε προϊόντος της PCR αναμεμιγμένα με 2 μl χρωστικής. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε το 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε τάση 120 Volts περίπου για 1 h. Στη συνέχεια τοποθετείται σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto UV15, Fotodyne) και φωτογραφίζεται με Olympus digital camera.

8. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

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

9. ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ PCR ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Πριν την αλληλούχιση τμημάτων DNA, είναι απαραίτητο να έχει προηγηθεί μια διαδικασία απομόνωσης των ικών στελεχών για την αποφυγή ύπαρξης μειγμάτων, τα οποία δυσχεραίνουν τη διαδικασία της αλληλούχισης και την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων.

Στην περίπτωση δειγμάτων εντεροϊών που δεν ήταν εφικτή η καλλιέργεια του ιού και συνεπώς η διαδικασία των σειριακών αραιώσεων, χρησιμοποιήθηκε η διαδικασία της

μοριακής κλωνοποίησης. Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης, τα οποία θα αναλυθούν παρακάτω, είναι τα εξής: i) η *autonested PCR* με την *GoTaq Flexi DNA* πολυμεράση (Promega, USA), ii) ο καθαρισμός των προϊόντων της *autonested GoTaq PCR*, iii) η αντίδραση λιγάσης, iv) η παραγωγή δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, v) ο μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων και vi) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει, στον φορέα.

GoTaq PCR αντίδραση: Η αντίδραση της *GoTaq* πραγματοποιείται σε *erpendorf* των 200 μl. Το μείγμα αποτελείται από 2 μl εκκινητών (1 μl από τον καθένα, συγκέντρωσης 50 pmol), 10 μl *GoTaq Flexi buffer 5x*, 7,5 μl από μείγμα dNTPs με αρχική συγκέντρωση 10mM (Invitrogen, UK), 4 μl διαλύματος $MgCl_2$ 25mM, 1,25 units *GoTaq Flexi DNA* πολυμεράση (Promega, USA), 3 μl από το επιθυμητό PCR προϊόν και ddH₂O (ελεύθερο νουκλεασών) μέχρι τελικό όγκο 50 μl. Η αντίδραση ξεκινά με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95 °C για 2 min και ακολουθεί η εφαρμογή των ειδικών συνθηκών αποδιάταξης και υβριδοποίησης για το κάθε ζευγάρι εκκινητών. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει επώαση στους 72 °C για 5 min. Μετά από 20 – 25 κύκλους, τα προϊόντα της *GoTaq* καθαρίζονται, σύμφωνα με τη διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί, και εισάγονται σε έναν φορέα κλωνοποίησης.

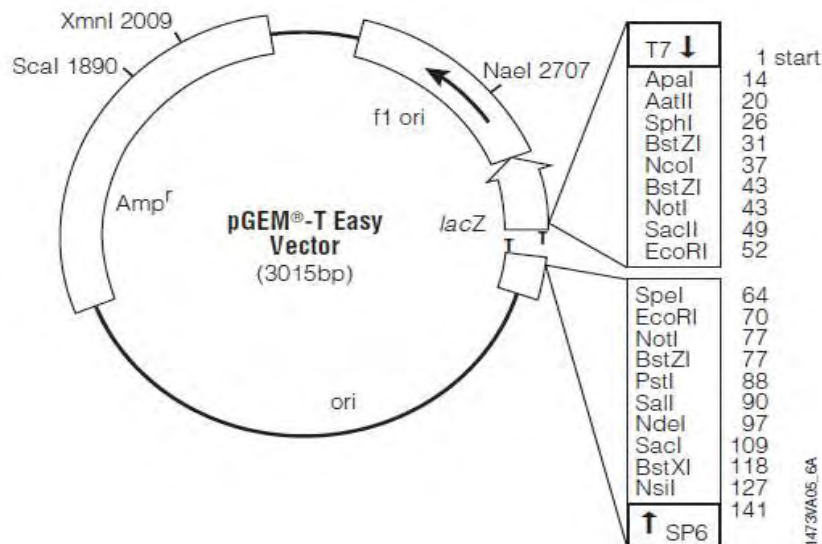
Αντίδραση λιγάσης: Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο *pGEM – T Easy Vector System* (Promega, USA) (Εικόνα 14), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1 μl *pGEM – T Easy Vector* (50 ng/ μl), 5 μl *2x Rapid Ligation Buffer*, 3 units *T4 DNA Ligase* (Promega, USA) και 150 ng προϊόντος της *GoTaq PCR*. Η αντίδραση πραγματοποιείται όλη τη νύχτα (*overnight*) στους 4 °C.

Δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων (με τη μέθοδο του χλωριούχου ασβεστίου – $CaCl_2$): Αρχικά συλλέγουμε βακτηριακά κύτταρα από το απόθεμα γλυκερόλης στους -80 °C, τα μεταφέρουμε υπό ασηπτικές συνθήκες σε 1 ml αποστειρωμένης καλλιέργειας *LB Broth* και επώάζονται στους 37 °C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (*overnight*). Την επόμενη μέρα, μεταφέρουμε από την καλλιέργεια αυτή, 1 ml σε 50 ml *LB Broth* και ακολουθεί επώαση στους 37 °C στις 210 στροφές/min για 2h. Για τον έλεγχο της ανάπτυξης των κυττάρων, μετράμε την απορρόφηση της καλλιέργειας στην οπτική πυκνότητα OD600. Όταν τα κύτταρα βρεθούν σε εκθετική φάση ανάπτυξης, δηλαδή όταν η απορρόφησή τους φτάσει στα 0,450 – 0,550 A, τότε σταματάμε την κυτταρική ανάπτυξη, τοποθετώντας τα

στον πάγο για 10 min. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε στις 4000rpm για 10 min στους 4 °C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 10 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M. Ακολουθεί ξανά φυγοκέντρηση στις 4000rpm για 10 min στους 4 °C και απορρίπτουμε το υπερκείμενο. Τέλος, επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 2 ml παγωμένου CaCl₂ 0,1 M.

Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων: Μετά τη δημιουργία δεκτικών βακτηριακών κυττάρων, θα πρέπει να μετασηματιστούν και να ενσωματωθεί σε αυτά ο ανασυνδυασμένος φορέας κλωνοποίησης. Η διαδικασία του μετασηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά (για κάθε δείγμα) 200 μl δεκτικών κυττάρων σε errendorf των 500 μl. Στη συνέχεια, προσθέτουμε τη μισή ποσότητα (5 μl) του προϊόντος της αντίδρασης λιγάσης και ανακινούμε ελαφρώς. Αφήνουμε τους πλαστικούς σωλήνες στον πάγο για 30 min, μετά τους τοποθετούμε σε υδατόλουτρο, προθερμασμένο στους 42 °C, για 90 sec ακριβώς και μετά ξανά στον πάγο για 2 min. Ακολουθεί η μεταφορά 200 μl μετασηματισμένων κυττάρων σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες των 15 ml με 800 μl LB Broth και επωάζουμε στις 180 στροφές/min στους 37 °C για 1h. Έπειτα επιστρώνουμε 200 μl κάθε καλλιέργειας σε τριβλίο με LB Agar εμπλουτισμένο με 100 μgr/ml αμπικιλίνη. Αφού προστέθηκαν 12 μl X – Gal (50 mg/ml, Promega, USA), ακολούθησε επώαση των τριβλίων στους 37 °C για όλη τη νύχτα (overnight). Την επόμενη μέρα συλλέχθηκαν 2 – 3 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τριβλίο και μεταφέρθηκαν σε 3 ml LB Broth με 100 μl/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν στους 37 °C στις 210 στροφές/min για όλη τη νύχτα (overnight). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση του πλασμιδιακού DNA με τη χρήση του Nucleospin Plasmid (Macherey – Nagel, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

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



Εικόνα 14: Ο φορέας κλωνοποίησης pGEM – T Easy Vector System (Promega, USA) και οι θέσεις κοπής του περιοριστικού ενζύμου EcoRI.

10. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

Τα δείγματα (κλωνοποιημένα και μη) στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία CEMIA (CEMIA, Greece). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των απλών δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές των αντίστοιχων αντιδράσεων PCR, ενώ για την αντίδραση αλληλούχισης των κλωνοποιημένων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν σαν εκκινητές οι προαγωγείς T7 και SP6 του πλασμιδιακού φορέα, που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του τμήματος DNA.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε διόρθωση των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με αλληλουχίες πρότυπων στελεχών εντεροϊών, με τη βοήθεια του BLAST. Ακολούθησε φυλογενετική ανάλυση ξεχωριστά για κάθε γονίδιο καθώς επίσης πραγματοποιήθηκε και επιδημιολογική μελέτη στη VP1 γενωμική περιοχή. Για την επεξεργασία και τη μελέτη των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν προγράμματα βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο, τα οποία περιγράφονται παρακάτω.

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

CLUSTALW: Το πρόγραμμα αυτό, που επίσης διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>), πραγματοποιεί στοίχιση των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών που μελετάμε. Τα αποτελέσματα των ομοπαράθεσεων χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων και τον υπολογισμό του ποσοστού ομοιότητας δύο ή περισσότερων νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών.

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

Mega V. 5: Το εργαλείο αυτό χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων των γενωμικών περιοχών των στελεχών που απομονώθηκαν. Η κατασκευή των δέντρων έγινε με βάση τον αλγόριθμο της Ένωσης Γειτόνων (Neighbor Joining – NJ), ο οποίος βασίζεται στην απόσταση. Χρησιμοποιεί, δηλαδή, το βαθμό της ανομοιότητας (απόστασης) ανάμεσα σε δύο στοιχισμένες ακολουθίες για να παράγει δέντρα. Τα φυλογενετικά δέντρα που προέκυψαν, αξιολογήθηκαν με τη μέθοδο bootstrap. Η τιμή bootstrap αποτελεί το μέτρο της επαναληπτικότητας του δέντρου. Συγκεκριμένα, δείχνει το πόσες φορές ένας συγκεκριμένος κλάδος εμφανίζεται στο δέντρο ύστερα από τη δημιουργία πολλών νέων συνόλων δεδομένων από το αρχικό σύνολο.

Simplot V. 3.5.1: Το πρόγραμμα αυτό διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο (<http://sray.med.som.jhmi.edu/SCRsoftware/simplot/>) και χρησιμοποιείται για την αναζήτηση και μελέτη ανασυνδυασμένων στελεχών. Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση είναι μία αλληλουχία αναφοράς, οι εξεταζόμενες αλληλουχίες και η μεταξύ τους ομοιότητα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ

Η ύπαρξη εντεροϊών ανιχνεύθηκε και στα 14 περιβαλλοντικά δείγματα που μελετήθηκαν. Από αυτά, μόνο ένα (στέλεχος EIS6B) απομονώθηκε με τη διαδικασία των σειριακών αραιώσεων και το οποίο και ταυτοποιήθηκε, επειδή στα υπόλοιπα δεν ήταν εφικτή η καλλιέργεια του ιού. Για την ενίσχυση και απομόνωση των υπόλοιπων ιικών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (κυρίως PCR και μοριακή κλωνοποίηση). Η ταυτοποίηση του EIS6B πραγματοποιήθηκε με αλληλούχιση και σύγκριση της VP1 γενωμικής περιοχής με αντίστοιχες VP1 καψιδικές περιοχές από πρότυπα στελέχη εντεροϊών, που είναι καταχωρημένα στην διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών GenBank. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη εισαγωγή, για να καταλήξουμε στην οροτυπική ταυτοποίηση ενός εντεροϊού, θα πρέπει η νουκλεοτιδική ομοιότητα της αλληλουχίας της VP1 περιοχής να είναι >75% μεταξύ ενός δείγματος και του πρότυπου στελέχους (Oberste et al., 1999). Η προϋπόθεση είναι ότι δεν θα πρέπει να υπάρχει άλλο πρότυπο στέλεχος με ομοιότητα που να ξεπερνά το 70%. Εάν η νουκλεοτιδική ομοιότητα είναι <70%, τότε αναφερόμαστε σε νέο ορότυπο (Oberste et al., 2004).

Συγκεκριμένα, με σειριακές αραιώσεις απομονώθηκε το στέλεχος EIS6B, το οποίο ταυτοποιήθηκε ως Echo 3. Ακολούθησε αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος του ιού και γενωμική ανάλυση. Με τη χρήση μοριακών τεχνικών ενισχύθηκε, κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε τμήμα του στελέχους LRB2E, στο οποίο όμως, δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση γιατί το τμήμα αυτό δεν περιείχε την VP1 γενωμική περιοχή.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LRB2E

Κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε ένα τμήμα 1175 νουκλεοτιδίων του στελέχους LRB2E. Η σύγκριση και στοίχιση του τμήματος αυτού με πρότυπα στελέχη εντεροϊών έδειξαν ότι η αλληλουχία αντιστοιχεί στα νουκλεοτίδια 66 – 1241, στα οποία αντιστοιχούν οι γενωμικές περιοχές: 5'UTR, VP4 και VP2 (μόνο ένα μικρό κομμάτι στο 5' άκρο της VP2). Τα αποτελέσματα από τη χρήση του αλγόριθμου BLAST έδειξαν ότι στην 5'UTR το LRB2E έχει

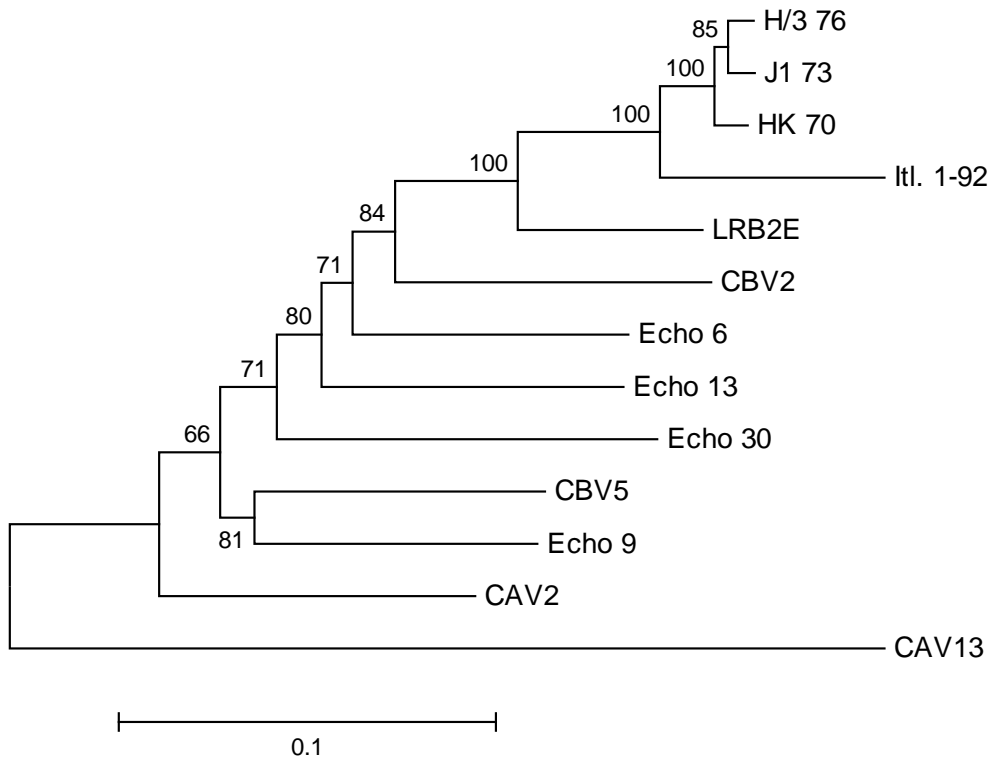
93% ομοιότητα με το στέλεχος IFL 1/66 (Shaw et al., 2005) οροτύπου SVDV (Swine Vesicular Disease Virus), στην VP4 καψιδική περιοχή έχει 87% ομοιότητα με τα στελέχη H/3 '76 (Inoue et al., 1989) και IFL 5-99. οροτύπου SVDV και στην VP2 έχει 90% ομοιότητα με το στέλεχος IFL 1-92 που αντιστοιχεί στον ορότυπο SVDV και 89% ομοιότητα με το στέλεχος 151rom70 (Gullberg M et al., 2010) που αντιστοιχεί στον ορότυπο Coxsackie B5.

Στον Πίνακα 10 παρουσιάζεται η % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του LRB2E με το πρότυπο στέλεχος Coxsackie B5 (Faulkner) και με το πλήρως αλληλουχημένο στέλεχος SVDV (Swine Vesicular Disease Virus) H/3 '76, το οποίο απομονώθηκε το 1976 στο Hokkaido της Ιαπωνίας από έναν υγιή χοίρο (Inoue et al., 1989). Η σύγκριση του LRB2E με το στέλεχος H/3 '76 (SVDV) δείχνει ότι η μεγαλύτερη νουκλεοτιδική ομολογία παρουσιάζεται στην 5'UTR (89%), ενώ στις καψιδικές περιοχές VP4 και VP2 μειώνεται στο 87%. Αντίθετα, η σύγκριση του LRB2E με το πρότυπο στέλεχος Coxsackie B5 δείχνει ότι στις περιοχές 5'UTR και VP2 η νουκλεοτιδική ομολογία είναι 82%, ενώ μειώνεται αρκετά στην γενωμική περιοχή VP4 (74%).

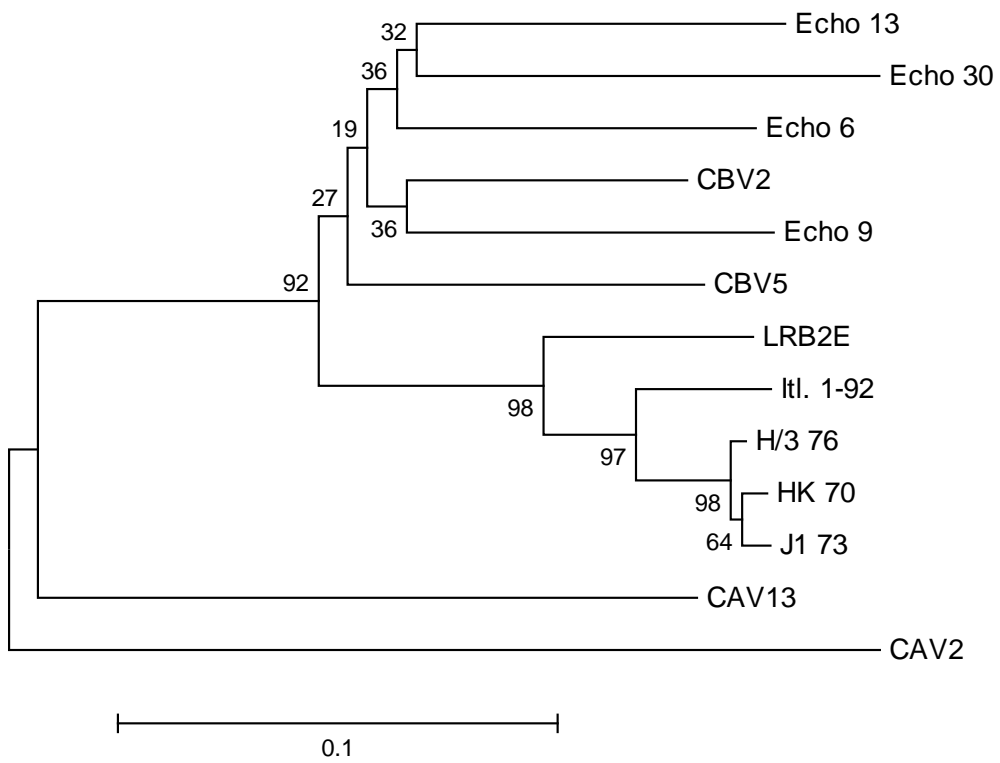
ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	SVDV (H/3 '76)		Coxsackie B5 (Faulkner)	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5'UTR (66 – 743) nt	89	—	82	—
VP4	87	97	74	94
VP2 (951 – 1240) nt	87	97	82	96

Πίνακας 10: % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του LRB2E με το στέλεχος SVDV H/3 '76 και το πρότυπο στέλεχος Coxsackie B5 για κάθε περιοχή που αλληλουχήθηκε.

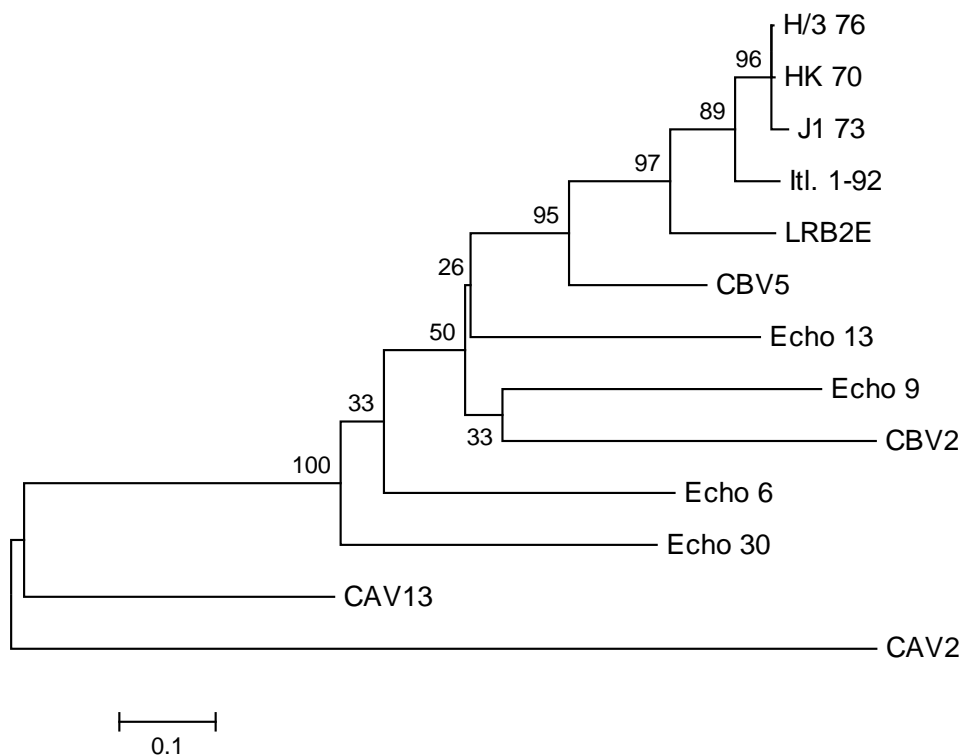
Στις Εικόνες 15, 16 και 17 παρουσιάζονται τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν για κάθε περιοχή του στελέχους LRB2E. Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν 4 πλήρως αλληλουχημένα στελέχη SVDV (H/3 76, J1 73, HK 70 και IFL 1-92), 6 πρότυπα στελέχη (Echo 6, Echo 9, Echo 13, Echo 30, CBV2 και CBV5) του είδους B των ανθρώπινων εντεροϊών (HEV – B), το πρότυπο στέλεχος Coxsackie A2 (HEV – A) και το πρότυπο στέλεχος Coxsackie A13 (HEV – C).



Εικόνα 15: Φυλογενετικό δέντρο της 5'UTR περιοχής (από το 66 – 743nt) για το στέλεχος LRB2E.

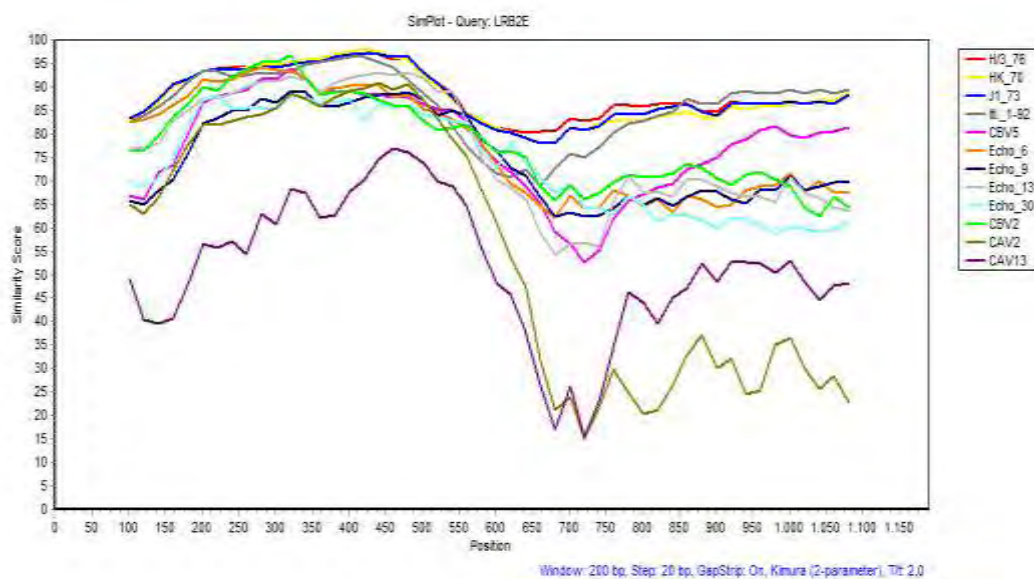


Εικόνα 16: Φυλογενετικό δέντρο της VP4 γενωμικής περιοχής για το στέλεχος LRB2E.



Εικόνα 17: Φυλογενετικό δέντρο της VP2 γενωμικής περιοχής (από το 951 – 1240nt) για το στέλεχος LRB2E.

Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται η ανάλυση SimPlot που πραγματοποιήθηκε για την αλληλουχημένη περιοχή των 1175 νουκλεοτιδίων του στελέχους LRB2E σε σύγκριση με όλα τα παραπάνω στελέχη εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων.



Εικόνα 18: SimPlot ανάλυση της αλληλουχημένης περιοχής των 1175 νουκλεοτιδίων του στελέχους LRB2E.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ EIS6B

Το στέλεχος EIS6B απομονώθηκε σε κύτταρα HEP2 και RD με τη διαδικασία των σειριακών αραιώσεων και αλληλουχήθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμα του (1 – 7366nt). Μετά από σύγκριση της αλληλουχίας του γονιδίου VP1 με άλλα πρότυπα στελέχη εντεροϊών, το EIS6B ταυτοποιήθηκε ως Echo 3 (E3), διαθέτοντας 79% νουκλεοτιδική ομοιότητα με το πρότυπο στέλεχος Morrisey στη συγκεκριμένη περιοχή.

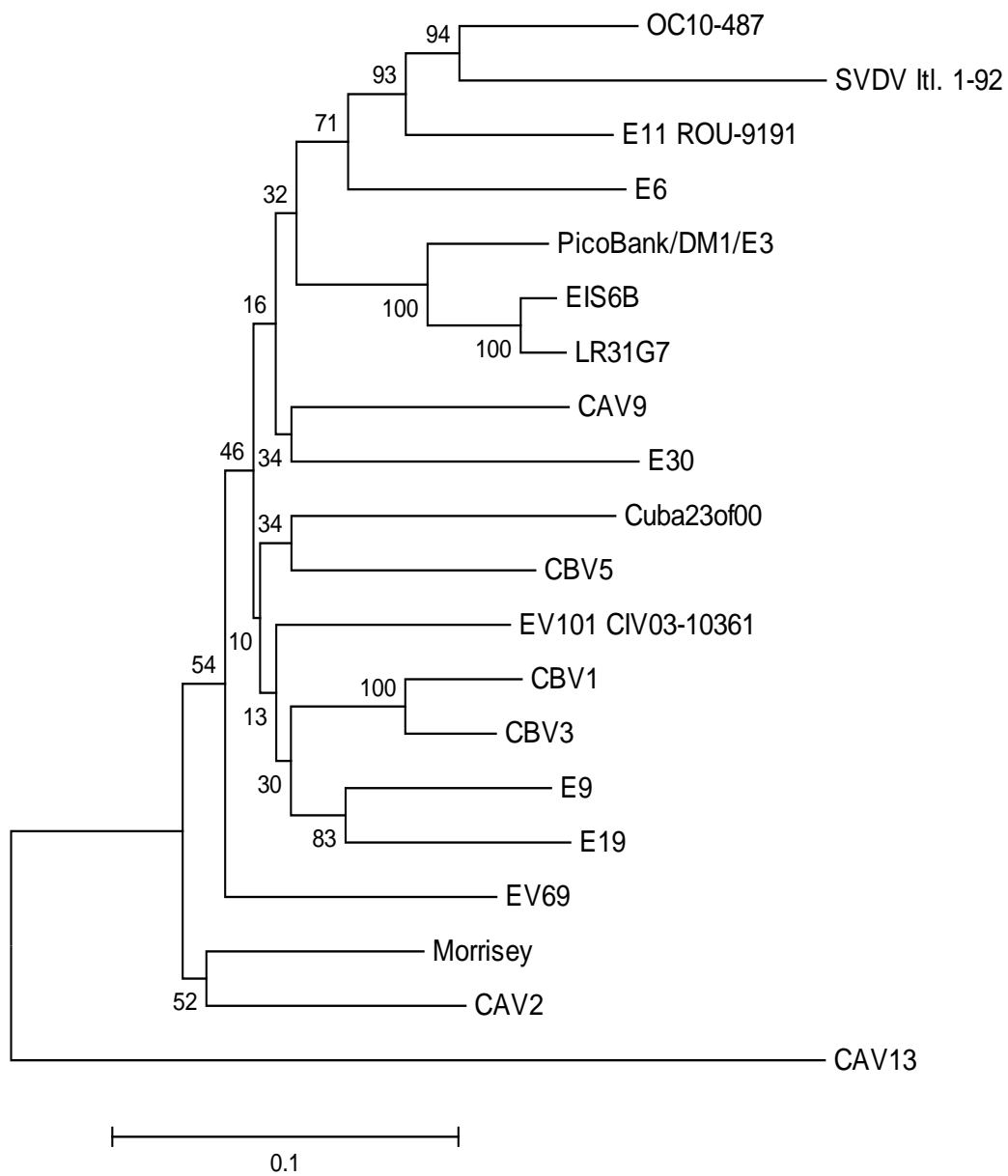
Στον ακόλουθο πίνακα (Πίνακας 11) παρουσιάζεται η % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του EIS6B με το πρότυπο στέλεχος E3 Morrisey και με το στέλεχος LR31G7, με το οποίο παρουσίασε τη μεγαλύτερη ομολογία (96%) σε ολόκληρο το γονιδίωμά του, μετά από αναζήτηση στον αλγόριθμο BLAST. Το περιβαλλοντικό στέλεχος LR31G7 απομονώθηκε το 2005 στην Ελλάδα από λύματα του Βιολογικού Καθαρισμού Λάρισας (Kyriakorouli et al., 2010). Το EIS6B παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα με το στέλεχος LR31G7 που κυμαίνεται από 97% στην 5'UTR έως και 94% στις καψιδικές περιοχές. Με το πρότυπο στέλεχος Morrisey διαφέρει αρκετά σε όλες τις περιοχές του γονιδιώματός του με ποσοστά που κυμαίνονται από 85% στην 5'UTR έως 76% στην 2B περιοχή.

ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	LR31G7		Echo 3 (Morrisey)	
	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία	% νουκλεοτιδική ομολογία	% αμινοξική ομολογία
5'UTR	97	—	85	—
P1	95	99	79	96
VP4	94	94	79	92
VP2	95	99	79	98
VP3	94	100	80	97
VP1	95	99	79	96
P2	95	98	80	96
2A	95	97	80	93
2B	94	98	76	93
2C	96	99	82	98
P3	95	98	80	96
3A	97	98	78	96
3B	96	95	83	100

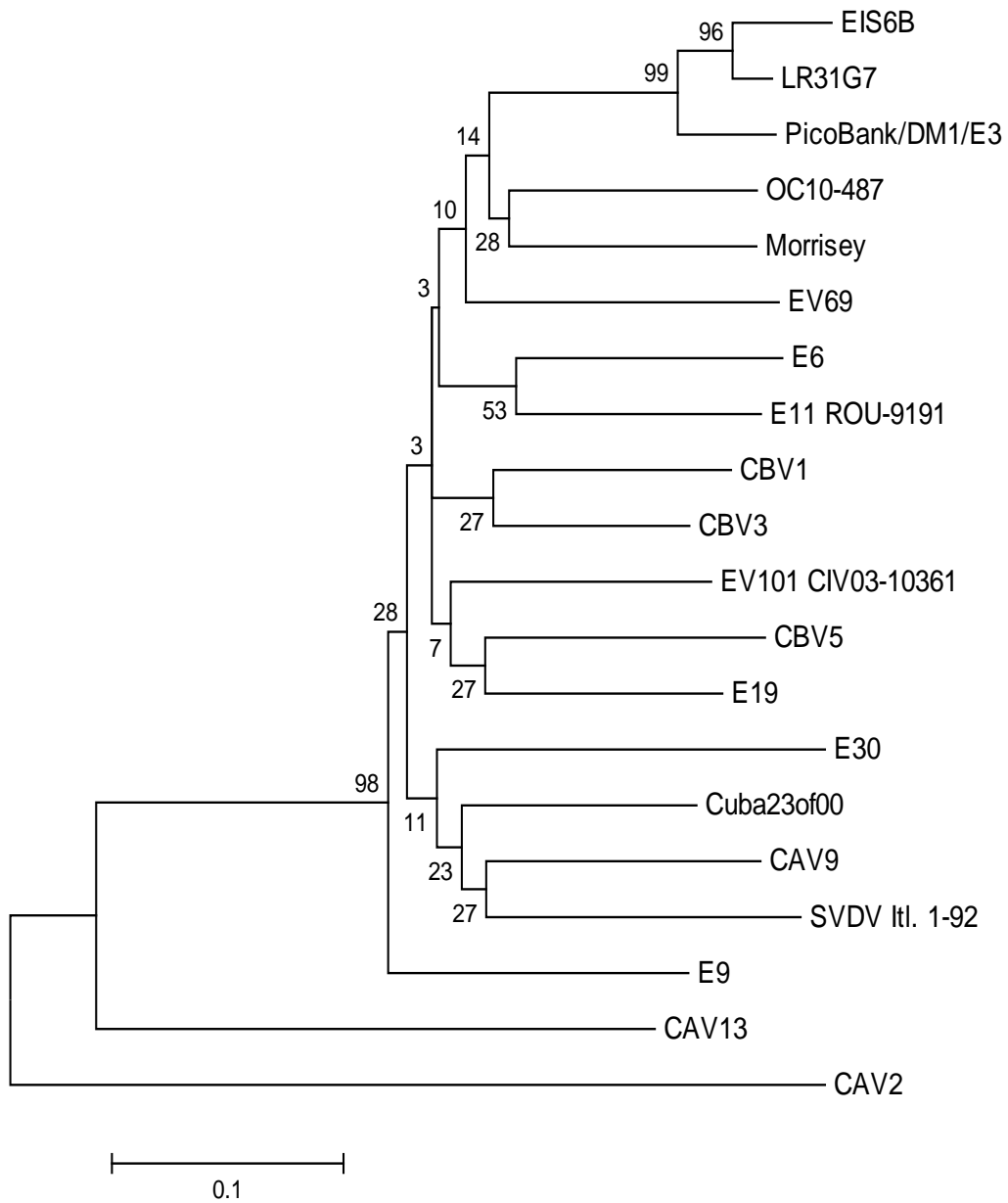
3C	95	97	79	95
3D*	95	98	81	96
3'UTR**	—	—	82	—

Πίνακας 11: % νουκλεοτιδική και αμινοξική ομολογία του EIS6B με το στέλεχος E3 LR31G7 και το πρότυπο στέλεχος Echo 3 για κάθε περιοχή. (* Λόγω έλλειψης του 3' άκρου της αλληλουχίας του γονιδίου 3D για το LR31G7, η σύγκριση έγινε μόνο με τα πρώτα 1251 nt της περιοχής 3D, ** Δεν υπήρχε η αλληλουχία του LR31G7 στην 3'UTR, ενώ για τη σύγκριση με το πρότυπο Morrisey υπήρχαν μόνο 41 nt της περιοχής 3'UTR του EIS6B).

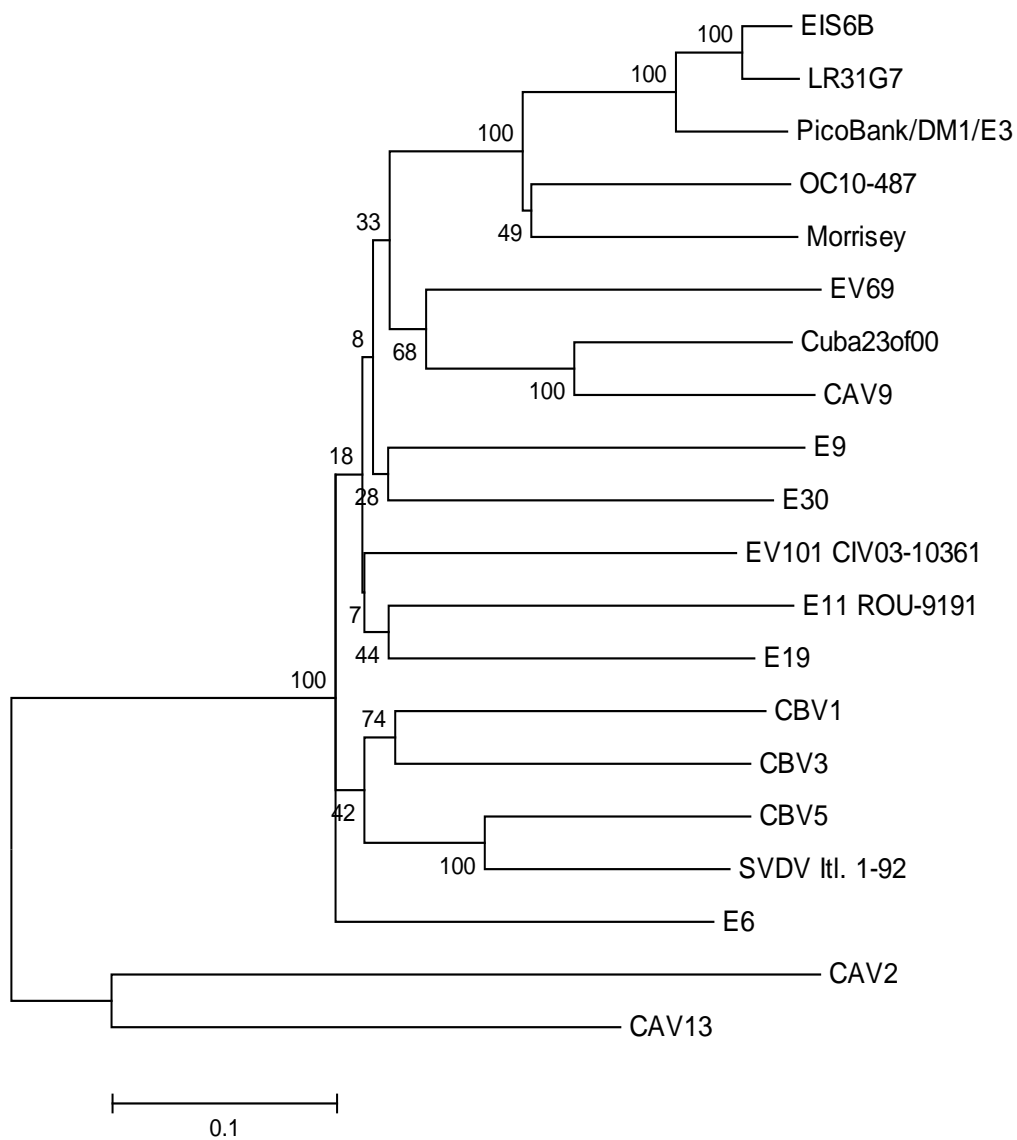
Στις Εικόνες 19 έως και 30 παρουσιάζονται τα φυλογενετικά δέντρα που κατασκευάστηκαν για κάθε γενωμική περιοχή του στελέχους EIS6B. Για την κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων χρησιμοποιήθηκαν 3 πλήρως αλληλουχημένα στελέχη Echo 3 (LR31G7, PicoBankDM1E3, OC10-4B7), το πρότυπο στέλεχος Morrisey για τον ορότυπο Echo 3, 9 πρότυπα στελέχη (CAV9, CBV1, CBV3, CBV5, Echo6, Echo 9, Echo 19, Echo30 και EV 69) του είδους B των ανθρώπινων εντεροϊών (HEV – B), το πρότυπο στέλεχος Coxsackie A2 (HEV – A) και το πρότυπο στέλεχος Coxsackie A13 (HEV – C). Ενδεικτικά συμπεριλήφθησαν στη φυλογενετική μελέτη και 4 διαφορετικά στελέχη του είδους B των εντεροϊών (Echo 11 ROU91-91, EV101 CIV03-10461, SVDV Itl. 1-92 και Cuba23of00), με τα οποία βρέθηκε μια ομοιότητα σε ολόκληρο το γονιδίωμά τους με το EIS6B, της τάξης του 78% , μετά από αναζήτηση στον αλγόριθμο BLAST. Παρατηρούμε ότι το στέλεχος που μελετάμε (στέλεχος EIS6B), ταξινομείται συνεχώς με το LR31G7, ενώ με το PicoBankDM1E3 ομαδοποιείται μόνο στην 5'UTR, στις καψιδιακές και την 2A περιοχή. Στα δέντρα για τις καψιδιακές περιοχές παρουσιάζεται συσχέτιση οροτύπου – γονοτύπου, διότι το EIS6B ταξινομείται με όλα τα υπόλοιπα Echo 3 στελέχη (LR31G7, PicoBankDM1E3, OC10-4B7 και Morrisey). Η συσχέτιση οροτύπου – γονοτύπου διακόπτεται στις λειτουργικές περιοχές, όπου το EIS6B ταξινομείται μόνο με το LR31G7 από τα Echo 3 στελέχη.



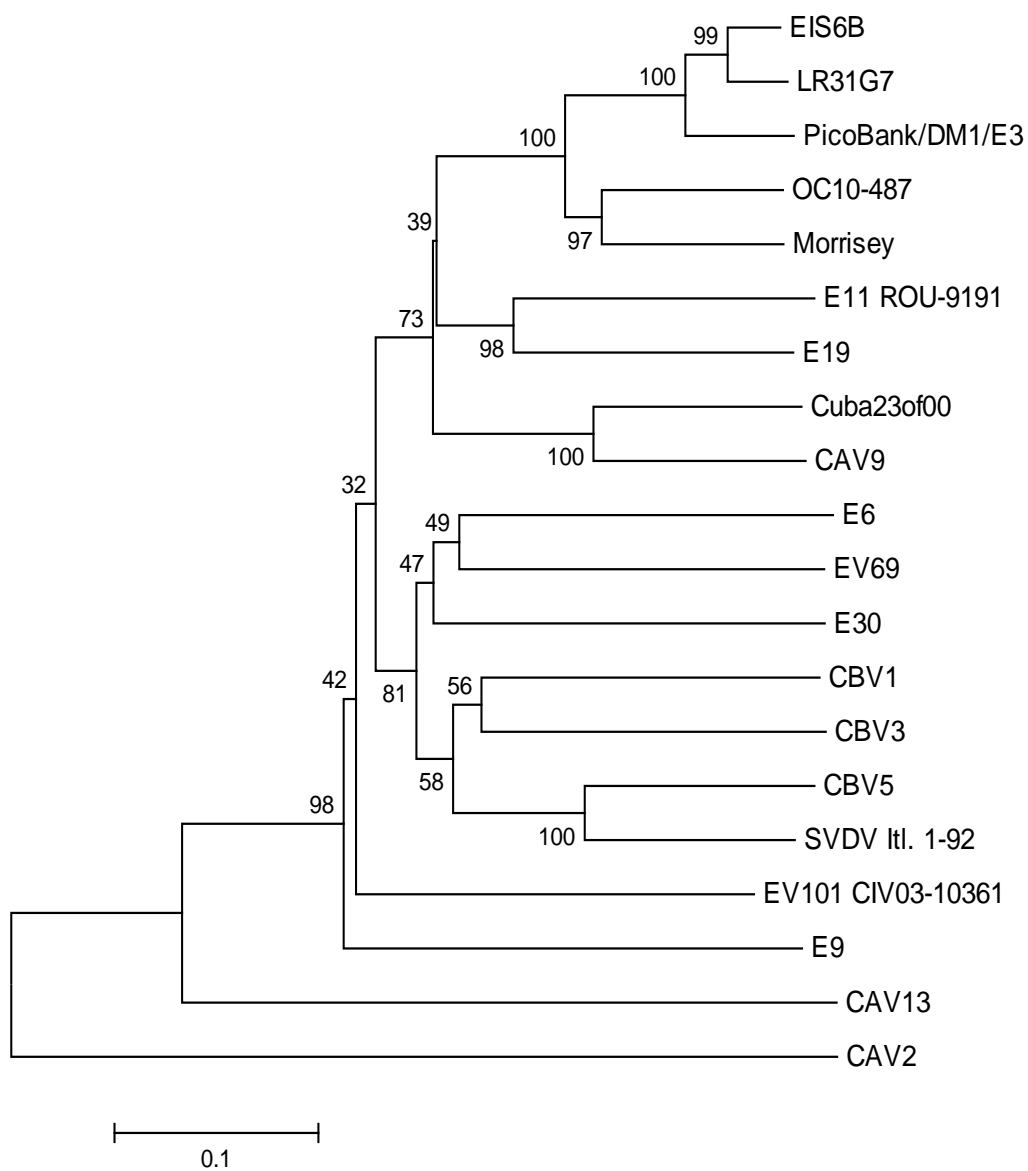
Εικόνα 19: Φυλογενετικό δέντρο της 5'UTR γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



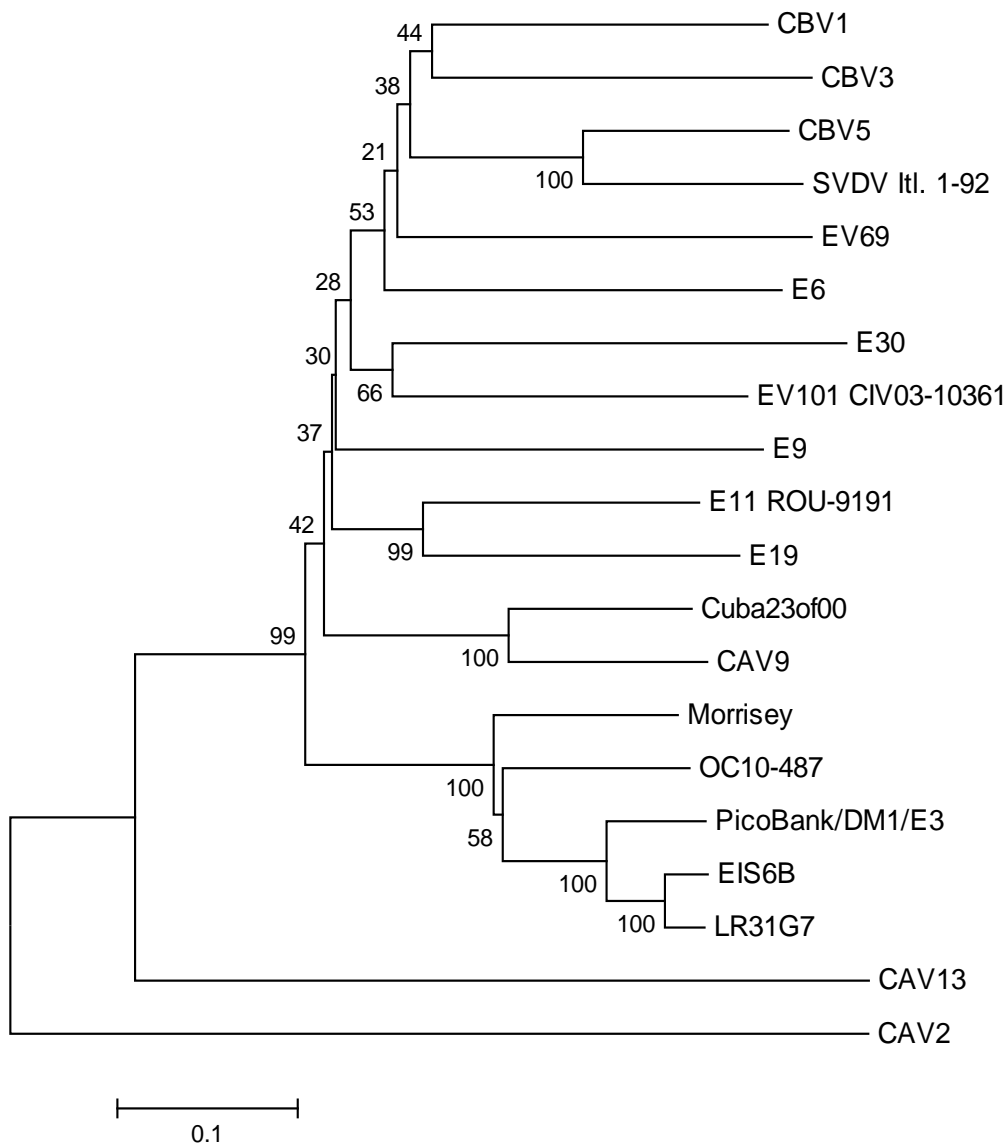
Εικόνα 20: Φυλογενετικό δέντρο της VP4 γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



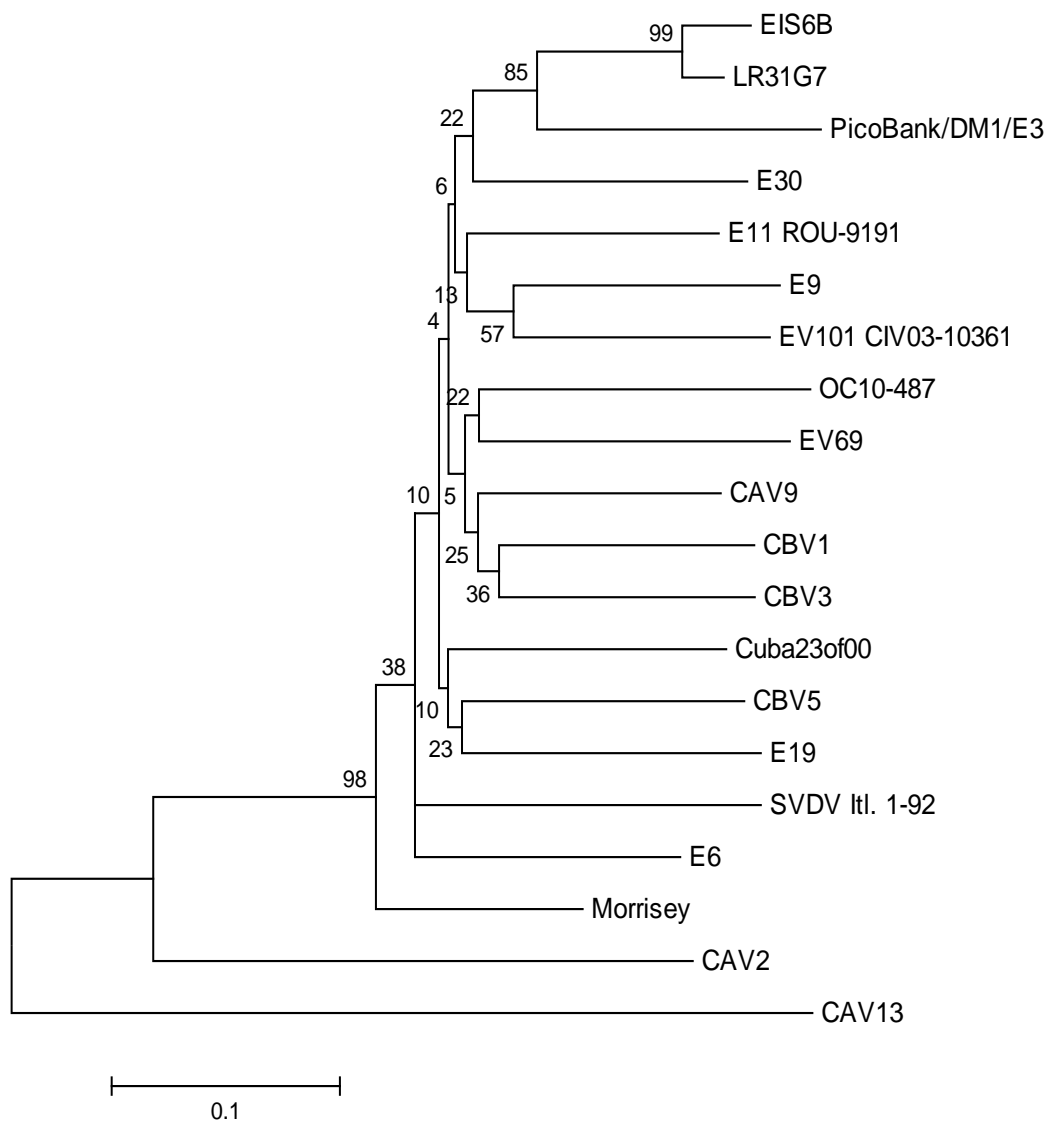
Εικόνα 21: Φυλογενετικό δέντρο της VP2 γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



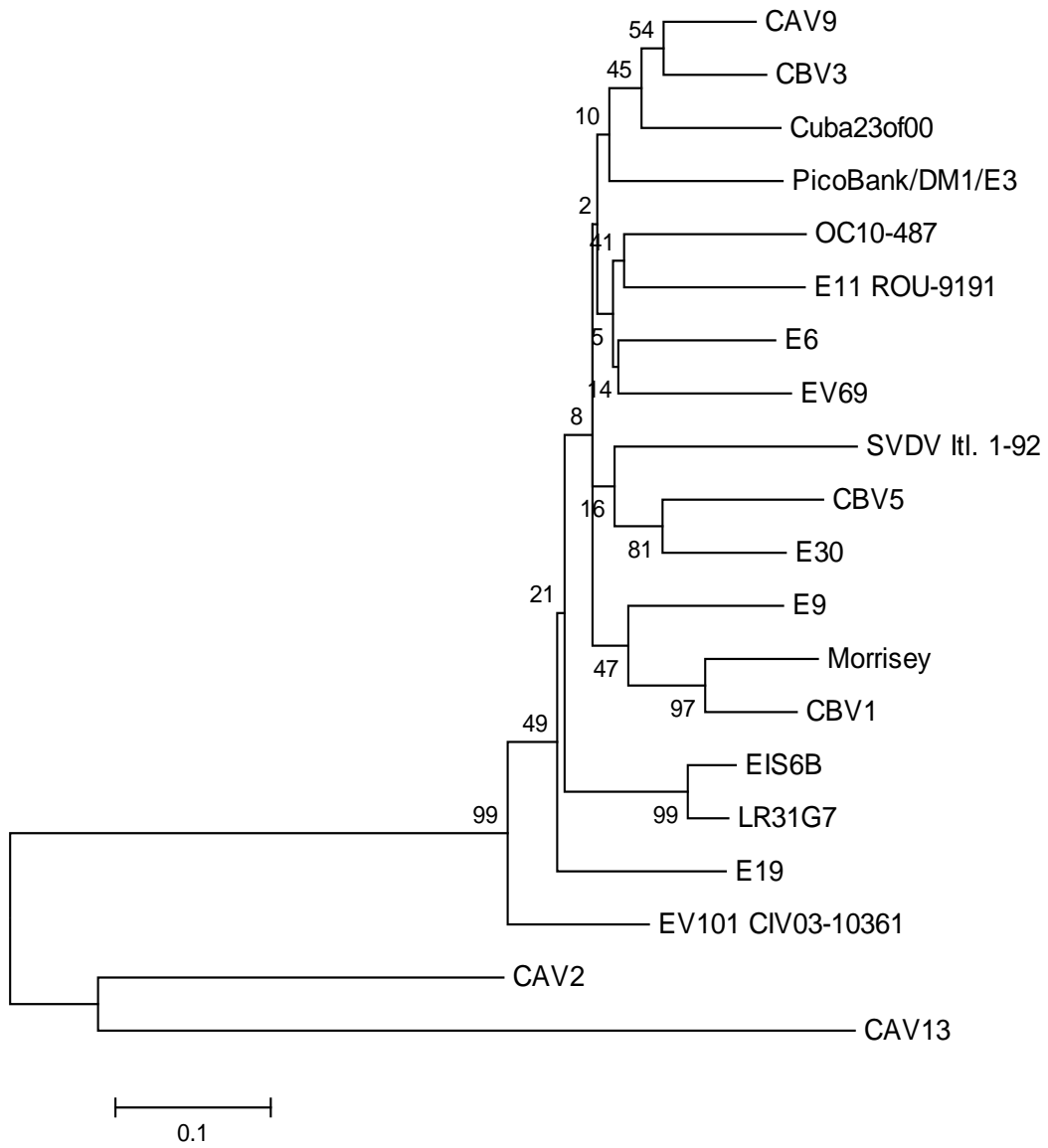
Εικόνα 22: Φυλογενετικό δέντρο της VP3 γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



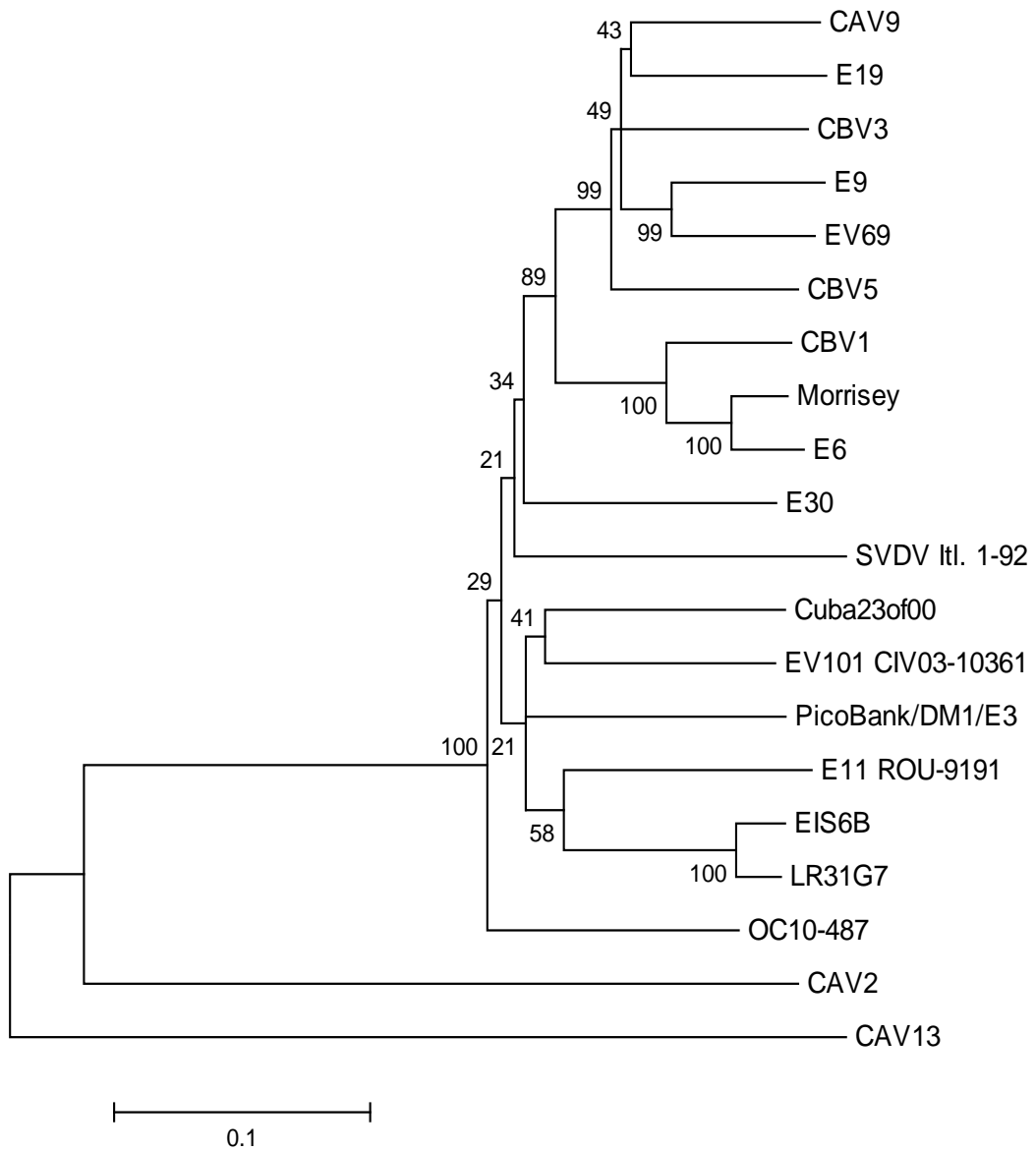
Εικόνα 23: Φυλογενετικό δέντρο της VP1 γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



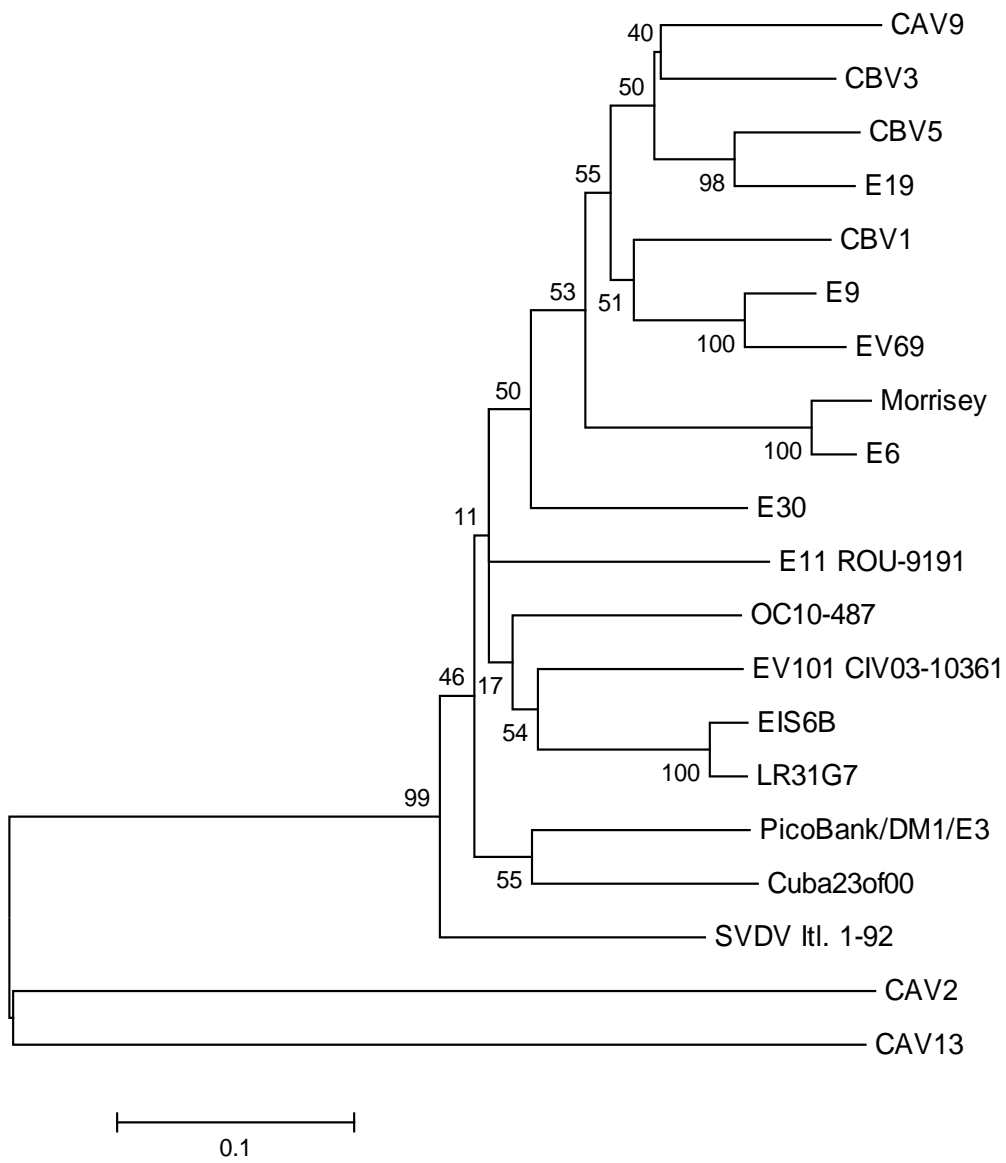
Εικόνα 24: Φυλογενετικό δέντρο της 2Α γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



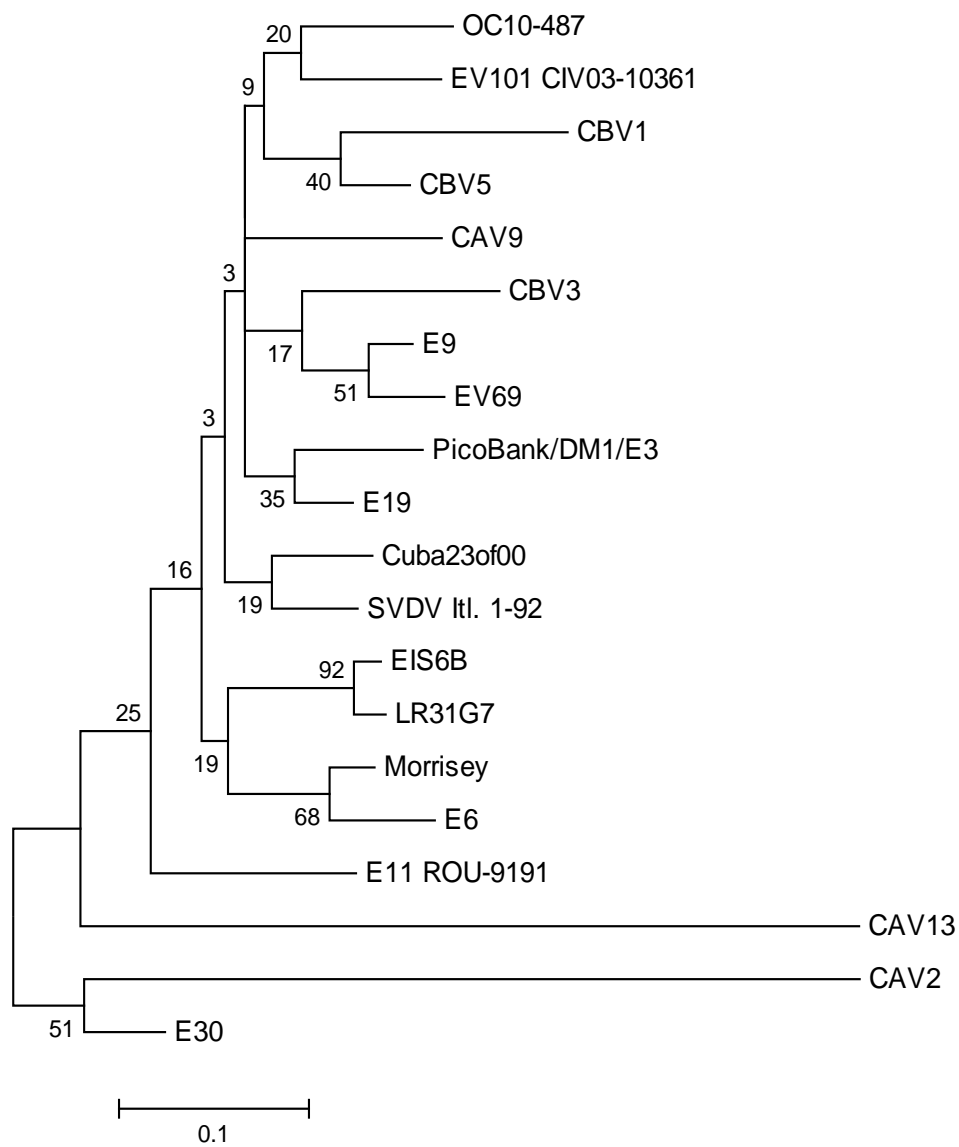
Εικόνα 25: Φυλογενετικό δέντρο της 2B γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



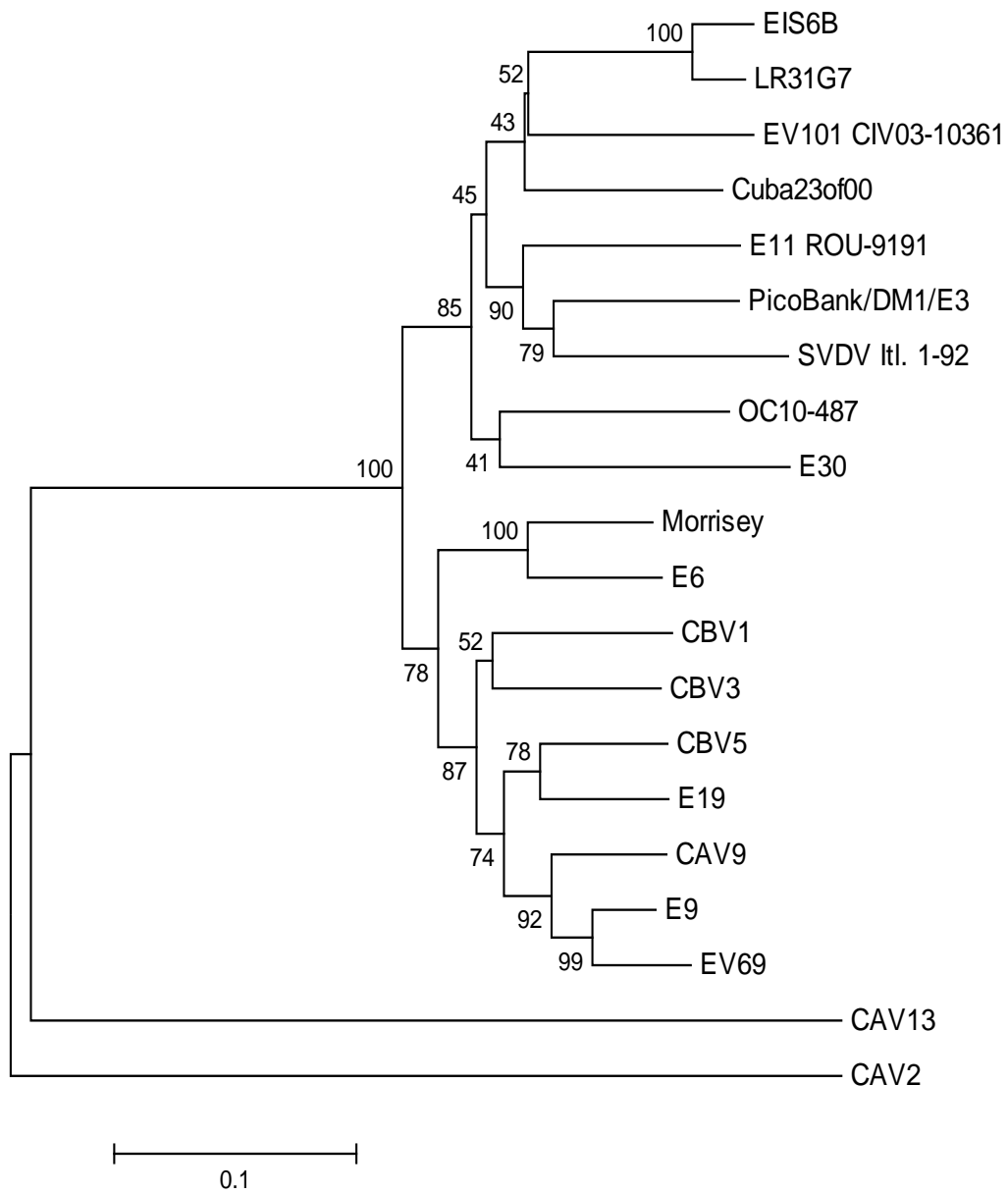
Εικόνα 26: Φυλογενετικό δέντρο της 2C γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



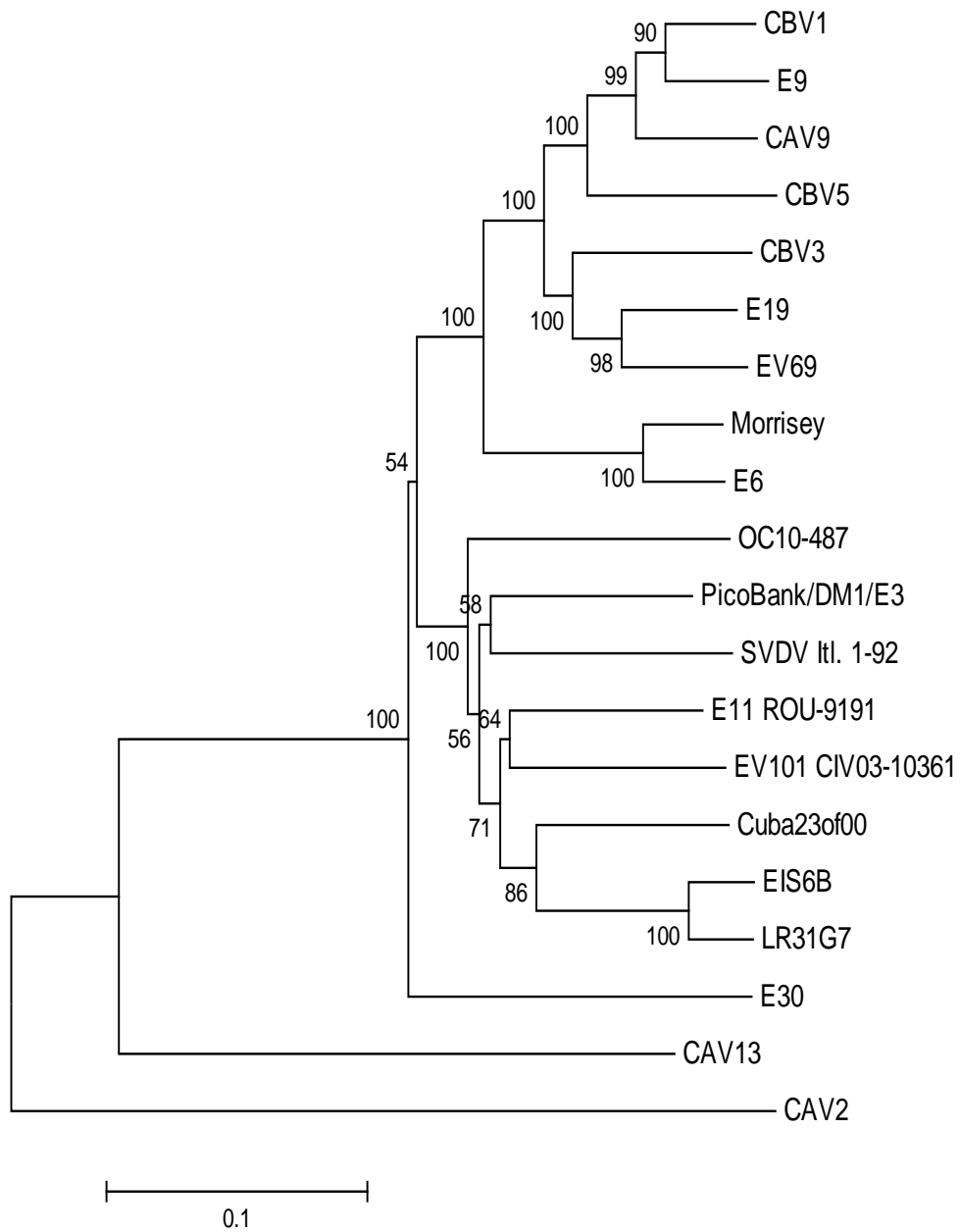
Εικόνα 27: Φυλογενετικό δέντρο της 3Α γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



Εικόνα 28: Φυλογενετικό δέντρο της 3B γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.

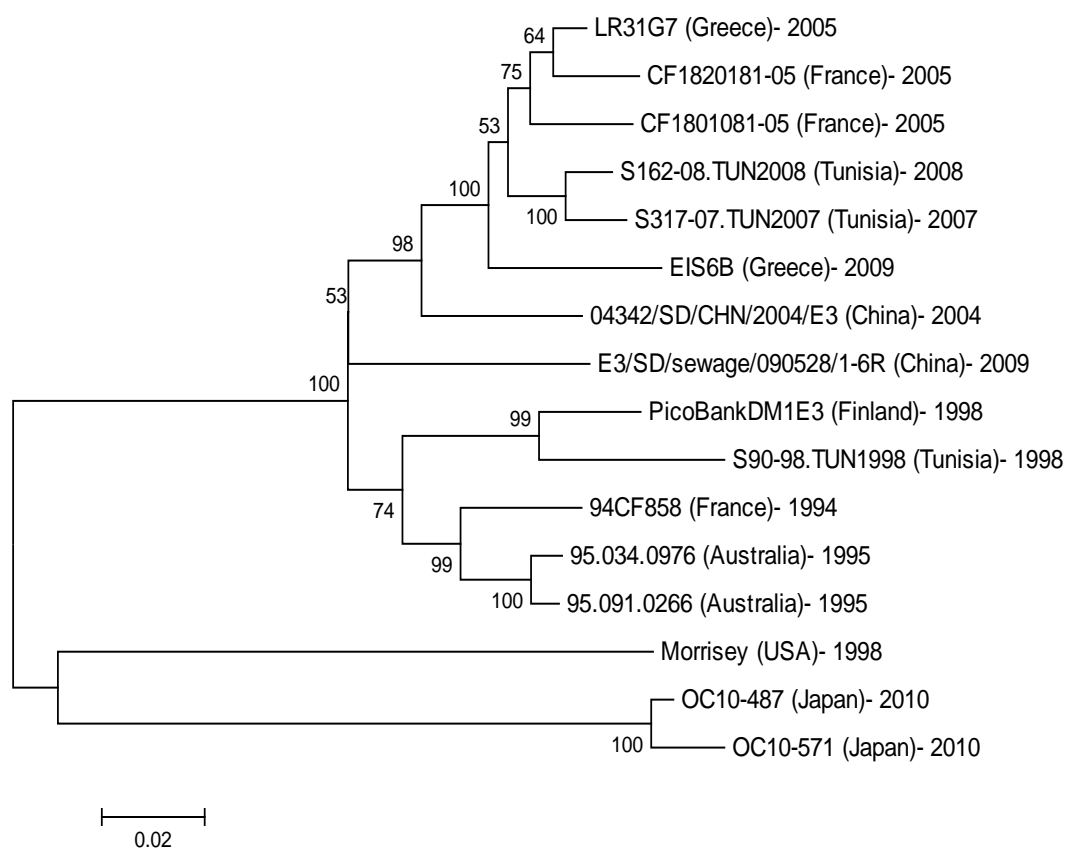


Εικόνα 29: Φυλογενετικό δέντρο της 3C γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.



Εικόνα 30: Φυλογενετικό δέντρο της 3D γενωμικής περιοχής για το στέλεχος EIS6B.

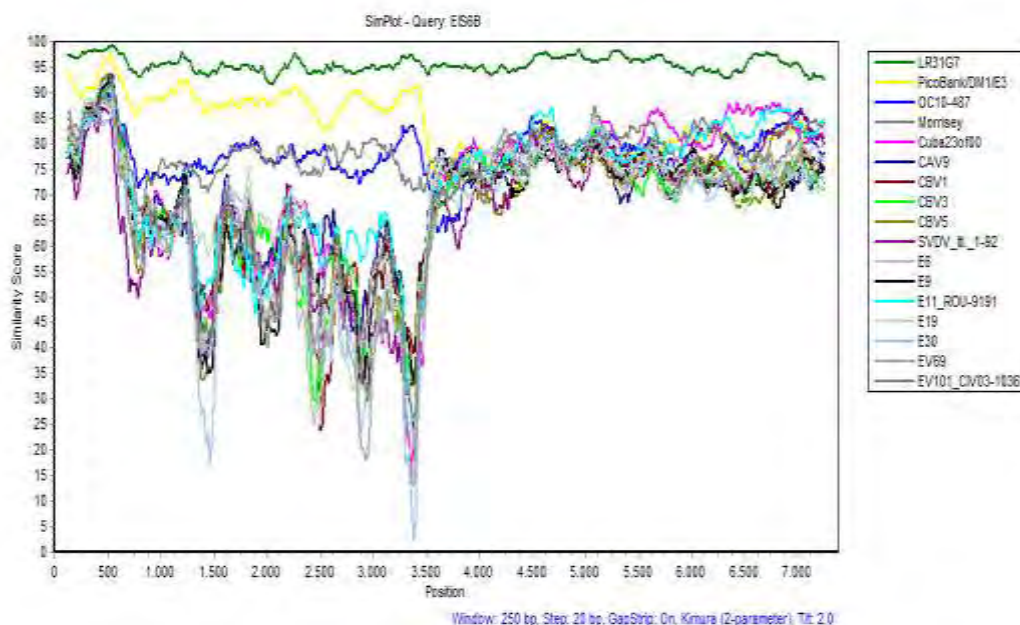
Για την επιδημιολογική μελέτη του EIS6B με άλλους ιούς οροτύπου E3, κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο σε ολόκληρη τη VP1 γενωμική περιοχή μεγέθους 876nt (2447 – 3322nt). Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη E3 που απομονώθηκαν από επιδημίες το 2005 στη Γαλλία (CF1820181-05 και CF1801081-05), το 1995 στην Αυστραλία (95.034.0976 και 95.091.0266), το 2007/2008 στην Τυνησία (S162-08.TUN2008 και S317-07.TUN2007), το 2010 στην Ιαπωνία (OC10-487 και OC10-571), καθώς και το πρότυπο στέλεχος Morrisey για τον ορότυπο Echo 3. Από το φυλογενετικό δέντρο παρατηρούμε ότι το EIS6B ομαδοποιείται με το LR31G7 καθώς και με στελέχη που κυκλοφόρησαν την περίοδο 2005–2008 σε Γαλλία και Τυνησία. Με τα στελέχη που απομονώθηκαν την ίδια χρονική περίοδο με το EIS6B (δηλαδή την περίοδο 2009–2010) σε Κίνα και Ιαπωνία δεν παρατηρείται κάποια συσχέτιση.



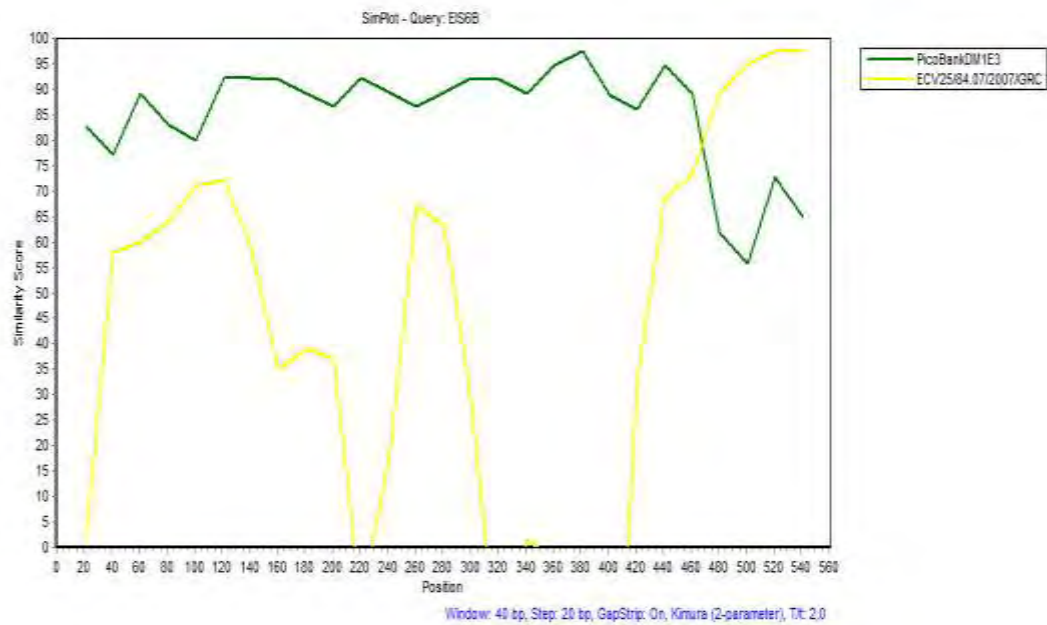
Εικόνα 31: Φυλογενετικό δέντρο ολόκληρης της VP1 γενωμικής περιοχής του EIS6B και άλλων E3 στελεχών. Δίπλα από κάθε στέλεχος αναφέρεται η χώρα στην οποία απομονώθηκε και η ημερομηνία απομόνωσής του.

Στην Εικόνα 32, παρουσιάζεται η ανάλυση SimPlot που πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμα του EIS6B. Τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ίδια με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των ανωτέρω φυλογενετικών δέντρων. Μετά το τέλος της VP1 περιοχής και στην αρχή της 2A (περίπου στις 3300 bp) παρατηρείται μια απότομη μείωση στην ομοιότητα του EIS6B με το στέλεχος PicoBank/DM1/E3, υποδηλώνοντας την πιθανή ύπαρξη ανασυνδυασμού. Συνεπώς, αναλύθηκαν διεξοδικότερα οι περιοχές VP1 και 2A.

Αφού απομονώθηκε η συγκεκριμένη περιοχή (2936 – 3493 nt), ακολούθησε αναζήτηση στη διεθνή βάση δεδομένων ακολουθιών (GenBank) με χρήση του αλγορίθμου BLAST. Τα στελέχη με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ήταν το NO-519, οροτύπου Echo 25, και το ECV25/84.07/2007.GRC, οροτύπου Echo 25, επίσης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, το στέλεχος NO-519 απομονώθηκε στη Νορβηγία το 2003, ενώ το ECV25/84.07/2007.GRC απομονώθηκε στην Ελλάδα το 2007. Μετά από στοίχιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των στελεχών με το EIS6B, βρέθηκε ότι το NO-519 διαθέτει 93% νουκλεοτιδική ομοιότητα, ενώ το ECV25/84.07/2007.GRC διαθέτει 96% νουκλεοτιδική ομοιότητα με το EIS6B. Συνεπώς, για την ανάλυση SimPlot (Εικόνα 33) χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος ECV25/84.07/2007.GRC (Logotheti et al., 2009). Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των στελεχών PicoBankDM1E3 και ECV25/84.07/2007.GRC εντοπίζεται μεταξύ των θέσεων 3369 – 3461 nt.



Εικόνα 32: SimPlot ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος του στελέχους EIS6B.



Εικόνα 33: SimPlot ανάλυση της VP1-2A γενωμικής περιοχής (3369 – 3461 nt), όπου συνέβη ο ανασυνδυασμός των PicoBankDM1E3 και ECV25/84.07/2007.GRC στελεχών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΑΠΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το περιβάλλον αποτελεί μια ανεξάντλητη δεξαμενή γενετικής ετερογένειας εντεροϊών, η παρακολούθηση του οποίου μπορεί να μας δώσει πληροφορίες όσον αφορά την κυκλοφορία των στελεχών εντεροϊών στον πληθυσμό που μελετάμε (Aw and Gin, 2010), την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών των εντεροϊών (Apostol et al., 2012) και την παροχή βαθύτερης γνώσης γύρω από την ταξινόμηση και την εξέλιξη των εντεροϊών (Knipe and Howley, 2007). Η έκκριση των εντεροϊών στο περιβάλλον γίνεται μέσω των κοπράνων μολυσμένων ατόμων (συμπτωματικών ή μη). Για το λόγο αυτό, τα λύματα και τα υγρά και στερεά απόβλητα αποτελούν σημαντικές πηγές απομόνωσης εντεροϊών από το περιβάλλον.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 14 περιβαλλοντικά δείγματα (λύματα) που προήλθαν από τους Βιολογικούς καθαρισμούς της Λάρισας, των Τρικάλων και των Ιωαννίνων. Αφού υπέστησαν κατάλληλη επεξεργασία για να αυξηθεί η συγκέντρωση του ιού στα δείγματα, μελετήθηκαν ως προς την ύπαρξη εντεροϊών.

Η ύπαρξη εντεροϊών ανιχνεύθηκε και στα 14 περιβαλλοντικά δείγματα που μελετήθηκαν. Από αυτά, μόνο ένα (στέλεχος EIS6B) απομονώθηκε με τη διαδικασία των σειριακών αραιώσεων και ταυτοποιήθηκε. Ακολούθησε αλληλούχιση ολόκληρου του γενώματος του ιού και γενωμική ανάλυση. Στα υπόλοιπα 13 δείγματα δεν ήταν εφικτή η καλλιέργεια του ιού (μη μολυσματικά στελέχη) και συνεπώς η διαδικασία των σειριακών αραιώσεων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα δείγματα προέρχονταν από το περιβάλλον (λύματα), μια λογική εξήγηση για την έλλειψη μολυσματικότητας των ιών, θα ήταν το ότι είχε καταστραφεί το καψίδιό τους και επομένως και το RNA τους. Για την ενίσχυση και απομόνωση των υπόλοιπων ιικών στελεχών χρησιμοποιήθηκαν μοριακές τεχνικές (κυρίως PCR και μοριακή κλωνοποίηση).

Με τη χρήση μοριακών τεχνικών ενισχύθηκε, κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε τμήμα του στελέχους LRB2E, στο οποίο όμως, δεν ήταν εφικτή η ταυτοποίηση γιατί το τμήμα αυτό δεν περιείχε την VP1 γενωμική περιοχή. Ο κυριότερος λόγος που δεν ενισχύθηκε η VP1

περιοχή του στελέχους LRB2E ήταν η έλλειψη ζευγών εκκινητών που να οδηγούν σε επιτυχημένη ενίσχυση της συγκεκριμένης περιοχής.

Είναι γνωστό ότι το RNA αποικοδομείται γρηγορότερα και ευκολότερα σε σχέση με το DNA, το οποίο είναι δίκλωνο και συνεπώς πιο σταθερό. Στο περιβάλλον, το γένωμα του ιού είναι πιθανό να μην υπάρχει ολόκληρο, λόγω καταστροφής του πολύ ευαίσθητου RNA (Tsai et al., 1995). Σε μια τέτοια περίπτωση, το γενετικό υλικό του ιού θα είναι αδύνατο να ανιχνευτεί είτε με κυτταροκαλλιέργειες είτε με RT – PCR. Αυτή ίσως είναι μια από τις αιτίες που δεν επετεύχθη η ενίσχυση περισσότερων γενωμικών περιοχών του στελέχους LRB2E .

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ LRB2E

Το στέλεχος LRB2E συλλέχθηκε τον Αύγουστο του 2007 από τον Βιολογικό καθαρισμό της Λάρισας. Αφού επεξεργάστηκε με τη μέθοδο διαχωρισμού δύο φάσεων, μελετήθηκε για την ύπαρξη εντεροϊών και βρέθηκε θετικό. Η καλλιέργεια του ιού δεν ήταν εφικτή και συνεπώς, ούτε η απομόνωσή του με τη μέθοδο των σειριακών αραιώσεων. Μετά από αρκετές προσπάθειες απομόνωσης του LRB2E, κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε ένα τμήμα 1175 νουκλεοτιδίων. Το τμήμα αυτό περιλαμβάνει τις γενωμικές περιοχές: 5'UTR, VP4 και VP2. Η γενωμική περιοχή VP4 δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ταυτοποίηση, διότι αν και είναι καψιδιακή, βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου και δε φέρει αντιγονικές περιοχές. Επομένως, χρησιμοποιήθηκε η περιοχή VP2. Μετά από χρήση του εργαλείου BLAST, όπου πραγματοποιήθηκε στοίχιση της αλληλουχίας που διαθέτουμε στην περιοχή VP2 με όλες τις αλληλουχίες που είναι καταχωρημένες στη διεθνή βάση αλληλουχιών (GenBank), το στέλεχος LRB2E ταυτοποιήθηκε ως SVDV, σύμφωνα με τη δημοσίευση του Nasri. Ο Nasri υποστηρίζει ότι μπορεί να γίνει ταυτοποίηση ενός ιικού στελέχους με βάση την αλληλουχία της VP2 περιοχής (Nasri et al., 2007).

Ο ορότυπος SVDV (Swine Vesicular Disease Virus) αποτελεί μέλος του γένους των Εντεροϊών και ευθύνεται για μια εξαιρετικά μολυσματική ασθένεια των χοίρων, την αφθώδη νόσο (Dekker et al., 1995). Η ασθένεια παρατηρήθηκε αρχικά στην Ιταλία το 1966 (Nardelli et al., 1968) και από τότε υπήρξαν αρκετά κρούσματα του ιού σε Ευρώπη και Ασία. Ο SVDV αποτελεί μια παραλλαγή του ανθρώπινου παθογόνου Coxsackie B5 (CBV5). Αντιγονικές και μοριακές μελέτες της σχέσης των δύο αυτών ιών έδειξαν ότι ο ορότυπος SVDV εξελίχθηκε από τον CBV5 (Zhang et al., 1999) αφότου μεταφέρθηκε από τους ανθρώπους, στους χοίρους.

Από τα φυλογενετικά δέντρα που παρουσιάζονται στις εικόνες 15 – 17 της ενότητας των αποτελεσμάτων, παρατηρούμε ότι όλα τα στελέχη SVDV ομαδοποιούνται μαζί και συγκεκριμένα τα 3 στελέχη που απομονώθηκαν σε Ιαπωνία (J1 '73) και Χονγκ Κονγκ (HK '70 και H/3 '76) (Inoue et al., 1989) τη δεκαετία του 1970, αποτελούν έναν ξεχωριστό κλάδο. Στις καψιδικές περιοχές VP4 και VP2, το LRB2E ταξινομείται μαζί με τα υπόλοιπα στελέχη SVDV, έχοντας σαν κοινό πρόγονο το στέλεχος CBV5. Έτσι, επιβεβαιώνεται η θεωρία ότι ο ορότυπος SVDV εξελίχθηκε από τον ορότυπο CBV5 χρησιμοποιώντας σαν ξενιστή τον χοίρο (Graves J. H., 1973). Ωστόσο, στις περιοχές αυτές, φαίνεται να υπάρχει μια διαφορετική πορεία του LRB2E από τα υπόλοιπα SVDV στελέχη, αφού αποτελεί από μόνο του έναν διαφορετικό κλάδο, γεγονός το οποίο θα εξακριβωθεί με την αλληλούχιση της περιοχής VP1.

Στην Εικόνα 18, παρουσιάζεται η ανάλυση SimPlot που πραγματοποιήθηκε για την αλληλουχημένη περιοχή των 1175 νουκλεοτιδίων του στελέχους LRB2E. Σύμφωνα με αυτή, επιβεβαιώνεται η συσχέτιση του LRB2E με τα υπόλοιπα στελέχη SVDV αλλά και τα πρότυπα που ανήκουν στην HEV – B ομάδα. Παριστάνεται επίσης γραφικά, το γεγονός ότι οι ορότυποι CAV2 και CAV13 ανήκουν σε διαφορετικά είδη εντεροϊών, καθώς στα στελέχη αυτά παρουσιάζεται πολύ χαμηλή ομοιότητα με το LRB2E, η οποία αγγίζει το 15% στο 5' άκρο της VP4.

3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ EIS6B

Το στέλεχος EIS6B συλλέχθηκε τον Ιούνιο του 2009 από την είσοδο του Βιολογικού καθαρισμού της Λάρισας. Αφού επεξεργάστηκε με τη μέθοδο της προσρόφησης – έκλουσης σε ηλεκτραρνητικά φίλτρα, ελέγχθηκε μοριακά για την ύπαρξη εντεροϊών και βρέθηκε θετικό. Στη συνέχεια απομονώθηκε σε κυτταρικές σειρές HEP2 και RD και ταυτοποιήθηκε μοριακά βάσει κριτηρίων που ισχύουν για την VP1 γενωμική περιοχή, ως Echo 3 (Oberste et al., 1999). Το στέλεχος αυτό αλληλουχήθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμα του (1 – 7366nt) και πραγματοποιήθηκε νουκλεοτιδική και φυλογενετική ανάλυση για κάθε γενωμική περιοχή.

Η νουκλεοτιδική σύγκριση του EIS6B με το στέλεχος LR31G7 έδειξε ομοιότητα που κυμαίνεται από 97% στην 5'UTR έως και 94% στις καψιδικές περιοχές. Το περιβαλλοντικό στέλεχος LR31G7 απομονώθηκε το 2005 στην Ελλάδα από λύματα του Βιολογικού Καθαρισμού Λάρισας (Kyriakopoulou et al., 2010). Η υψηλή νουκλεοτιδική ομοιότητα καθώς και η συνεχής φυλογενετική σχέση των δύο στελεχών σε όλες τις γενωμικές περιοχές, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι ο ίδιος ιός κυκλοφόρησε στον πληθυσμό της

Λάρισας για τέσσερα χρόνια. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται λαμβάνοντας υπόψη τη νουκλεοτιδική διαφορά μεταξύ των δύο στελεχών στη VP1 περιοχή (5%), η οποία εμπίπτει στο ρυθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων που ισχύει για την ίδια περιοχή των πολιοϊών και έχει υπολογιστεί ότι είναι 1-2% ανά έτος (Kinnunen et al., 1990). Το στέλεχος EIS6B συλλέχθηκε 4,5 χρόνια μετά το LR31G7 και το ποσοστό ομοιότητας των δύο αυτών στελεχών στην VP1 γενωμική περιοχή είναι 95% (ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων περίπου 1% ανά έτος). Την περίοδο κυκλοφορίας του στελέχους αυτού στον πληθυσμό της Λάρισας δεν έχει αναφερθεί απομόνωση E3 στελέχους από κλινικό δείγμα, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ίσως να πρόκειται για μη παθογόνο στέλεχος.

Στα φυλογενετικά δέντρα (Εικόνα 19 – Εικόνα 30) κάθε γενωμικής περιοχής που κατασκευάστηκαν για το στέλεχος EIS6B, παρατηρούμε ότι σε όλες τις καψιδικές περιοχές (VP4,VP2,VP3 και VP1) το EIS6B ταξινομείται με τα υπόλοιπα στελέχη Echo 3. Συνεπώς υπάρχει συσχέτιση γονοτύπου – οροτύπου, εφόσον όλα τα στελέχη Echo 3 (LR31G7, PicoBank/DM1/E3 και OC10-487) ταξινομούνται μαζί με το πρότυπο στέλεχος Morrisey. Στην περιοχή 5'UTR αλλά και στις περιοχές που κωδικοποιούν για τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (2A έως και 3D) το EIS6B ομαδοποιείται μόνο με το LR31G7 από τα Echo 3 στελέχη. Τέλος, στις λειτουργικές περιοχές, τα στελέχη CAV2 και CAV13 παρατηρούμε ότι ταξινομούνται ξεχωριστά από τα στελέχη των HEV – B, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο, εφόσον ανήκουν στις ομάδες HEV – A και HEV – C αντίστοιχα (Knowles et al., 2012).

Από την επιδημιολογική συσχέτιση του EIS6B με άλλα E3 στελέχη (της εικόνας 31 των αποτελεσμάτων), παρατηρούμε ότι το EIS6B ομαδοποιείται με στελέχη E3 που απομονώθηκαν από επιδημίες στη Γαλλία το 2005 (CF1820181-05 και CF1801081-05) και στην Τυνησία το 2007/2008 (S162-08.TUN2008 και S317-07.TUN2007). Παρατηρούμε, επίσης, ότι τα στελέχη του 1994-1998 διαχωρίζονται από αυτά του 2004-2009. Τέλος, το στέλεχος που απομονώθηκε στην Ιαπωνία ένα χρόνο μετά την απομόνωση του ελληνικού στελέχους φαίνεται να μην έχει καμία συσχέτιση με το EIS6B. Καταλήγουμε, έτσι, στο συμπέρασμα πως την ίδια χρονική περίοδο κυκλοφόρησαν δύο διαφορετικά στελέχη του ίδιου οροτύπου, σε Ευρώπη και Ασία.

Στην ανάλυση SimPlot που πραγματοποιήθηκε σε ολόκληρο το γονιδίωμα του EIS6B, παρατηρούμε ότι μετά το τέλος της VP1 περιοχής και στην αρχή της 2A (περίπου στις 3300 bp) υπάρχει μια απότομη μείωση στην ομοιότητα του EIS6B με το στέλεχος PicoBank/DM1/E3, η οποία αγγίζει το 75%, υποδηλώνοντας την πιθανή ύπαρξη ανασυνδυασμού. Μετά από διεξοδικότερη ανάλυση της συγκεκριμένης περιοχής (2936 – 3493 nt), και νέα ανάλυση SimPlot με το στέλεχος ECV25/84.07/2007.GRC (Logotheti et al.,

2009), αποκαλύφθηκε ο ανασυνδυασμός των στελεχών PicoBankDM1E3 και ECV25/84.07/2007.GRC στη 2A γενωμική περιοχή. Το στέλεχος ECV25/84.07/2007.GRC απομονώθηκε στην Ελλάδα το 2007 ενώ το PicoBankDM1E στη Φινλανδία το 1998. Γνωρίζοντας ότι οι γενετικές ανταλλαγές μεταξύ δύο ιών συμβαίνουν κατά την ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου με δύο ιούς, ο ανασυνδυασμός μεταξύ των παραπάνω στελεχών είναι απίθανο να έχει συμβεί επειδή δε σχετίζονται ούτε χρονικά, ούτε τοπικά. Το πιθανότερο είναι ο ανασυνδυασμός στην 2A περιοχή του στελέχους EIS6B να προέκυψε από την ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ του ελληνικού στελέχους ECV25/84.07/2007.GR και κάποιου απόγονου του PicoBankDM1E.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το περιβάλλον αποτελεί μια ανεξάντλητη δεξαμενή γενετικής ετερογένειας εντεροϊών, η παρακολούθηση του οποίου μπορεί να μας δώσει πληροφορίες όσον αφορά την κυκλοφορία των στελεχών εντεροϊών στον πληθυσμό που μελετάμε και την κατανόηση της εξέλιξης και των μοριακών μηχανισμών των εντεροϊών. Η ανίχνευση, η απομόνωση και η μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος στελεχών εντεροϊών συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση της εξέλιξης των εντεροϊών. Τα γεγονότα ανασυνδυασμού φαίνεται να είναι ο κυριότερος μηχανισμός εξέλιξης των εντεροϊών, διότι οδηγούν σε νέα ιικά στελέχη με αυξημένη αρμοστικότητα, τα οποία ίσως αποδειχτούν επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afonina I., Ankoudinova I., Mills A., Lokhov S., Huynh P., Mahoney W.** (2007) Primers with 5' flaps improve real – time PCR. *Biotechniques* 43(6): 770 – 774
- Apostol L. N., Imagawa T., Suzuki A., Masago Y., Lupisan S., Olveda R., Saito M., Omura T., Oshitani H.** (2012) Genetic diversity and molecular characterization of enteroviruses from sewage-polluted urban and rural rivers in the Philippines. *Virus Genes* 45(2): 207 – 217
- Aw T. G., Gin K. Y.** (2010) Environmental surveillance and molecular characterization of human enteric viruses in tropical urban wastewaters. *J. Applied Microbiol.* 109(2): 716 – 730
- Baboonian C., Davies M. J. Booth J. C., and McKenna W. J.** (1997) Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 223: 31 – 52
- Barco A., Carrasco L.** (1995) A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 3349 – 3364
- Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott – Schwartz J., Ehrenfeld E.** (2007) Hijacking components of the cellular secretory pathway for replication of poliovirus RNA. *J. Virol.* 81(2): 558 – 567
- Bessaud M., Jequic S., Joffret M. L., Barge C., Balanant J., Gouandjika – Vasilacle I., Delpeyroux F.** (2008) Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *J. Virol. Methods* 149(2): 277 – 284
- Brown E. H.** (1973) Enterovirus Infection. *British Medical Journal* 2(5859): 169 – 171
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82(1): 79 – 91
- Casas I., Powell L., Klapper P. E., and Cleator G. M.** (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods* 53: 25 – 36
- Chan K. P., Goh K. T., Chong C. Y., Teo E. S., Lau G., and Ling A. E.** (2003) Epidemic Hand, Foot and Mouth Disease Caused by Human Enterovirus 71, Singapore. *Emerg. Infect. Dis.* 9(1): 78 – 85

Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu – Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., and Stuart D. (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* 71(12): 9743 – 9752

Dekker A., Moonen P., de Boer – Luijtz E. A., Terpstra C. (1995) Pathogenesis of swine vesicular disease after exposure of pigs to an infected environment. *Vet. Microbiol.* 45(2-3): 243 – 250

Domingo E., Martinez – Salas E., Sobrino F., de la Torre J. C., Portela A., Ortin J., Lopez – Galindez C., Perez – Brena P., Villanueva N., Najera R., et al. (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance – a review. *Gene* 40(1): 1 – 8

Dotta F., Censini S., van Halteren A. G., Marselli L., Masini M., Dionisi S., Mosca F., Boggi U., Muda A. O., Prato S. D., Elliott J. F., Covacci A., Rappuoli R., Roep B. O., and Marchetti P. (2007) Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cells insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients. *PNAS.* 104(12): 5115 - 5120

Dubois E., Merle G., Roquier C., Trompette A. L., Le Guyader F., Cruciere C., Chomel J. J. (2004) Diversity of enterovirus sequences detected in oysters by RT-heminested PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 92(1): 35 – 43

Feachem R., Garelick H., Slade J. (1981) Enteroviruses in the environment. *Trop. Dis. Bull.* 78(3): 185 – 230

Fricks C. E., and Hogle J. M. (1990) Cell – induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64(5): 1934 – 1945

Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., and Agol A. I. (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958 – 8965

Goodfellow I., Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J. W., Barclay W., Evans D. J. (2000) Identification of a cis – acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74(10): 4590 – 4600

Grabow W. O., Botma K. L., de Villiers J. C., Clay C. G., and Erasmus B. (1999) Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bull. World Health Organ.* 77(12): 973 – 980

- Graves J. H.** (1973) Serological relationships of swine vesicular disease virus and Coxsackie B5 virus. *Nature* 245(5424): 314 – 315
- Griffin D. W., Donaldson K. A., Paul J. H., Rose J. B.** (2003) Pathogenic human viruses in coastal waters. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(1): 129 – 143
- Gromeier M., Alexander L., and Wimmer E.** (1996) Internal ribosomal entry site substitution eliminates neurovirulence in intergeneric poliovirus recombinants. *PNAS.* 93(6): 2370 – 2375
- Gulevich A. Y., Yusupova R. A., Drygin Y. F.** (2001) A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry(Mosc).* 66: (3) 345 – 349
- Gullberg M., Tolf C., Jonsson N., Mulders M. N., Savolainen – Kopra C., Hovi T., Van Ranst M., Lemey P., Hafenstein S., and Lindberg A. M.** (2010) Characterization of a putative ancestor of coxsackievirus B5. *J. Virol.* 84(19): 9695 – 9708
- Hellen C. U., Facke M., Krausslich H. G., Lee C. K., Wimmer E.** (1991) Characterization of poliovirus 2A proteinase by mutational analysis: residues required for autocatalytic activity are essential for induction of cleavage of eukaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.* 65(8): 4226 – 4231
- Herold J. and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein – protein bridge. *Mol. Cell* 7(3): 581 – 591
- Hirst G. K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, poliovirus, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 27: 303 – 309
- Inoue T., Suzuki T., and Sekiguchi K.** (1989) The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 70(4): 919 – 934
- Kauder S. E. and Racaniello V. R.** (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113(12): 1743 – 1753
- Kinnunen L., Huovilainen A., Poyry T., and Hovi T.** (1990) Rapid molecular evolution of wild type 3 poliovirus during infection in individual hosts. *J. Gen. Virol.* 71(2): 317 – 324
- Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47(3): 433 – 443

Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology*, 5th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.

Knowles N. J., Hovi T., Hyytia 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* 855 – 880

Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P. (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58(4): 407 – 412

Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pliaka V., Tsakogiannis D., Pratti A., Levidiotou – Stefanou S., Markoulatos P. (2010) Full-genome sequence analysis of a multirecombinant echovirus 3 strain isolated from sewage in Greece. *J. Clin. Microbiol.* 48(5): 1513 – 1519

Kyriakopoulou Z., Tsois K., Pliaka V., Tsakogiannis D., Ruether I. G. A., Gartzonika C., Levidiotou – Stefanou S., Markoulatos P. (2012) A combined 5'UTR RFLP analysis and VP1 sequencing for epidemic investigation of enteroviruses. *Arch Virol.* 2012 Sep 16. [Epub ahead of print]

Lamphear B. J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R. E. (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for a cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* 270(37): 21975 – 21983

Le Gall O., Christian P., Fauquet C. M., King A. M. Q., Knowles N. J., Nakashima N., Stanway G., Gorbalenya E. E. (2008) *Picornavirales*, a proposed order of positive-sense single-stranded RNA viruses with a pseudo T=3 virion architecture. *Arch. Virol.* 153(4): 715 – 727

Lodder W. J., Buisman A. M., Rutjes S. A., Heijne J. C., Teunis P. F., de Roda Husman A. M. (2012) Feasibility of quantitative environmental surveillance in poliovirus eradication strategies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(11): 3800 – 3805

Logotheti M., Pogka V., Horefti E., Papadakos K., Giannaki M., Pangalis A., Sgouras D., Mentis A. (2009) Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis in Greece during the summer of 2007. *J. Clin. Virol.* 46(3): 270 – 274

Lukashev A. N. (2005) Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.* 15(3): 157 – 167

Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanona O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., Ilonen J. (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* 86(12): 3281 – 3290

Marcotte L. L., Wass A. B., Gohara D. W., Pathak H. B., Arnold J. J., Filman D. J., Cameron C. E., and Hogle J. M. (2007) Crystal structure of poliovirus 3CD Protein: virally encoded protease and precursor to the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 81(7): 3583 – 3596

Meijer A., van der Sanden S., Snijders B. E., Jaramillo – Gutierrez G., Bont L., van der Ent C. K., Overduin P., Jenny S. L., Jusic E., van der Avoort H. G., Smith G. J., Donker G. A., Koopmans M. P. (2012) Emergence and epidemic occurrence of enterovirus 68 respiratory infections in The Netherlands in 2010. *Virology* 423(1): 49 – 57

Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A. (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA* 12(9): 1671 – 1682

Melnick J. L., Rennick V., Hampil, Schmidt N. J., Ho H. H. (1973) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull. World Health Organ.* 48(3): 263 – 268

Melnick J. L. (1990) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology, Second Edition* (ed. Fields B. N.): 549 – 605

Moore B. E., Sagik B. P., Sorber C. A. (1979) Procedure for the recovery of airborne human enteric viruses during spray irrigation of treated wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 38(4): 688 – 693

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M. N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G. M., and van Loon A. M. (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202 – 227

Mulders M. N., Reimerink J., Stenvik M., Alaeddinoglu L., van der Avoort H. G., Hovi T., and Koopmans M. P. (1999) A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying

aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* 80(4): 907 – 916

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

Nardelli L., Lodetti E., Gualandi G. L., Burrows R., Goodbridge D., Brown F., Cartwright B. (1968) A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an enterovirus. *Nature* 219(5160): 1275 – 1276

Nasri D., Bouslama L., Omar S., Saoudin H., Bourlet T., Aouni M., Pozzetto B., Pillet S. (2007) Typing of human enterovirus by partial sequencing of VP2. *J. Clin. Microbiol.* 45(8): 2370 – 2379

Nomoto A., Detjen B. M., Pozzatti R., Wimmer E. (1977) Location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 268(5617): 208 – 213

Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., and Pallansch M. A. (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* 37(5): 1288 – 1293

Oberste M. S., Michele S. M., Maher K., et al. (2004) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* 85(11): 3205 – 3212

Oberste M. S., Maher K., Williams A. J., Dybdahl – Sissoko N., Brown B. A., Gookin M. S., Penaranda S., Mishrik N., Uddin M., Pallansch M. A. (2006) Species-specific RT – PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 87(1): 119 – 128

Ochs K., Saleh L., Bassili G., Sonntag V., Zeller A., and Niepmann M. (2002) Interaction of translation factor eIF4B with poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* 76(5): 2113 – 2122

Palmenberg A. C. (1987) Picornaviral processing: some new ideas. *J. Cell Biochem.* 33(3): 191 – 198

- Paul A. V., Mugavero J., Molla A., and Wimmer E.** (1998) Internal ribosomal entry site scanning of the poliovirus polyprotein: implications for proteolytic processing. *Virology* 250(1): 241 – 253
- Pfister T., and Wimmer E.** (1999) Characterization of nucleotide triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem* 274(11): 6992 – 7001
- Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E.** (1999) Molecular biology. In “Encyclopedia of Virology” second edition (A. Granoff and R. G. Webster, Eds) *Academic Press Ltd*: 1330 – 1348
- Pilipenko E. V., Gmyl A. P., and Agol V. I.** (1995) A model for rearrangements in RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 23(11): 1870 – 1875
- Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T.** (2003) Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *EMBO* 22(8): 1909 – 1921
- Rohll J. B., Moon D. H., Evans D. J., and Almond J. W.** (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.* 69(12): 7835 – 7844
- Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Viktorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., and Agol V. I.** (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: A model of recombination between RNA genomes. *Virology* 155(1): 202 – 213
- Rossmann M. G. and Johnson J. E.** (1989) Icosahedral RNA virus structure. *Annual Rev. Biochem.* 58: 533 – 573
- Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J.** (2002) Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 10(7): 324 – 331
- Rotbart H. A.** (1991) Nucleic acid detection systems for enteroviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 4(2): 156 – 168
- Rueckert R. R.** (1985) Picornaviruses and their replication. In *Virology, New York, Raven Press* (ed. B. N. Fields): 705 – 738
- Sanfacon H., Gorbalenya A. E., Knowles N. J., and Chen Y.** (2011) *Picornavirales*. 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*: 835 – 839

Shaw A. E., Reid S. M., Knowles N. J., Hutchings G. H., Wilsden G., Brocchi E., Paton D., and King D. P. (2005) Sequence analysis of the 5' untranslated region of swine vesicular disease virus reveals block deletions between the end of the internal ribosomal entry site and the initiation codon. *J. Gen. Virol.* 86(10): 2753 – 2761

Stanway G., Hughes P. J., Mountford R. C., Minor P. D. and Almond J. W. (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.* 12(20): 7859 – 7875

Stanway G. (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* 71(11): 2483 – 2501

Toyoda H., Nicklin M. J., Murray M. G., Anderson C. W., Dunn J. J., Studier F. W. and Wimmer E. (1986) A second virus – encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell* 45(5): 761 – 770

Tsai Y. L., Tran B., and Palmer C. J. (1995) Analysis of viral RNA persistence in seawater by reverse transcriptase - PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1): 363 – 366

Umesha K. R., Bhavani N. C., Venugopal M. N., Karunasagar I., Krohne G., Karunasagar I. (2008) Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. *Int. J. Food Microbiol.* 122(3): 279 – 286

Wimmer E., Hellen C. U., and Cao X. (1993) Genetics of poliovirus. *Annual Rev. Genet.* 27: 353 – 436

Wong C. Y., Woodruff J. J., Woodruff J. F. (1977) Generation of cytotoxic T lymphocytes during coxsackievirus B-3 infection. III. Role of sex. *J. Immunol.* 119(2): 591 – 597

Zhang C., Haydon D. T., Knowles N. J., McCauley J. W. (1999) Molecular evolution of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.* 80(3): 639 – 651

Σιαφάκας Ν., Γεωργοπούλου Α., Μαρκουλάτος Π., Σπύρου Ν. (1999) Βιολογία των εντεροϊών: δομή, λειτουργία, παθογένεια και εξέλιξή τους. *ΜΕΡΟΣ Α', Hellenic Virology*, 4 (1): 7 – 24

Σιαφάκας Ν., Γεωργοπούλου Α., Μαρκουλάτος Π., Σπύρου Ν. (1999) Βιολογία των εντεροϊών: δομή, λειτουργία, παθογένεια και εξέλιξή τους. *ΜΕΡΟΣ Β', Hellenic Virology*, 4 (2): 65 – 80