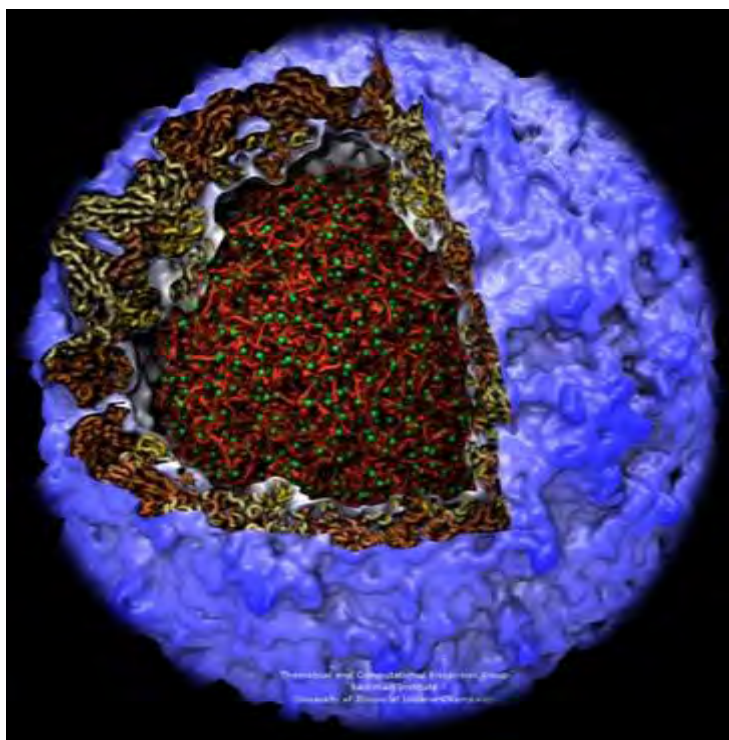




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΛΥΤΡΑ ΓΕΩΡΓΙΑ

**ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΑΛΛΟΙΩΣΕΩΝ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ RD ΑΦΟΥ
ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΩΣ ΤΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ SABIN 1 ΕΧΕΙ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΘΕΙ ΣΕ
ΥΨΗΛΕΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΕΣ.**



ΛΑΡΙΣΑ 2017

Έλεγχος κυτταρικών αλλοιώσεων σε κύτταρα Rd αφού προηγουμένως
το στέλεχος Sabin 1 έχει αδρανοποιηθεί σε υψηλές θερμοκρασίες.

Detection of cytopathogenic effects in Rd cells following inactivation
of Sabin 1 strain at high temperatures.

Τριμελής Επιτροπή

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ζ. ΚΥΡΙΑΚΟΠΟΥΛΟΥ: Μέλος Ε.Δι.Π (Εργαστηριακού Διδακτικού Προσωπικού) του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ: Επίκουρος καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Abstract

Enteroviruses belong to Picornaviridae family. Their genome consists of a single-stranded positive sense RNA of 7500 bp. These viruses have an icosahedral capsid consisting of 60 copies of the four structural proteins (VP1-VP4). The coding region of the genome codes for a polyprotein, which is subsequently cleaved by virus-encoded proteases into the structural capsid proteins (VP1-VP4) and the nonstructural proteins, that are involved in replication. Enterovirus infections are usually mild or asymptomatic, but some can lead to the occurrence of severe diseases, such as aseptic meningitis, and myocarditis especially in neonates and immunocompromised patients.

The aim of this study was to test whether inactivation at high temperatures can affect the integrity of the genome of enteroviruses. As part of this study we used a strand specific RT-PCR, which is a sensitive and non-time-consuming method for detecting the replicative negative strand, due to the specific structure of the initiator primer which was used in this assay. The results of the present study showed that the genome of enteroviruses is not affected by the inactivation temperature until the temperature of 82 °C.

Περίληψη

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των πικορναϊών. Το γένωμά τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μήκους 7500 bp. Οι ιοί αυτοί διαθέτουν εικοσαεδρικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών (VP1-VP4). Η κωδική περιοχή του γενώματος κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία στην συνέχεια διασπάται από ιικές πρωτεάσες στις 4 δομικές πρωτεΐνες (VP1-VP4) καθώς και σε μη δομικές, που εμπλέκονται στην αντιγραφή. Οι λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι συνήθως ήπιες ή ασυμπτωματικές αλλά επίσης ενδέχεται να οδηγήσουν στην εμφάνιση ποικίλων ασθενειών όπως είναι η άσηπτη μηνιγγίτιδα, και η μυοκαρδίτιδα, και ιδιαίτερα σε νεογνά και σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί αν η αδρανοποίηση σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του γενώματος των εντεροϊών. Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε μια strand specific RT-PCR, η οποία λόγω της ειδικής δομής του εκκινήτη που χρησιμοποιείται, αποτελεί μία ευαίσθητη και μη χρονοβόρα μέθοδο για την ανίχνευση του αντιγραφόμενου αρνητικού κλώνου. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής αποδεικνύουν ότι το γένωμα των εντεροϊών δεν επηρεάζεται από την θερμοκρασία αδρανοποίησης μέχρι την θερμοκρασία των 82 °C.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|----|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 7 |
| | 1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών..... | 7 |
| | 1.2 Δομή των ιοσωματίων..... | 7 |
| | 1.3 Δομή του ιικού γενώματος..... | 10 |
| | 1.4 Δομή του κυτταρικού υποδοχέα | 11 |
| | 1.5 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ..... | 13 |
| | 1.5.1 Προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα & είσοδος στο κύτταρο..... | 14 |
| | 1.5.2 Μετάφραση του ιικού RNA..... | 17 |
| | 1.5.3 Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης..... | 20 |
| | 1.5.4 Αντιγραφή του ιικού RNA..... | 21 |
| | 1.5.5 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιοσωματίων..... | 23 |
| 2 | ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ..... | 25 |
| 3 | ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ..... | 27 |
| 4 | ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ..... | 28 |
| 5 | ΕΛΕΓΧΟΣ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΑΠΟ ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ..... | 29 |
| 6 | ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ..... | 31 |
| 7 | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 32 |
| | 7.1 ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ Sabin 1..... | 32 |
| | 7.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΜΕ ΤΟ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ SABIN 1..... | 32 |
| | 7.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA..... | 33 |
| | 7.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA..... | 34 |
| | 7.5 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ..... | 35 |
| | 7.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)..... | 36 |
| | 7.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)..... | 37 |
| | 7.8 NESTED PCR..... | 40 |
| | 7.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ..... | 41 |
| 8 | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 43 |
| 9 | ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 49 |
| 10 | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 52 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών

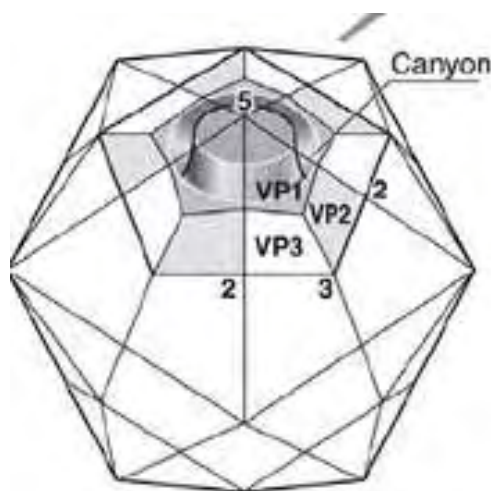
Οι εντεροϊοί αποτελούν μέλος της οικογένειας των πικορναϊών (Picornaviridae). Οι ιοί αυτοί δεν διαθέτουν έλυτρο και το γένωμά τους αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, το οποίο περιβάλλεται από καψίδιο. Το καψίδιο τους είναι εικοσαεδρικής συμμετρίας και αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων ιικών δομικών πρωτεϊνών (VP1-VP4). Εκτός από τους εντεροϊούς στην οικογένεια των πικορναϊών ανήκουν και άλλα γένη μερικά από τα οποία είναι: Cardiovirus, Arthovirus, Hepatovirus, Parechovirus, Erbovirus, Kobuvirus, Teschovirus, Sapelovirus, Senecavirus, Tremovirus, Avihepatovirus (1). Όσον αφορά το γένος των εντεροϊών, σε αυτό ανήκουν 12 γένη με διάφορους οροτύπους το καθένα, τα οποία είναι τα εξής: *Enterovirus A*, *Enterovirus B*, *Enterovirus C*, *Enterovirus D*, *Enterovirus E*, *Enterovirus F*, *Enterovirus G*, *Enterovirus H*, *Enterovirus J*, *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B*, *Rhinovirus C* (1).

Οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται κυρίως στο γαστρεντερικό σωλήνα ή στην ανώτερη αναπνευστική οδό, αλλά μπορούν επίσης να πολλαπλασιαστούν και σε άλλους ιστούς, όπως π.χ. στο νευρικό, στο μυϊκό και αλλού. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λοιμώξεων από εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές. Οι κλινικές εκδηλώσεις περιλαμβάνουν ασθένειες όπως το κοινό κρυολόγημα, την άσηπτη μηνιγγίτιδα, την εγκεφαλίτιδα, τη μυοκαρδίτιδα και την επιπεφυκίτιδα.

1.2 Δομή των ισωματίων

Τα ιικά σωματίδια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο που κυμαίνεται από 22-30 nm. Αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα, αλλά δεν διαθέτουν έλυτρο. Το καψίδιο που περιβάλλει το ιικό γένωμα διαθέτει 3 άξονες συμμετρίας: τον πενταμερή (5χ), ο οποίος εντοπίζεται στο κέντρο, και τον τριμερή (3χ) και διμερή

(2χ) οι οποίοι βρίσκονται μεταξύ των πενταμερών. Το ιικό καψίδιο αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών οι οποίες είναι :η VP1 (306 αμινοξέα,- 33 kD),η VP2 (272 αμινοξέα, -30kD), η VP3 (238 αμινοξέα, -26 kD), και η VP4(69 αμινοξέα, -7.5 kD) (2).



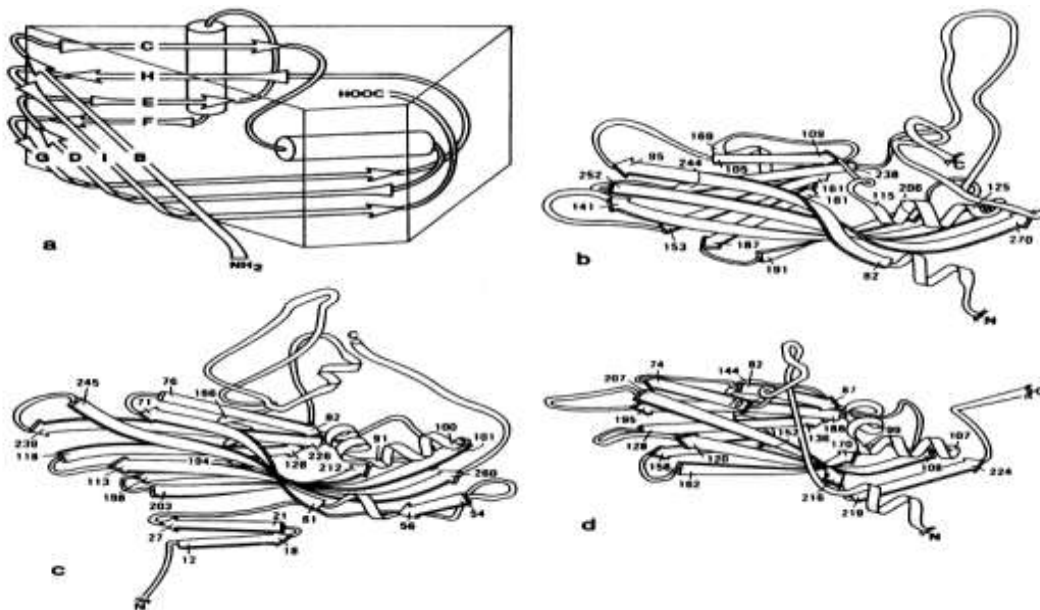
Εικόνα 1.2.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής του ιικού καψιδίου . Απεικονίζεται η εικοσαεδρική δομή του ιού καθώς και η διάταξη των VP1,VP2, και VP3 στην επιφάνεια του ισοσωματίου.Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ η VP2 και η VP3 εναλλάσσονται γύρω από το τριμερή άξονα συμμετρίας. Η χαρακτηριστική δομή που σχηματίζει το καψίδιο και περιβάλλει τον πενταμερή άξονα ,γνωστή ως Canyon, σχηματίζεται από τα κατάλοιπα των VP1, VP2 και VP3, και περιέχει την θέση δέσμευσης για τον κυτταρικό υποδοχέα .(2)

Κάθε μία από αυτές τις πρωτεΐνες αποτελείται από μία συγκεκριμένη τοπολογική κατανομή, και πιο συγκεκριμένα από ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β' - βαρελιού. Τέσσερις αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους και σχηματίζουν το ένα β-φύλλο, το οποίο σχηματίζει με την σειρά του την επάνω και την κάτω επιφάνεια των β-βαρελιών .Οι υπόλοιπες τέσσερις αλυσίδες συνθέτουν ένα μικρότερο β-φύλλο που σχηματίζει την οπίσθια επιφάνεια του β-βαρελιού. Οι αλυσίδες που συνθέτουν την μπροστινή και οπίσθια επιφάνεια του β-βαρελιού ενώνονται στο

ένα άκρο μέσω τεσσάρων θηλιών , δίνοντας στο β-βαρέλι το σχήμα μιας τριγωνικής «σφήνας» .(3)

Σε αντίθεση με τη συμπαγή δομή που παρατηρείται στις πρωτεΐνες VP1,VP2 και VP3 ,η πρωτεΐνη VP4 έχει μια πιο εκτεταμένη διαμόρφωση. Η μόνη συμπαγής δομή που συναντάται στη VP4 είναι δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα που βρίσκονται κοντά στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη VP4 έχει παρόμοια θέση και διαμόρφωση με το αμινοτελικό άκρο των VP1 και VP3, και έτσι φαίνεται να λειτουργεί σαν μια « προέκταση» του αμινοτελικού άκρου της VP2 και όχι τόσο ως μια ανεξάρτητη καψιδιακή πρωτεΐνη.

Επιπλέον στην επιφάνεια των ιικών σωματιδίων ,το καψίδιο δημιουργεί μια χαρακτηριστική δομή που μοιάζει με «φαράγγι»,η οποία ονομάζεται «Canyon».Η χαρακτηριστική αυτή δομή περιβάλλει κάθε πενταμερή άξονα και περιέχει τη θέση δέσμευσης του κυτταρικού υποδοχέα.



Εικόνα 1.2.2: Σχηματική απεικόνιση των καψιδιακών πρωτεϊνών. (α) Διάγραμμα που απεικονίζει το αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β' -βαρελιού και την τριγωνική σφηνοειδή του μορφή (b) VP1, (c) VP2, και (d) VP3.(3)

1.3 Δομή του ιικού γενώματος

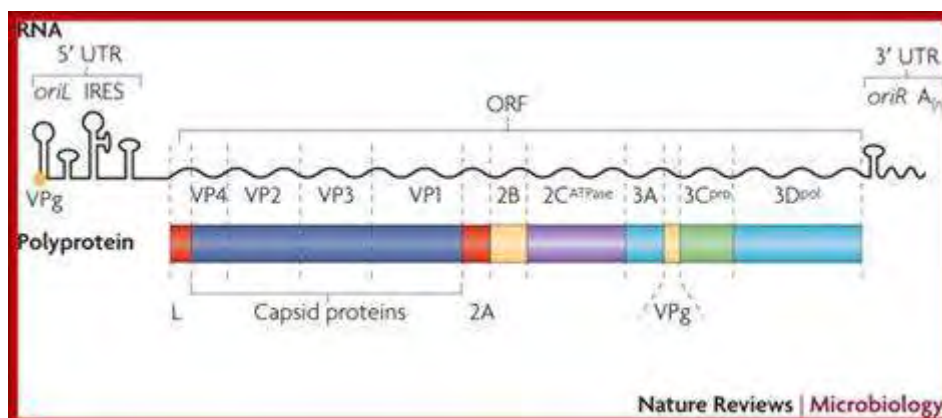
Το γένωμα των εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας το οποίο αποτελείται από μία 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'UTR) , ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης ,μια 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) και μια πολύ(A)-ουρά.Η κωδική περιοχή του γενώματος κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη η οποία στην συνέχεια διασπάται από ικές πρωτεάσες και διαχωρίζεται σε τρεις πρόδρομες περιοχές την P1,P2 και P3.Η P1 κωδικοποιεί τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1- VP4, ενώ οι πρόδρομες περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιικού γενώματος και την ωρίμανση των πρωτεϊνών, και περιλαμβάνουν 2 πρωτεάσες, μια ελικάση και μια 3D-πολυμεράση(RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση).Στο 5' -άκρο του ιικού γενώματος βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένο ένα πολυπεπτίδιο,το οποίο ονομάζεται VPg, το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη αποτελούμενη από 22 αμινοξέα.Όταν το ικό σωματίο απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή το πολυπεπτίδιο αυτό αποκόπτεται από το 5' - άκρο του ιικού γενώματος με την βοήθεια ενός ενζύμου του κυττάρου ξενιστή, το οποίο ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού. Ωστόσο μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη αυτή λειτουργεί ως εκκινήτης για την RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση και κατ'επέκταση για την σύνθεση του αρνητικού κλώνου[4].

Η 5'-αμετάφραστη περιοχή είναι αρκετά μεγάλη σε μήκος, συγκεκριμένα αποτελεί το 10% του ιικού γονιδιώματος.Η περιοχή αυτή έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στην έναρξη της διαδικασίας της μετάφρασης , κατευθύνοντας τα ριβοσώματα εντός της περιοχής IRES η οποία είναι το εσωτερικό σημείο πρόσδεσης των ριβοσωμάτων.Τα στοιχεία IRES με βάση την αλληλουχία και την δομή τους διακρίνονται σε 3 κατηγορίες:

- IRES τύπου I (πολιοϊοί, ιοί *coxsackie*, ρινοϊοί)
- IRES τύπου II (foot and mouth disease virus)
- IRES τύπου III (ιός της ηπατίτιδας A).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αλληλεπίδραση μεταξύ παραγόντων που υπάρχουν στην περιοχή IRES ,και δευτεροταγών δομών RNA ,διεγείρει την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος (5). Η 3'-αμετάφραστη περιοχή είναι μικρότερη σε μήκος και ακολουθείται από μια πολύ-A ουρά, η οποία απαιτείται για την αποτελεσματική

αντιγραφή του γονιδιώματος. Η 3' UTR χρησιμοποιείται για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου.



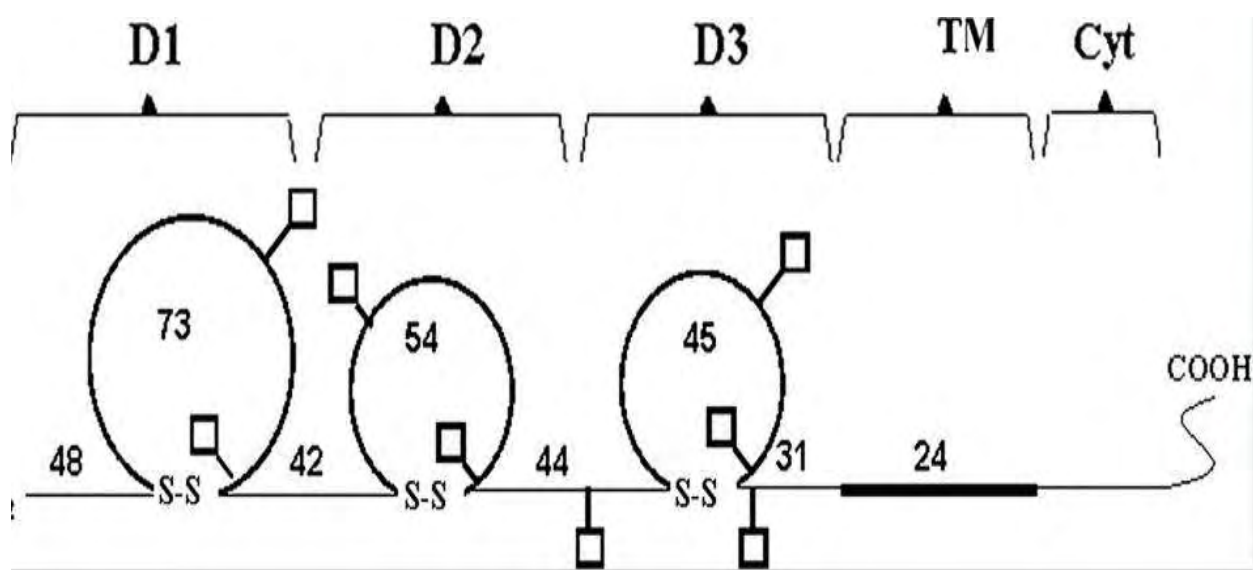
Εικόνα 1.3.1: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Απεικονίζεται το VPg συνδεδεμένο στο 5' άκρο, η περιοχή IRES, τα γονίδια που κωδικοποιούν για τις δομικές (VP1-VP4) και μη δομικές πρωτεΐνες (2B, 2C, 3A, 3C, 3D) η 3' UTR και η πολύ(A) ουρά. Η κωδική περιοχή του γενώματος κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται από ιικές πρωτεάσες στις πρόδρομες περιοχές P1, P2 και P3. Η P1 κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του καψιδίου ενώ οι P2 & P3 κωδικοποιούν για τις μη δομικές (2A, 3C → πρωτεάσες, 2C → ΑΤΡάση, 2B, 3A → πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή, 3D → RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση).

1.4 Δομή του κυτταρικού υποδοχέα

Η ικανότητα ενός ιού να αναγνωρίζει και να προσκολλάται στα κύτταρα-ξενιστές είναι απαραίτητη για την έναρξη της διαδικασίας της μόλυνσης των κυττάρων. Ωστόσο, η επιτυχής μόλυνση απαιτεί όχι μόνο την αναγνώριση των κυττάρων, αλλά απαιτεί επίσης την ενεργοποίηση διαδικασιών που έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κύτταρο.

Υπάρχουν διάφορα μόρια κυτταρικής επιφάνειας που λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους πικορναϊούς. Ο πιο χαρακτηριστικός κυτταρικός υποδοχέας, τον οποίο αναγνωρίζουν οι πιο καλά μελετημένοι ιοί από την οικογένεια των πικορναϊών, οι πολιοϊοί, είναι ο CD155. Ο υποδοχέας αυτός είναι ένα γλυκοσυλιωμένο μόριο κυτταρικής επιφάνειας το οποίο ανήκει στην υπεροικογένεια των Ig. Αποτελείται από 3 διαδοχικές Ig-like περιοχές (D1, D2, και D3), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια καρβοξυ-τερματική κυτταροπλασματική

περιοχή. Μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ισωμάτια των πολιοϊών συνδέονται στην Ig-like περιοχή D1, του κυτταρικού υποδοχέα CD155 (6).



Εικόνα 1.4.1: Σχηματική απεικόνιση του ανθρώπινου κυτταρικού υποδοχέα CD155. Απεικονίζονται οι Ig-like περιοχές D1, D2, και D3 οι οποίες ακολουθούνται από την διαμεμβρανική (TM) και τη κυτταροπλασματική περιοχή (Cyt). (6)

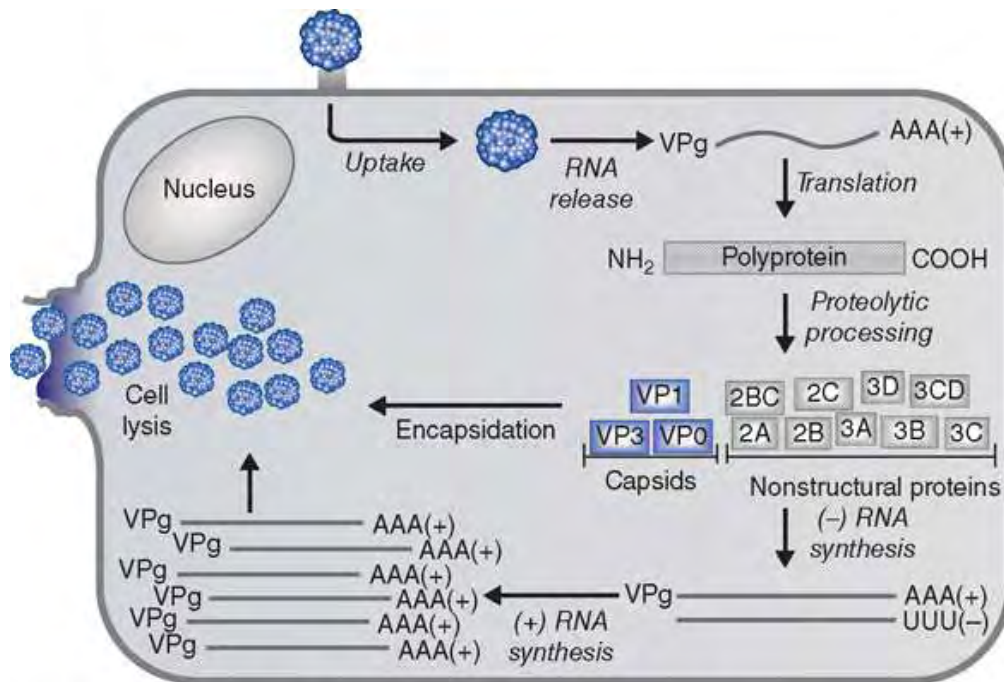
Ο κυτταρικός υποδοχέας CD155 ανήκει σε μια μεγάλη κατηγορία μορίων που διαθέτουν « Ig-like» πτυχώσεις, των οποίων η κυρία λειτουργία σχετίζεται με την κυτταρική προσκόλληση και ενεργοποίηση. Ο CD155 ενεργοποιεί επίσης τα NK κύτταρα ((natural killer cells) και επιπλέον έχει αναφερθεί ότι παίζει ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα και στην εισβολή των καρκινικών κυττάρων.

Η αμινοτελική περιοχή του CD155, η D1, η οποία είναι υπεύθυνη για την ιική αναγνώριση, συνδέεται άμεσα με τις μεταβλητές επικράτειες των αντισωμάτων. Η έλλειψη των περιοχών D2 και D3 του CD155 φαίνεται να μην επηρεάζει την διαδικασία της μόλυνσης των κυττάρων- ξενιστών από τον ιό, ωστόσο παρατηρείται μείωση της απόδοσης της μόλυνσης.

1.5 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

Το πρώτο βήμα στην ιική μόλυνση είναι η προσκόλληση του ιικού σωματίου στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Η παρουσία ή η απουσία των υποδοχέων παίζει καθοριστικό ρόλο στην παθογένεια του ιού. Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι δεν εκφράζουν όλα τα κύτταρα ενός ξενιστή τους απαραίτητους υποδοχείς: για παράδειγμα, ο ιός της πολιομυελίτιδας μπορεί να μολύνει μόνο τα κύτταρα του κεντρικού νευρικού συστήματος και του εντερικού σωλήνα. Κάθε κύτταρο-ξενιστής μπορεί να περιέχει έως και 100.000 υποδοχείς για έναν δεδομένο ιό. Το στάδιο της προσκόλλησης μπορεί να ξεκινήσει με κάποιες μη αναστρέψιμες αλλαγές στην δομή του ιοσωματίου(7). Μετά τη πρόσδεση στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή, το ιοσωμάτιο εισέρχεται στο εσωτερικό του κυττάρου όπου πραγματοποιείται και η απέκδυση του ιού. Η διαδικασία της απέκδυσης είναι ο φυσικός διαχωρισμός του ιικού νουκλεϊκού οξέος από τα εξωτερικά δομικά συστατικά του ιοσώματος έτσι ώστε να μπορεί να δράσει.

Ο κύκλος της αντιγραφής του ιού ξεκινά μετά την απέκδυση. Από την στιγμή που το ιικό RNA θετικής πολικότητας εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται απευθείας προκειμένου να συντεθούν οι πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες τόσο για την αντιγραφή του γενώματος όσο και για την μετέπειτα σύνθεση των νέων ιοσωμάτων. Η κωδική περιοχή του γενώματος κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη η οποία στην συνέχεια με την βοήθεια ιικών πρωτεασών διασπάται και συνθέτει τις δομικές(VP1-VP4) και τις μη δομικές ιικές πρωτεΐνες(2 πρωτεάσες, 1 ελικάση, RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση & 2 πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή). Στο 1^ο στάδιο πραγματοποιείται η αντιγραφή των θετικών κλώνων RNA. Σε αυτό το στάδιο συντίθεται ένα ενδιάμεσο μόριο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο στην συνέχεια λειτουργεί ως εκμαγείο για την παραγωγή νέων θετικών κλώνων RNA. Ακολουθεί η καψιδίωση και τέλος η απελευθέρωση των νεοσυντεθειμένων ιοσωμάτων, μέσω της λύσης των μολυσμένων κυττάρων (8).



Source: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 26th Edition: www.accessmedicine.com

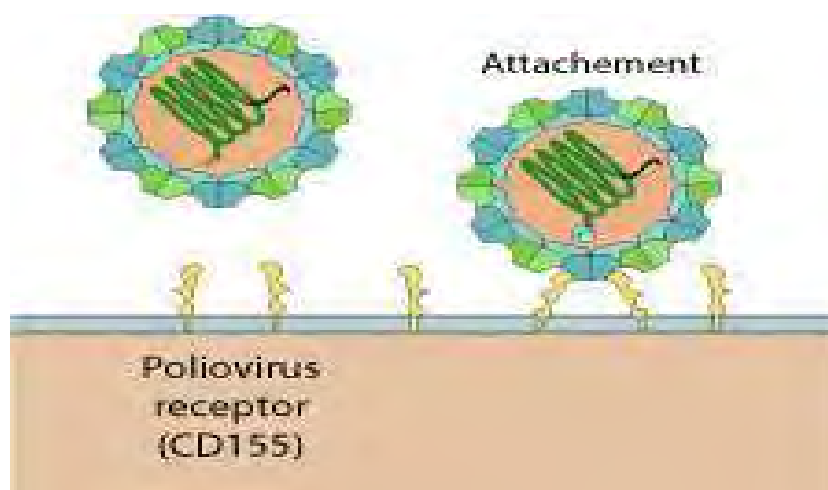
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Εικόνα 1.5.1: Σχηματική απεικόνιση του κύκλου ζωής των εντεροϊών. Αρχικά πραγματοποιείται η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Στην συνέχεια ο ιός εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και ακολουθεί η απέκδυση. Έπειτα το πολυπεπτίδιο VPg αποκόπτεται από το ιικό RNA. Ακολουθεί η μετάφραση του ιικού RNA από την οποία προκύπτει η πολυπρωτεΐνη η οποία όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα τεμαχίζεται με την βοήθεια ικών πρωτεασών δίνοντας τις δομικές και τις μη δομικές πρωτεΐνες. Στην συνέχεια γίνεται η αντιγραφή κατά την οποία οι (+) κλώνοι RNA αντιγράφονται για να συνθέσουν νέους (-) κλώνους RNA, οι οποίοι στην συνέχεια λειτουργούν ως εκμαγείο για την σύνθεση πρόσθετων (+) κλώνων RNA. Ακολουθεί η καψιδίωση και η απελευθέρωση των νέων μολυσματικών ισωμάτων μέσω της λύσης του μολυσμένου κυττάρου.

1.5.1 Προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα & είσοδος στο κύτταρο

Το πρώτο στάδιο του κύκλου ζωής των εντεροϊών ξεκινά όταν ο ιός προσδέεται σε ειδικούς πρωτεϊνικούς υποδοχείς που βρίσκονται στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Ο πιο καλά μελετημένος ιός από την οικογένεια των πικορναϊών, ο πολιοϊός μπορεί να μολύνει και να αντιγραφεί μόνο σε κύτταρα που φέρουν στην επιφάνειά τους τον κατάλληλο πρωτεϊνικό υποδοχέα, ο οποίος ονομάζεται CD155 ή PVR. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, ο υποδοχέας αυτός είναι μια μεμβρανική πρωτεΐνη η

οποία ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Ig και διαθέτει 3 Ig-like περιοχές (D1, D2, D3) οι οποίες ακολουθούνται από μια διαμεμβρανική (TM) και μια κυτταροπλασματική περιοχή (Cyt). Μελέτες έχουν δείξει ότι μόνο η πρώτη (αμινοτελική) Ig-like περιοχή (D1) του υποδοχέα CD155 συνδέεται με την επιφάνεια του ισωματίου(3). Η χαρακτηριστική δομή Canyon που συναντάται στην επιφάνεια του ισωματίου περιέχει την θέση αναγνώρισης για τον κυτταρικό υποδοχέα.

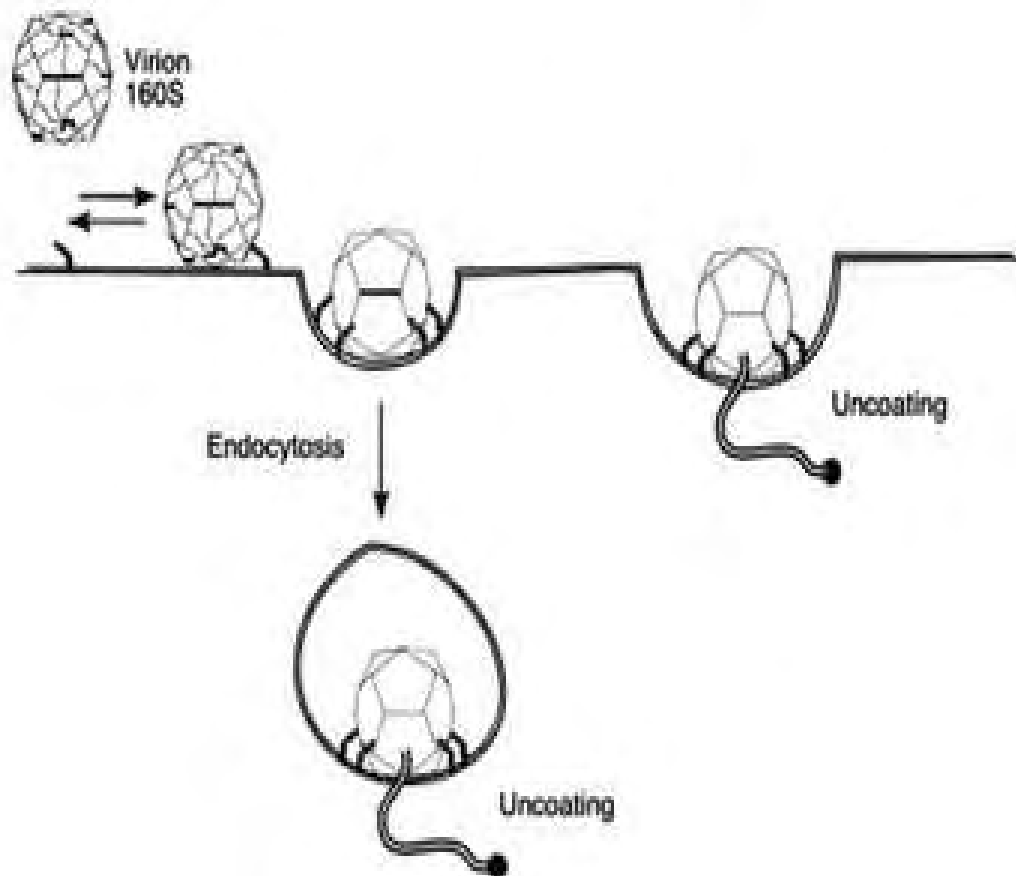


Εικόνα 1.5.1.1: Σχηματική απεικόνιση της πρόσδεσης ενός πολιοϊού με τον υποδοχέα του CD155. Η σύνδεση του ισωματίου με τον υποδοχέα του οδηγεί στην είσοδο του ιικού γενώματος στο κύτταρο, γεγονός που θα έχει σαν αποτέλεσμα είτε να ενεργοποιηθούν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια ή θα επιτρέψει στα ισωμάτια να μεταφερθούν μέσω των κυττάρων ξενιστών σε ένα συγκεκριμένο όργανο.

Πηγή: ViralZone

Η δέσμευση του ισωματίου στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή οδηγεί σε διάφορες διαμορφωτικές αλλαγές στη δομή του ιικού καψιδίου με αποτέλεσμα να δημιουργούνται τα τροποποιημένα σωματίδια A. Τα σωματίδια αυτά είναι υδροφοβικά και δεν διαθέτουν την καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Σε αυτά τα τροποποιημένα ισωμάτια, το αμινοτελικό άκρο της VP1 (το οποίο φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου) έχει μετατοπισθεί στην επιφάνεια του ιικού καψιδίου. Το ιικό RNA εξέρχεται από το σωματίο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσου των ενδοσωμάτων. Αυτό πραγματοποιείται διαμέσου των πόρων που δημιουργούνται

στην πλασματική μεμβράνη οι οποίοι δημιουργούνται πιθανότατα λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιικών πρωτεϊνών και της πλασματικής μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή (9).



Εικόνα 1.5.1.2: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού εισόδου ενός πολιοϊού στο εσωτερικό του κυττάρου-ξενιστή. (8)

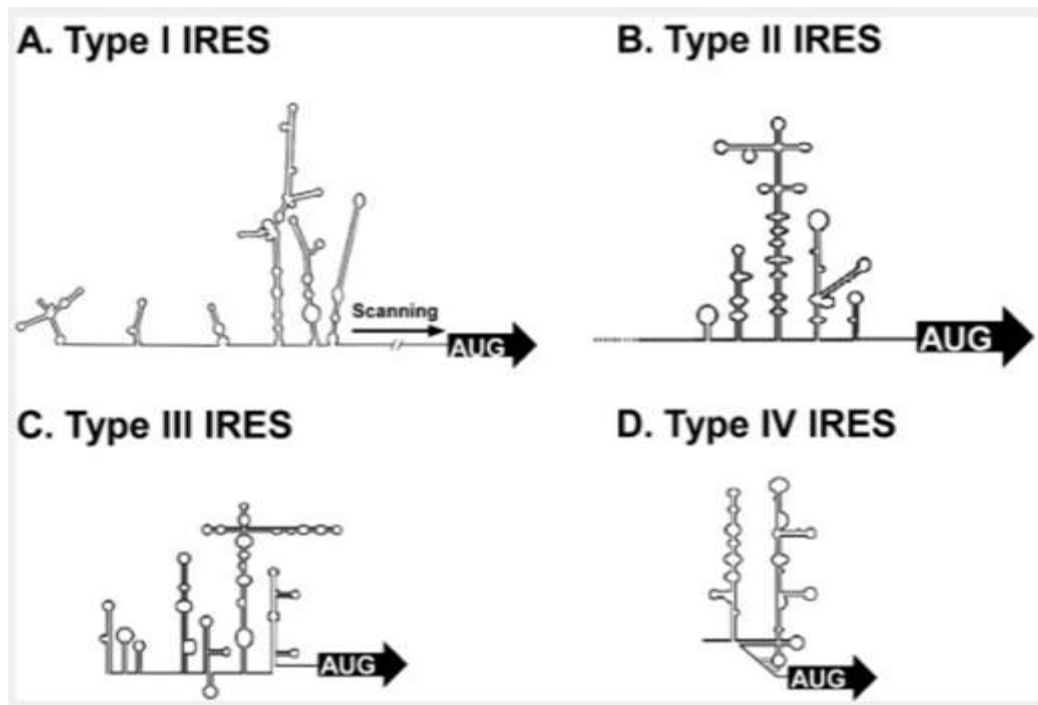
1.5.2 Μετάφραση του ιικού RNA

Από την στιγμή που το ιικό RNA εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή μπορεί να μεταφραστεί απευθείας . Στο 5' – άκρο του ιικού RNA (όπως φαίνεται στην εικόνα 1.3.1) είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο το πολυπεπτίδιο VPg. Όταν ο ιός εισέλθει στο κύτταρο το πολυπεπτίδιο αυτό αποκόπτεται με τη βοήθεια του ενζύμου διαχωρισμού , και εφόσον το ιικό RNA είναι θετικής πολικότητας μπορεί να μεταφραστεί απευθείας (λειτουργεί παράλληλα ως mRNA).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το mRNA αρχίζει να μεταφράζεται όταν η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα αναγνωρίσει την 5' καλύπτρα του mRNA. Έπειτα συνδέεται η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα με τη μεγάλη υπομονάδα , και συναρμολογείται το ριβόσωμα. Στη περίπτωση όμως των πικορναϊών το ιικό RNA δεν διαθέτει μεθυλιωμένη 5' καλύπτρα καθώς όπως είναι γνωστό η διαδικασία προσθήκης της 5'- καλύπτρας πραγματοποιείται στον πυρήνα (ως αποτέλεσμα της δράσης κυτταρικών ενζύμων), ενώ ο κύκλος ζωής των πικορναϊών λαμβάνει χώρα αποκλειστικά μέσα στο κυτταρόπλασμα (12). Μετά τη μόλυνση του κυττάρου από τον ιό η μετάφραση των κυτταρικών mRNAs αναστέλλεται. Ωστόσο η μετάφραση του ιικού γενώματος πραγματοποιείται κανονικά μέσα στο κυτταρόπλασμα άλλα με έναν διαφορετικό μηχανισμό μετάφρασης σε σχέση με τον μηχανισμό των ευκαρυωτών (12) .

Πιο συγκεκριμένα στους πικορναϊούς υπάρχει μια δευτεροταγή δομή η οποία ονομάζεται εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος ή IRES (internal ribosome entry site). Η περιοχή αυτή εντοπίζεται στην 5'- UTR του ιικού RNA και προάγει την εσωτερική δέσμευση της ριβοσωμικής υπομονάδας 40 S .

Οι ικές IRES χωρίζονται σε 5 ομάδες με βάση διάφορα κριτήρια , τα οποία περιλαμβάνουν την πρωτοταγή ή δευτεροταγή τους δομή και το σημείο εντοπισμού του κωδικονίου έναρξης (εικόνα 1.5.2.1.). Στα IRES τύπου 1 (εντοπίζονται στο γένωμα των εντεροϊών και των ρινοϊών) και τύπου 3 (εντοπίζονται στον ιό της ηπατίτιδας) το κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται 50 – 100 νουκλεοτίδια πριν το 3' άκρο του IRES . Στα IRES τύπου 2 (εντοπίζονται στο γένωμα των καρδοϊών και των αφθοϊών) το κωδικόνιο έναρξης εντοπίζεται εντός του 3' άκρου του IRES.



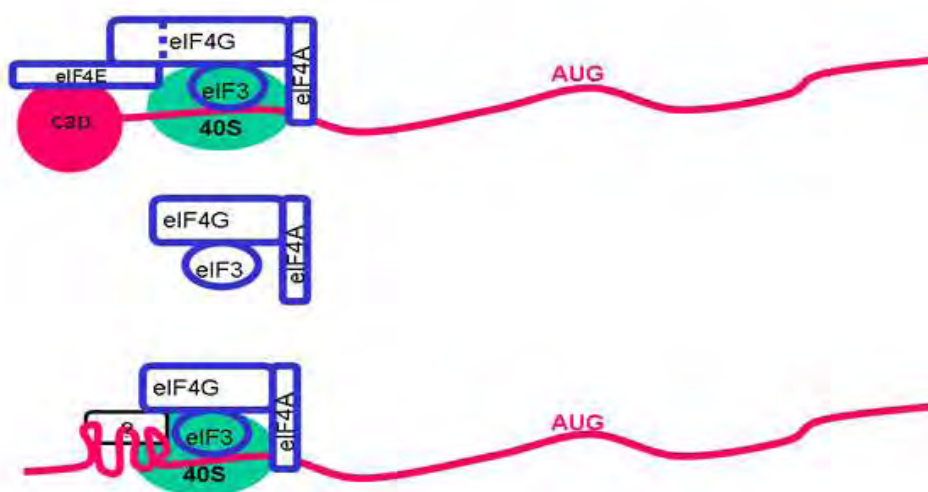
Εικόνα 1.5.2.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής των IRES τύπου 1,2,3 και 4. Τα IRES τύπου 1 εντοπίζονται στο γένωμα των εντεροϊών και των ρινοϊών , τα IRES τύπου 2 στους αφθοϊούς και στους καρδιοϊούς και τα IRES τύπου 3 εντοπίζονται στον ιό της ηπατίτιδας . Τέλος τα IRES τύπου 4 εντοπίζονται στον PTV 1 (*porcine rehovirus serotype 1*).

Αξίζει να σημειωθεί ότι μεταξύ των διαφόρων τύπων IRES εντοπίζονται μικρές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που είναι συντηρημένες. Επιπλέον οι IRES των πικορναϊών περιέχουν εκτεταμένες περιοχές δευτεροταγών δομών RNA οι οποίες δεν είναι αυστηρά συντηρημένες αλλά ωστόσο είναι σημαντικές για τη δέσμευση του ριβοσώματος .Μια αλληλουχία που φαίνεται να είναι συντηρημένη μεταξύ των IRES τύπου 1 και 4 είναι η GNRA (όπου G → γουανίνη , N → οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο , R → πουρίνη και A → αδενίνη).Ένα άλλο συντηρημένο στοιχείο είναι το Yn-Xm-AUG .Η Yn είναι μια περιοχή πλούσια σε πουρίνη ενώ η Xm είναι μια αλληλουχία 15 – 20 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από ένα κωδικόνιο AUG (8).

Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του IRES τύπου 1 απαιτεί την δέσμευση της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας 40S στην περιοχή IRES . Ακολούθως η υπομονάδα 40 S «διαβάζει» την αλληλουχία του ιικού mRNA για να εντοπίσει τη θέση του κωδικονίου έναρξης . Η υπομονάδα 40 S μπορεί να συνδεθεί απευθείας στο mRNA

ή μπορεί να οδηγηθεί στην περιοχή IRES μέσω της αλληλεπίδρασης της με κυτταρικές πρωτεΐνες. Στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από πικορναϊούς ο κυτταρικός παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4G , αποικοδομείται με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η μετάφραση των κυτταρικών mRNAs. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι ο παράγοντας eIF4G του κυτάρου ξενιστή δεν είναι απαραίτητος για τη λειτουργία της περιοχής IRES (8). Ωστόσο μελέτες απέδειξαν ότι η καρβοξυτελική περιοχή του κυτταρικού παράγοντα eIF4G, η οποία περιέχει θέση δέσμευσης για τους παράγοντες eIF3 και eIF4A , προάγει τη μετάφραση μέσω της IRES .

Αυτές οι ενδείξεις οδήγησαν στη δημιουργία ενός μοντέλου μηχανισμού έναρξης της μετάφρασης , σύμφωνα με το οποίο η υπομονάδα 40S δεσμεύεται στην περιοχή IRES μέσω της αλληλεπίδρασής της με τον παράγοντα eIF3 , ο οποίος είναι δεσμευμένος στην καρβοξυτελική περιοχή του eIF4G (8).

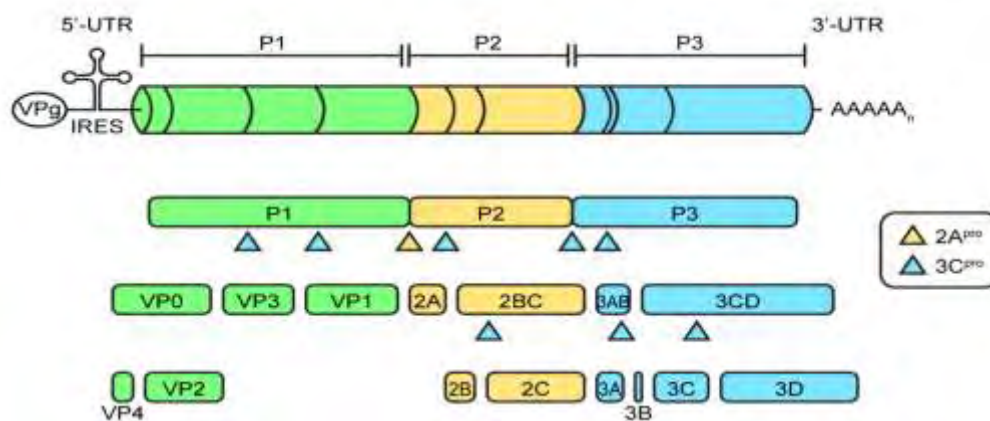


Εικόνα 1.5.2.2: Μοντέλο σχηματισμού του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης . Η ριβοσωμική υπομονάδα 40S δεσμεύεται στο 5' άκρο του mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα eIF3 , ο οποίος είναι δεσμευμένος με τον παράγοντα eIF4G . Έτσι το σύμπλοκο eIF3 – 40S φαίνεται ότι στρατολογείται στο 5' άκρο του κώδικα RNA , μέσω της αλληλεπίδρασης του κυτταρικού παράγοντα eIF4G με την IRES(12).

1.5.3 Επεξεργασία ιικής πολυπρωτεΐνης

Η μετάφραση του ιικού RNA έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση μιας πολυπρωτεΐνης (MB =250000) η οποία στη συνέχεια με τη βοήθεια ικών πρωτεασών διασπάται σε τρεις πρόδρομες περιοχές , την P1 ,P2 και P3 .Η περιοχή P1 κωδικοποιεί για τις 4 καψιδιακές πρωτεΐνες ενώ οι περιοχές P2 και P3 κωδικοποιούν για τις μη δομικές πρωτεΐνες.

Η πρωτεολυτική διάσπαση λαμβάνει χώρα σε τρία διακριτά βήματα. Πιο συγκεκριμένα η πρώτη διάσπαση πραγματοποιείται ενώ βρίσκεται ακόμα σε εξέλιξη η σύνθεση της πολυπρωτεΐνης. Η διάσπαση αυτή πραγματοποιείται μεταξύ των πρόδρομων περιοχών P2 και P3 (μεταξύ των πεπτιδίων VP1 και 2A) και καταλύεται από την ική πρωτεάση 2A. Στο δεύτερο βήμα πραγματοποιείται η πρωτεόλυση όλων των υπόλοιπων περιοχών η οποία επιτυγχάνεται με τη βοήθεια της πρωτεάσης 3C. Οι περισσότερες διασπάσεις που γίνονται μέσω αυτής της πρωτεάσης εντοπίζονται μεταξύ γλουταμινικού οξέος ή γλουταμίνης και γλυκίνης . Η τελική διάσπαση πραγματοποιείται πιθανώς στην περιοχή VP0 (πεπτίδιο 1AB) προκειμένου να συντεθούν ο καψιδιακές πρωτεΐνες VP2 και VP4.



Εικόνα 1.5.3.1 : Σχηματική απεικόνιση της πρωτεολυτικής διάσπασης της ιικής πολυπρωτεΐνης . Η πολυπρωτεΐνη διασπάται στις τρεις πρόδρομες περιοχές P1 , P2 και P3 και στη συνέχεια αυτές οι περιοχές διασπώνται με τη βοήθεια των ικών πρωτεασών 2A^{pro} και 3C^{pro} . Τα προϊόντα της διάσπασης είναι οι δομικές πρωτεΐνες (VP1-VP4) και οι λειτουργικές πρωτεΐνες (2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D). (19)

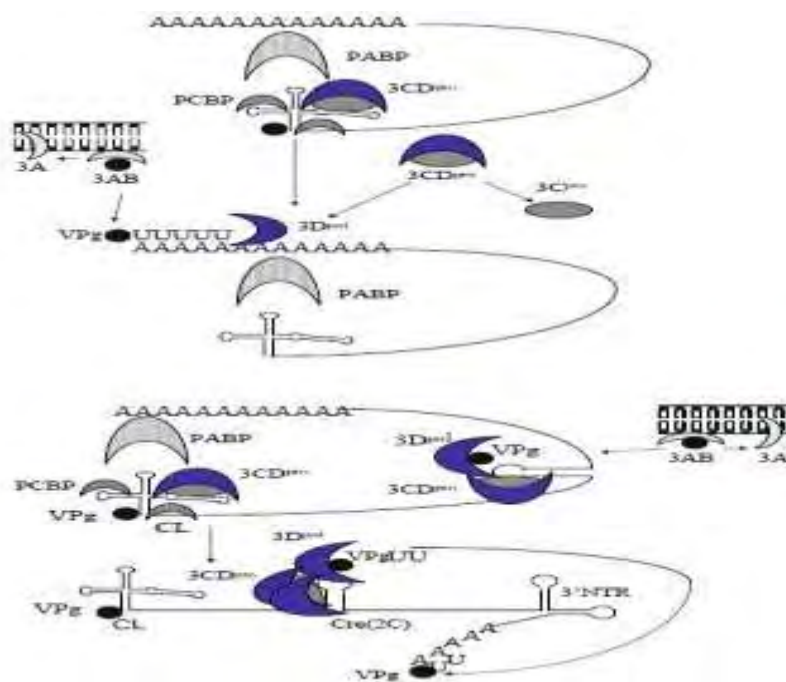
Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεολυτική διάσπαση της VP0 σημειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ιού. Προφανώς η VP0 είναι απαραίτητη για τη σωστή συναρμολόγηση των πρωτομερών ενώ η πρωτεολυτική της διάσπαση είναι απαραίτητη για τη σωστή συναρμολόγηση των ιοσωματίων(20).

1.5.4 Αντιγραφή του ιικού RNA

Για να μπορέσει να ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA θα πρέπει πρωταρχικά να τερματιστεί η μετάφραση διότι το ριβόσωμα και η RNA πολυμεράση χρησιμοποιούν το ίδιο μόριο RNA ως μήτρα αλλά κινούνται με αντίθετες κατευθύνσεις. Η μετάβαση από τη μετάφραση στην αντιγραφή πραγματοποιείται όταν τα επίπεδα της πρωτεάσης 3CD^{PRO} φθάσουν σε ένα συγκεκριμένο κρίσιμο σημείο. Σε αυτό το κρίσιμο σημείο η 3CD^{PRO} δεσμεύεται στην δομή 'cloverleaf' ή δομή τριφυλλιού (βρίσκεται στο 5' - άκρο της 5'- UTR) και εμποδίζει την αλληλεπίδραση της PCBP-2 (βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) με την περιοχή IRES. Με αυτόν τον τρόπο αναστέλλεται η μετάφραση και προάγεται η σύνθεση του αρνητικού κλώνου RNA. Το πρόβλημα με αυτό το μοντέλο μηχανισμού είναι ότι οι μηχανισμοί της μετάφρασης και της σύνθεσης του RNA στην ουσία <συνυπάρχουν> μέσα στο μολυσμένο κύτταρο.

Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου RNA πραγματοποιείται στο 3' άκρο του ιικού γενώματος και συγκεκριμένα στην πολυ A ουρά. Κατά την έναρξη της αντιγραφής το πολυπεπτίδιο VPg ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια η ουριδιλιωμένη VPg χρησιμοποιείται σαν εκκινητής από την RNA πολυμεράση.

Υπάρχουν 2 μοντέλα για τον σχηματισμό της ουριδιλιωμένης VPg. Σύμφωνα με το πρώτο μοντέλο το VPg ουριδιλιώνεται στην πολυ A ουρά του RNA και το παραγόμενο VPgU λειτουργεί σαν εκκινητικό μόριο για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο το VPg ουριδιλιώνεται στην περιοχή cre (2c) και στη συνέχεια λειτουργεί σαν εκκινητής για τη σύνθεση του θετικού κλώνου. Έχει προταθεί ότι η ουριδιλίωση του VPg στη cre (2c) παρατηρείται κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων RNA και όχι κατά τη σύνθεση των αρνητικών (4). Το τελικό προϊόν σύμφωνα και με τα δύο μοντέλα είναι ένα ενδιάμεσο δίκλωνο RNA (RF).

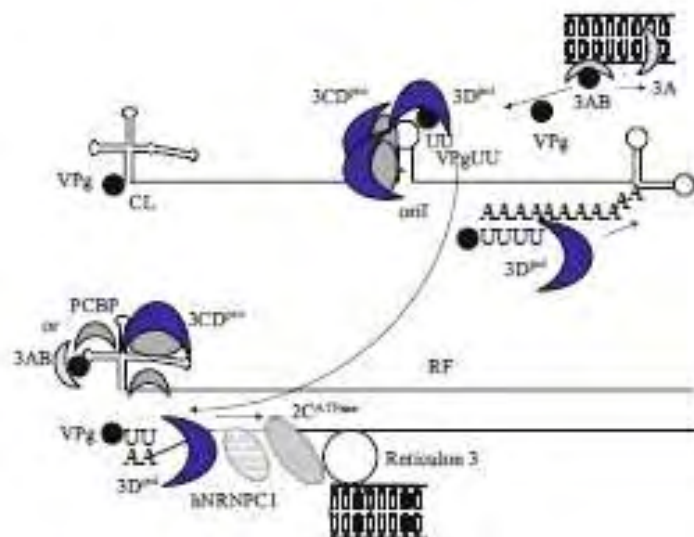


Εικόνα 1.5.4.1 : Μοντέλο μηχανισμού σύνθεσης του αρνητικού κλώνου (A) . Το VPg ουριδυλιώνεται στην πολυ- A ουρά και το παραγόμενο VPgUrU λειτουργεί ως εκκινήτης για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου (B). Το VPg ουριδυλιώνεται στο στοιχείο oril και το VPgUrU μετατοπίζεται προς το 3' - άκρο της πολυ - A ουράς . (27)

Προτού ξεκινήσει η σύνθεση του αρνητικού κλώνου RNA ένα διμερές πρωτεασών 3CD^{PRO} προσδένεται στο πάνω μέρος του στοιχείου oril (βρίσκεται στην κωδική περιοχή της ATPάσης 2C) και το αποσταθεροποιεί . Η 3D-πολυμεράση στη συνέχεια δεσμεύεται στο στοιχείο oril μέσω της αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών 3C^{PRO} , 3CD^{PRO} και 3D^{POI} . Το VPg το οποίο προέρχεται από την διάσπαση της 3AB αλληλεπιδρά με την 3D-πολυμεράση και ουριδυλιώνεται . Μετά την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA , τα άκρα του ενδιάμεσου δίκλωνου μορίου RNA (RF) ξετυλίγονται μέσω μιας κυτταρικής ελικάσης και επιπλέον προάγεται ο σχηματισμός της δομής cloverleaf του αρνητικού κλώνου μέσω της σύνδεσης της πρωτεΐνης hnRNP C με τη ATPάση 2C . Η πρωτεΐνη hnRNP C (heterogenous ribonuclear ptotein C) είναι μια πρωτεΐνη η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά τόσο με το 5'- άκρο όσο και με το 3'-άκρο του αρνητικού κλώνου και επιπρόσθετα παίζει ρόλο στη σύνθεση του θετικού κλώνου . Παράλληλα με αυτή την διαδικασία πραγματοποιείται και ο σχηματισμός της δομής cloverleaf του

θετικού κλώνου RNA μέσω της αλληλεπίδρασης των περιοχών που βρίσκονται στο 5'-άκρο του θετικού κλώνου με το σύμπλοκο PCB2/3 CD^{pro} ή με το σύμπλοκο 3AB/3 CD^{pro}. Μόλις τα άκρα RF ξετυλιχθούν η ουριδιλιωμένη VPg, η VPgρUpU μετατοπίζεται από το στοιχείο orf1 προς το 3- άκρο του αρνητικού κλώνου. Επομένως οι αλληλουχίες που βρίσκονται στο 5' - άκρο αλλά και η δομή cloverleaf του αρνητικού κλώνου RNA παίζουν καθοριστικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του θετικού κλώνου. (27).

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η διαδικασία της αντιγραφής είναι ασύμμετρη καθώς η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών κλώνων.



Εικόνα 1.5.4.2 Μοντέλο μηχανισμού σύνθεσης του θετικού κλώνου . Τα άκρα του ενδιάμεσου μορίου RNA (RF) ξετυλίγονται μέσω της δράσης κυτταρικών και ιικών πρωτεϊνών . Το VPg ουριδιλιώνεται στο στοιχείο orf1 και το παραγόμενο VPgρUpU μετατοπίζεται προς το 3' - άκρο του αρνητικού κλώνου . Το VPgρUpU λειτουργεί ως εκκινητής για τη σύνθεση του θετικού κλώνου .(27)

1.5.5 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιοσωματίων

Μετά την επεξεργασία της πρόδρομης περιοχής P1 της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP0, VP3 και VP1 οι οποίες συνδέονται και σχηματίζουν

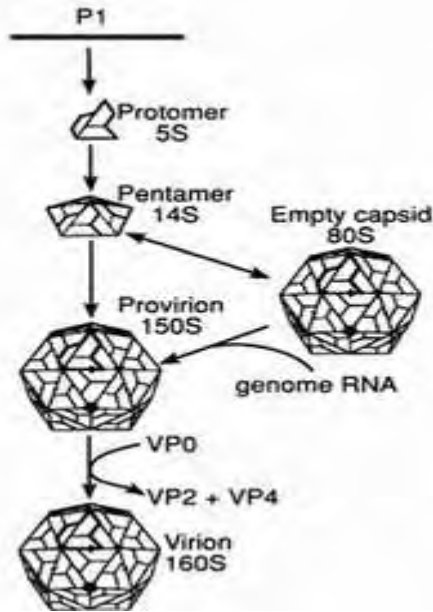
ένα πρωτομερές 5S . Στην συνέχεια 5 πρωτομερή συνδέονται και σχηματίζουν ένα πενταμερές 14S . Ωστόσο ο ακριβής ρόλος των πενταμερών είναι ακόμη αμφιλεγόμενος. Σύμφωνα με μια τελευταία έρευνα τα πενταμερή συμπυκνώνονται γύρω από το ιικό RNA κατά τη διάρκεια της συναρμολόγησης προκειμένου να συνθέσουν έναν προϊό. Επιπρόσθετα πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι τα πενταμερή 14S είναι σημαντικά για τον σχηματισμό των ώριμων ιικών σωματιδίων.

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιείται η συγκρότηση των άδειων καψιδίων 80S τα οποία ονομάζονται προκαψίδια και αποτελούνται από 12 πενταμερή αλλά δεν διαθέτουν καθόλου ιικό RNA . Προηγούμενες μελέτες απέδειξαν την ύπαρξη 2 λειτουργικών μορφών των προκαψιδίων που περιλαμβάνουν μια ενεργή και μια ανενεργή μορφή. Το προκαψίδιο στην ενεργή του μορφή μπορεί να αποσυναρμολογηθεί στα επιμέρους πενταμερή και τα πενταμερή αυτά στη συνέχεια μπορούν να συνδεθούν και να σχηματίσουν ένα σταθερό προκαψίδιο. Το επόμενο βήμα στη διαδικασία συναρμολόγησης των νέων ιοσωματίων είναι ο σχηματισμός του προϊού ή των σωματίων 160S τα οποία αποτελούνται από 12 πενταμερή και διαθέτουν το ιικό RNA(32).

Το τελευταίο βήμα της μορφογένεσης περιλαμβάνει τον τεμαχισμό της VP0 σε VP2 και VP4 . Η διαδικασία αυτή ενεργοποιεί την αναδιάταξη των καψιδιακών πρωτεϊνών και προσδίδει σταθερότητα στο σωματίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του ιικού σωματιδίου σχηματίζεται μια ειδική περιοχή στην κορυφή του πενταμερή άξονα του ιού η οποία περιβάλλεται από μια δομή που μοιάζει με 'φαράγγι' και ονομάζεται δομή Canyon. Όλοι οι εντεροϊοί διαθέτουν την δομή αυτή η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του ιοσωματίου στον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή.

Μετά την συναρμολόγηση των νέων ιικών σωματίων ο ιός συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα και τα νέα μολυσματικά ιοσωμάτια απελευθερώνονται μέσω της λύσης του μολυσμένου κυττάρου.

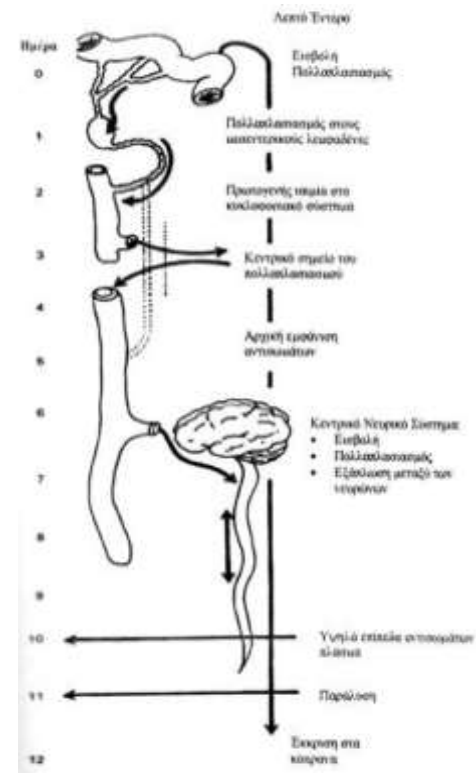


Εικόνα 1.5.5.1: Σχηματική απεικόνιση της συναρμολόγησης των πικορναϊών. Η πρόδρομη περιοχή P1 τεμαχίζεται και προκύπτουν οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP0+VP3+VP4 οι οποίες συνδέονται και σχηματίζουν ένα πρωτομερές 5S. Στη συνέχεια 5 πρωτομερή συνδέονται και συνθέτουν το πενταμερές 14S. Σε επόμενο στάδιο σχηματίζονται τα άδεια καψίδια 80S μέσω της σύνδεσης των πενταμερών 14S. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό της VP0 σε VP2 και VP4 και τον σχηματισμό του ισοωματίου 160S (8).

2. Παθογένεια

Οι εντεροϊοί εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω του στόματος και στην συνέχεια οδηγούνται στον πεπτικό σύστημα. Η περίοδος επώασης (=είναι ο χρόνος από την στιγμή της έκθεσης στον ιό μέχρι και την εκδήλωση της νόσου) κυμαίνεται μεταξύ 7 και 14 ημερών αλλά επίσης μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως και 35 ημέρες. Μετά τον συνεχή πολλαπλασιασμό του ιού και την είσοδό του στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να προκληθεί μια χαμηλού βαθμού ιαιμία, στον λεμφικό ιστό του φάρυγγα και του εντέρου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να μεταδοθεί ο ιός και σε άλλα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, αλλά επιπλέον και να μολύνει τα όργανα-στόχους. Συνήθως ο ιός απεκκρίνεται στα κόπρανα για αρκετές εβδομάδες ενώ ανιχνεύεται στο φάρυγγα 1 έως 2 εβδομάδες μετά την μόλυνση(35).

Οι περισσότεροι εντεροϊοί έχουν απομονωθεί από τα κόπρανα, τον φάρυγγα, το κεντρικό νευρικό σύστημα και από βλάβες του δέρματος ή των βλεννογόνων. Ωστόσο αξίζει να σημειωθεί ότι



Εικόνα 2. 1: Σχηματική αναπαράσταση ενός παθογόνου κύκλου των πολιοϊών στον ανθρώπινο οργανισμό.(35)

κάθε είδος εντεροϊού έχει ως στόχους συγκεκριμένα όργανα.

Δύο ή περισσότεροι εντεροϊοί μπορούν να διαδίδονται ταυτόχρονα στον πεπτικό σωλήνα ενός συγκεκριμένου οργανισμού, αλλά σε πολλές περιπτώσεις ο πολλαπλασιασμός ενός ιού μπορεί να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό ενός άλλου ιού. Το μοντέλο μηχανισμού της παθογένειας των εντεροϊών έχει μελετηθεί πιο διεξοδικά στους πολιοϊούς, που προκαλούν την παραλυτική πολιομυελίτιδα, η οποία είναι η πιο σοβαρή ασθένεια που μπορεί να προκληθεί μετά από μόλυνση από εντεροϊό .

Οι πολιοϊοί πολλαπλασιάζονται πρώτα στις αμυγδαλές, στους λεμφαδένες του λαιμού και στο λεπτό έντερο. Οι ιοί αυτοί φαίνονται να μολύνουν συγκεκριμένους τύπους νευρικών κυττάρων και κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους εντός των κυττάρων , τα κύτταρα αυτά μπορεί να υποστούν διάφορες βλάβες ή ακόμα και να καταστραφούν εντελώς.

Τέλος στην περίπτωση των μη πολιοϊών η διαδικασία της παθογένεσης είναι παρόμοια με εκείνη των πολιοϊών, κατά τα αρχικά στάδια της μόλυνσης του ασθενούς, αλλά ωστόσο διαφέρουν τα όργανα-στόχοι μεταξύ των διαφορετικών ειδών των εντεροϊών. Για παράδειγμα ορισμένοι από αυτούς του ιούς μπορούν να μολύνουν το κεντρικό νευρικό σύστημα και να οδηγήσουν στην εκδήλωση μηνιγγίτιδας ή παράλυσης (πχ ιός echo, εντεροϊός 71) ενώ άλλοι ιοί μπορούν να μολύνουν τον καρδιακό μύ (coxsackie B) ή το πάγκρεας.

3. Επιδημιολογία

Η υπεροικογένεια των πικορναϊών περιλαμβάνει πολλά παθογόνα ιικά στελέχη τα οποία μπορούν να μολύνουν τόσο τον άνθρωπο όσο και τα ζώα. Σε γενικές γραμμές οι ιοί αυτοί μπορούν να μεταδοθούν είτε μέσω της κόπρανο-στοματικής οδού είτε μέσω των σταγονιδίων κατά την αναπνοή .

Ωστόσο οι εντεροϊοί φαίνεται να μεταδίδονται κυρίως μέσω της κόπρανο-στοματικής οδού. Οι ιοί αυτοί μεταδίδονται πιο εύκολα σε εύκρατα κλίματα τα οποία απαντώνται πιο συχνά κατά τα τέλη του καλοκαιριού και στις αρχές του φθινοπώρου. Τα παιδιά είναι ο κύριος στόχος των εντεροϊών και χρησιμεύουν στην εξάπλωσή τους μέσω της κοπρανό-στοματικής οδού. Οι εντεροϊοί μεταδίδονται εύκολα από άτομο σε άτομο μέσα σε μια οικογένεια και σε κλειστές κοινωνίες όπου το ποσοστό της μόλυνσης μπορεί να φθάσει έως και το 80%. Σε χώρες που αντιμετωπίζουν οικονομικά προβλήματα και επικρατούν κακές συνθήκες υγιεινής το ποσοστό της μόλυνσης μεταξύ των βρεφών και των παιδιών μπορεί να υπερβαίνει το 50% ενώ μπορούν να απομονωθούν 2 ή περισσότεροι ορότυποι εντεροϊών από ένα και μόνο δείγμα κοπράνων.

Έχει αποδειχθεί ότι τα βρέφη και τα παιδιά που ζουν σε αυτές τις συνθήκες έχουν έρθει σε επαφή με κάποιο από τα είδη εντεροϊών που επικρατούν σε αυτά τα περιβάλλοντα πολύ νωρίτερα από ότι τα παιδιά που κατοικούν σε λίγο πιο 'ευνοημένες' χώρες. Επιπρόσθετα έχει παρατηρηθεί ότι ακόμα και σε χώρες με εύκρατο κλίμα όπως είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες , οι λοιμώξεις από εντεροϊούς είναι περισσότερες σε θερμότερες περιοχές με φτωχές κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες . Αξίζει να σημειωθεί ότι όσο βελτιώνονται οι συνθήκες υγιεινής σε μια κοινωνία , τόσο περιορίζεται η μετάδοση των εντεροϊών και τόσο αυξάνεται ο αριθμός των ατόμων που έρχονται σε επαφή με τον συγκεκριμένο ιό σε μεγαλύτερη ηλικία ή ακόμα και στην ενήλικη ζωή τους(40). Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι σε νησιά ή σε απομονωμένους πληθυσμούς που δεν έχουν μεγάλη επαφή με τον υπόλοιπο κόσμο , ένα μεγάλο μέρος ή ακόμα και το σύνολο του πληθυσμού δεν έχει αποκτήσει αντισώματα έναντι των εντεροϊών δηλαδή δεν έχουν ανοσοποιηθεί.

Ωστόσο η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής που πραγματοποιήθηκε σε πολλές χώρες του κόσμου οδήγησε σε αλλαγή στην ηλικία εμφάνισης της πολιομυελίτιδας . Πιο συγκεκριμένα η πολιομυελίτιδα εμφανίζεται πλέον στα παιδιά σχολικής ηλικίας και στους ενήλικες και όχι στα βρέφη και στα παιδιά προσχολικής ηλικίας όπως παλαιότερα . Τα περισσότερα παιδιά μέχρι την ηλικία των 2 ετών ,ανεξάρτητα από το κλίμα , τη γεωγραφία ή τις κοινωνικό-οικονομικές συνθήκες έχουν υποστεί πολλές ασυμπτωματικές ή ήπια συμπτωματικές λοιμώξεις από εντεροϊούς . Ένας παράγοντας που φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση των κρουσμάτων λοίμωξης από διάφορους ορότυπους εντεροϊών είναι η συσσώρευση ενός μεγάλου πληθυσμού παιδιών που γεννήθηκαν κατά την διάρκεια έξαρσης από έναν συγκεκριμένο ορότυπο (40) .

Τέλος το επιδημιολογικό πρότυπο της πολιομυελίτιδας έχει πλέον μεταβληθεί σε πολλά μέρη του κόσμου μέσω της χορήγησης των εμβολίων κατά του ιού της πολιομυελίτιδας.

4. Κλινικά χαρακτηριστικά

Οι πικορναϊοί είναι υπεύθυνοι για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα. Οι εντεροϊοί οι οποίοι διαθέτουν 66 ορότυπους που προσβάλλουν τον άνθρωπο , μολύνουν την πεπτική οδό και εμφανίζουν κάποια ειδικά χαρακτηριστικά όπως είναι η ανθεκτικότητα στο όξινο pH και στην πρωτεόλυση τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση του ιού σε αυτό το περιβάλλον. Οι κλινικές εκδηλώσεις της λοίμωξης από κάποιον εντεροϊό μπορεί να είναι ήπιες ή όχι εμφανείς. Ωστόσο εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα παθογόνων χαρακτηριστικών που σχετίζονται με την ικανότητα που έχουν οι εντεροϊοί να αντιγράφονται και να πολλαπλασιάζονται σε διάφορα σημεία του σώματος. Οι ιστοί οι οποίοι μπορούν να μολυνθούν από τους διάφορους ορότυπους των εντεροϊών (πέρα από το έντερο) μπορούν να προσδιοριστούν από την εξειδίκευση του υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή (41).

Οι πολιοϊοί οι οποίοι διαθέτουν μόνο τρεις ορότυπους είναι οι πιο σημαντικοί ιοί της οικογένειας των εντεροϊών. Αν και η λοίμωξη από πολιοϊούς μπορεί να

οδηγήσει σε χρόνια παράλυση το μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων από αυτούς του ιούς φαίνεται να περιορίζεται στην πεπτική οδό χωρίς να έχει σοβαρές συνέπειες. Η λοίμωξη από έναν πολιοϊό πιστεύεται ότι ξεκινά στον φάρυγγα ή απευθείας στο επιθήλιο του εντέρου. Η μετάδοση του ιού σε άλλα όργανα του σώματος όπως το κεντρικό νευρικό σύστημα επιτυγχάνεται μέσω μιας χαμηλού βαθμού αιμίας, η οποία παρατηρείται μετά το πολλαπλασιασμό και την είσοδο του ιού στην κυκλοφορία του αίματος. Τέλος η καταστροφή των κινητικών νευρώνων οδηγεί στην εμφάνιση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Η μόλυνση από άλλα είδη εντεροϊών πιθανώς ακολουθεί την ίδια πορεία εντός του οργανισμού αλλά ωστόσο διαφέρουν τα χαρακτηριστικά της νόσου που προκαλούν. Οι ασθένειες που προκαλούνται μετά την λοίμωξη από κάποιο είδος εντεροϊού περιλαμβάνουν: το κοινό κρυολόγημα, την επιπεφυκίτιδα, την ηπατίτιδα Α, την νόσο του ποδός-στόματος (FMDV), την πολιομυελίτιδα, την άσηπτη μηνιγγίτιδα, την εγκεφαλίτιδα, την μυοκαρδίτιδα, τη γαστρεντερίτιδα κ.α.

5. Έλεγχος των λοιμώξεων από εντεροϊούς

Η βελτίωση των συνθηκών υγιεινής και η χρήση εμβολίων συνέβαλαν στην καταπολέμηση ορισμένων ασθενειών που προκαλούν οι πικορναϊοί. Ωστόσο η βελτίωση των μέτρων υγιεινής φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική στον έλεγχο των ιών που μεταδίδονται μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού όπως για παράδειγμα οι εντεροϊοί.

Τα εμβόλια που είναι πλέον διαθέσιμα χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση τριών ασθενειών που προκαλούνται από τους πικορναϊούς. Οι ασθένειες αυτές είναι η πολιομυελίτιδα, η ηπατίτιδα και η νόσος του ποδός-στόματος. Τα εμβόλια κατά του ιού της πολιομυελίτιδας είναι ένα από τα πιο σημαντικά επιτεύγματα στον χώρο της επιστήμης. Η αντιγονική σταθερότητα που παρουσιάζει ο ιός της

πολιομυελίτιδας καθώς και η ύπαρξη μόνο τριών οροτύπων ήταν σημαντικοί παράγοντες για την επιτυχία στην αναζήτηση του συγκεκριμένου εμβολίου.

Το εμβόλιο κατά της νόσου του ποδός-στόματος παρασκευάστηκε για πρώτη φορά μέσω της χημικής αδρανοποίησης της λέμφου που προέρχονταν από βλάβες σε μολυσμένα ζώα. Στη συνέχεια, αναπτύχθηκαν συστήματα καλλιέργειας ιστών μέσω των οποίων ήταν εφικτό να παραχθούν εκατομμύρια δόσεις εμβολίου. Η αντιγονική πολυπλοκότητα του ιού έκανε ανέφικτη την ανάπτυξη των εξασθενημένων εμβολίων και τα τρέχουσα εμβόλια εξακολουθούν να παρασκευάζονται από αδρανοποιημένους ιούς.

Τέλος ο έλεγχος των λοιμώξεων από πικορναϊούς με την χρήση θεραπευτικών φαρμάκων σημείωσε μικρή επιτυχία. Έχει εντοπιστεί ένας αριθμός ενώσεων που δρουν ως αναστολείς έναντι των ιών αυτών. Μελέτες έχουν δείξει ότι οι ανασταλτικές αυτές ενώσεις δεσμεύονται στην VP1 των εντεροϊών και των ρινοϊών. Η δέσμευση αυτή είναι πιθανό να επάγει αλλαγές στην δομή Canyon του ιού, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η δέσμευση του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή ή μπορεί επίσης να εμποδίζει την δημιουργία διαμορφωτικών αλλαγών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα πριν την διαδικασία της απέκδυσης του ιού (41). Αν και η χρήση αυτών των ενώσεων ήταν αποτελεσματική έναντι των ρινοϊών *in vitro*, αλλά και *in vivo* σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο παρατηρήθηκε πολύ γρήγορα η δημιουργία μεταλλάξεων, με αποτέλεσμα οι ιοί αυτοί να αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο φάρμακο (41).

6. Στόχος της εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί ,μέσω μια ειδικής stem-loop reverse transcription PCR ,αν η θερμική αδρανοποίηση του ιικού στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης [1] και [10⁵] TCID₅₀ σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες(52,62,72,82 °C) μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του ιικού γενώματος.

7. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 Θερμική αδρανοποίηση του στελέχους Sabin 1

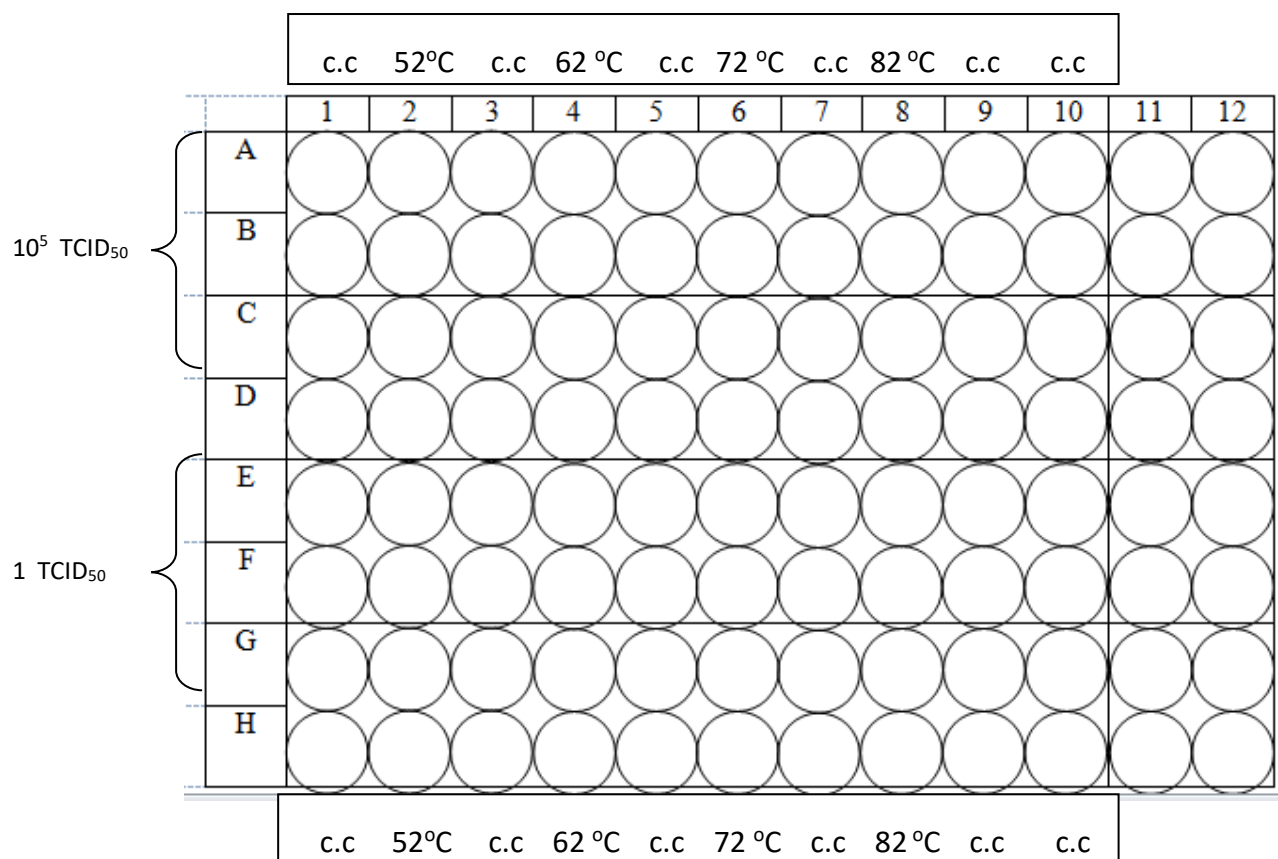
Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1. Σε πρώτο στάδιο πραγματοποιήθηκαν οι διαδοχικές αραιώσεις του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ ,προκειμένου να προκύψουν οι 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού, [1] και $[10^5]$ TCID₅₀ αντίστοιχα . Η συγκέντρωση TCID₅₀ είναι ο τίτλος του ιού που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στο 50% της κυτταροκαλλιέργειας. Στην συνέχεια μετά την μόλυνση των κυττάρων με το στέλεχος Sabin 1, ακολούθησε η αδρανοποίηση με θέρμανση σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες ,οι οποίες ήταν οι :52,62,72 και 82 °C και για τις δύο υπό εξέταση συγκεντρώσεις {[10^5] και [1] TCID₅₀}. Για την επίτευξη της διαδικασίας αυτής χρησιμοποιήθηκε ένα υδατόλουτρο. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε προθέρμανση του θρεπτικού υλικού DMEM 2% χωρίς τον ιό για 10 min στους 52,62,72 και 82 °C .Τέλος μετά την προσθήκη της αντίστοιχης συγκέντρωσης του ιού ,με τελικό τίτλο 10^5 και 1 TCID₅₀ στο προθερμασμένο θρεπτικό υλικό, ακολούθησε θέρμανση και πάλι για 10 min στις ίδιες θερμοκρασίες αδρανοποίησης.

7.2 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΜΕ ΤΟ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ SABIN 1

Για την ανάπτυξη του στελέχους Sabin 1 χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά RD (rhabdomyosarcoma). Για να είναι δυνατή η μόλυνση της κυτταρικής σειράς RD από το δείγμα ιού, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της ποιότητας της.

Για τη μόλυνση τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό DMEM με περιεκτικότητα 1% σε Fetal Bovine Serum (FBS). Στην συνέχεια μεταφέρθηκαν 100μl από την κυτταροκαλλιέργεια RD (D-MEM 2%) σε κάθε πηγαδάκι μιας μικροπλάκας 96 θέσεων. Μετά την αδρανοποίηση του ικού στελέχους Sabin 1

συγκέντρωσης 10^5 και 1 TCID₅₀ αντίστοιχα ,πραγματοποιήθηκε επιμόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας RD με τα αδρανοποιημένα στελέχη.Τέλος πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C ενώ παράλληλα γινόταν καθημερινή παρακολούθηση για την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathic-CPE).



Εικόνα 7.2.1:Μικροπλάκα 96 θέσεων, που χρησιμοποιήθηκε για την μόλυνση των κυττάρων RD με τον αδρανοποιημένο ιό.

7.3 Απομόνωση του ιικού RNA

Μία ώρα μετά τη μόλυνση (p.i), πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις της μικροπλάκας με το υλικό κυτταροκαλλιέργειας D-MEM, προκειμένου να απομακρυνθούν όσα ιοσωμάτια δεν μπόρεσαν να προσδεθούν στους κυτταρικούς υποδοχείς και κατ' επέκταση να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα. Η απομόνωση του ιικού RNA πραγματοποιήθηκε μετά από 6h διότι από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου έχει βρεθεί ότι μετά από αυτό το χρονικό διάστημα θετικοποιείται το σήμα για τον αρνητικό κλώνο.

Πραγματοποιήθηκαν 3 διαφορετικές απομονώσεις από την μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας για κάθε μία από τις διαφορετικές θερμοκρασίες αδρανοποίησης(52,62,72,82 ° C) καθώς και για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού(10^5 , 1 TCID₅₀).

7.4 Εκχύλιση του ιικού RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο RNeasy mini kit της QIAGEN.

Συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής:

- Φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στα 300g.
- Προσθήκη 350μl RLT και vortex των δειγμάτων προκειμένου να ομογενοποιηθούν.
- Προσθήκη 350μl αιθανόλης 70% και vortex για την ομογενοποίηση του μίγματος.
- Μεταφορά του συνολικού όγκου των 700μl σε μία στήλη που είναι τοποθετημένη σε tube των 2 ml .
- Φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000g
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 700 μl RWI και φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000g
- Αφαίρεση υπερκειμένου
- Προσθήκη 500 μl RPE και φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στα 8000g
- Αφαίρεση υπερκειμένου και επανάληψη του προηγούμενου βήματος (500 μl RPE +φυγοκέντρηση για 2 min στα 8000g)
- Μεταφορά της στήλης σε νέο tube των 1.5 ml και φυγοκέντρηση
- Προσθήκη 50μl RNase free water (επαναδιάλυση του ιζήματος) και φυγοκέντρηση
- Αφαίρεση της στήλης από το tube

7.5 Σχεδιασμός εκκινητικών μορίων

Για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (ανίχνευση αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών) χρησιμοποιήθηκε για την RT ο εκκινητής EntNS4-RT. Ο εκκινητής αυτός διαθέτει μια χαρακτηριστική δομή στελέχους- θηλιάς στο 5'-άκρο του και μια ειδική ικκή αλληλουχία στο 3'-άκρο, η οποία του προσδίδει υψηλή εξειδίκευση για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Μετά την διαδικασία της RT ακολούθησε η PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το ειδικό ζεύγος εκκινητικών μορίων EntNS2-f/UC53flap ,όπου ο εκκινητής EntNS2-f είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέεται πάνω σε ένα συγκεκριμένο σημείο του εκκινητή EntNS4 και συγκεκριμένα πάνω στην δομή στελέχους-θηλιάς. Το μέγεθος του προϊόντος για τον κλώνο αρνητικής πολικότητας είναι 160bp.

Για την ανίχνευση του κλώνου θετικής πολικότητας στην RT χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής HEVC-425. Ο εκκινητής αυτός χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του θετικού κλώνου δηλαδή για τον έλεγχο της ύπαρξης του ιού εντός του κυττάρου, και η περιοχή στόχευσής του είναι η 3'-αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών. Ακολούθως στην διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητικών μορίων UG52-flap/UC53-flap το οποίο είναι επίσης ειδικό για την ενίσχυση του κλώνου θετικής πολικότητας ενώ η περιοχή στόχευσής τους είναι η 5'-αμετάφραστη περιοχή. Αξίζει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση του κλώνου θετικής πολικότητας , όπως παρατηρείται ,αρχικά για την διαδικασία της RT επιλέχθηκε ένας εκκινητής που στοχεύει στην 3'-UTR ενώ αντιθέτως στην διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που στοχεύουν στην 5'-UTR. Ο λόγος για τον οποίο επιλέχθηκαν οι εκκινητές αυτοί που στοχεύουν στα 2 άκρα είναι για να ελέγχσουμε την ακεραιότητα του θετικού κλώνου του στελέχους SABIN 1 από την 5'-UTR μέχρι και την 3'-UTR για τυχόν βλάβες λόγω της θερμοκρασίας αδρανοποίησης .Επομένως εάν ο θετικός κλώνος έχει υποστεί κάποια βλάβη μεταξύ αυτών των 2 αμετάφραστων περιοχών δεν θα μπορέσει να ενισχυθεί κατά την διαδικασία της PCR. Επιπλέον για να ελεγχθεί με βεβαιότητα η ακεραιότητα του θετικού κλώνου το στέλεχος Sabin 1αδρανοποιήθηκε απευθείας στις θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω, χωρίς εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd και ακολούθησαν οι RT και οι PCR χρησιμοποιώντας τους

εκκινητές που αναφέρθηκαν προηγουμένως (HEVC-425 & UG52-flap/UC53-flap αντίστοιχα). Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος για τον θετικό κλώνο είναι στις 446 bp.

| Εκκινητής | Αλληλουχία | Θέση | Πολικότητα |
|------------------|------------------------------------------|-----------|------------|
| HEVC-425 | 5'-CTCCGAATTAARRAAAAATTAC-3' | 7440-7418 | Antisense |
| UG52-flap | 5'-aataaatcataaCAAGCACTTCTGTTTCCCCGG -3' | 168-188 | Sense |
| UC53-flap | 5'- aataaatcataaTTGTCACCATAACCAGCCA -3' | 588-606 | Antisense |
| EntNS4-RT | 5'-ACAGGGTCCCCGCCGTCCCTGAATGCGGC-3' | - | Antisense |
| EntNS2-f | 5'-CGTCCCCGCCGTCCCTG-3' | - | Sense |
| ENV-1 | 5'- GATTGTCACCATAAGCAGC -3' | 580-598 | Antisense |
| ENV-2 | 5'- CCCCTGAATGCGGCTAATC -3' | 451-469 | Sense |

Πίνακας 7.5.1: Οι αλληλουχίες, η θέση πρόσδεσης και η πολικότητα των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσας μελέτης.

Επιπρόσθετα για την διαδικασία της Nested PCR χρησιμοποιήθηκε το ειδικό εκκινητικό ζεύγος ENV-1/ENV-2 για την ανίχνευση τόσο του θετικού όσο και του αρνητικού κλώνου, καθώς δεν ήταν δυνατή η ανίχνευσή τους με την μέθοδο της απλής PCR ειδικά όταν ο ιός βρίσκεται σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση όπως είναι το [1] TCID₅₀.

7.6 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Το γένωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας επομένως θα πρέπει να προηγηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (RT) κατά την οποία το ιικό RNA μετατρέπεται σε cDNA και ακολούθως να

πραγματοποιηθεί η διαδικασία της PCR προκειμένου να ενισχυθεί είτε ο θετικός είτε ο αρνητικός κλώνος RNA.

Στην RT για τον θετικό κλώνο RNA χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής HEVC-425 , ενώ για τον αρνητικό κλώνο χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός stem-loop εκκινητής EntNS4-RT.Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 20μl. Αρχικά προετοιμάστηκε το 1^ο μίγμα, το οποίο για κάθε αντίδραση περιείχε 1 μl εκκινητή (αρχική συγκέντρωση →50 pmol), 1 μl dNTPs(2mM) και 5 μl ddH₂O. Στην συνέχεια προστέθηκαν σε erpendorf 7 μl από το παραπάνω μίγμα και 5 μl δείγματος RNA, τα οποία προέρχονταν από την εκχύλιση. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των erpendorf στους 65 °C για 5 min. Μετά το πέρας της επώασης , τα erpendorf τοποθετήθηκαν στον πάγο. Στην συνέχεια προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα το οποίο περιείχε για κάθε αντίδραση 4μl first strand Buffer (5X) , 2μl DTT (0,01M), 0,5μl RNAse out (20 U), 0,5μl RT Superscript II (100U) και 1μl ddH₂O. Ακολούθησε η προσθήκη 8μl από το δεύτερο μίγμα σε κάθε erpendorf .Μετά την προσθήκη και του δεύτερου μίγματος τα erpendorf φυγοκεντρήθηκαν και τέλος πραγματοποιήθηκε επώαση σε δύο διαφορετικές συνθήκες, στους 42 °C για 50 min και εν συνεχεία στους 70 °C για 15 λεπτά.

7.7 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μετά την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής όπου το ιικό RNA μετατράπηκε σε cDNA ακολούθησε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ή PCR , προκειμένου να ενισχυθεί η περιοχή του ιικού γενώματος που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση του θετικού κλώνου χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52-flap/UC53-flap ενώ για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών EntNS2-f/UC53 –flap. Το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος για τον κλώνο θετικής πολικότητας είναι στις 446 bp ενώ για τον κλώνο αρνητικής πολικότητας το αντίστοιχο μέγεθος προϊόντος είναι στις 160 bp.

Τα τρία στάδια της PCR τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά σε κάθε κύκλο είναι τα εξής:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Υβριδοποίηση των εκκινητών στο DNA-στόχο (annealing)
- Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση(extension).

Ένας πλήρης κύκλος λαμβάνει χώρα μέσω της επώασης των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες διαδοχικά ,το οποίο επιτυγχάνεται μέσω της χρήσης ενός θερμοκυκλοποιητή. Αρχικά το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C για 2 min. Στη συνέχεια οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA-στόχου με ψύξη του δειγμάτων σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 50 έως και 60° C ανάλογα με τα Tm των εκκινητών που χρησιμοποιούνται. Τέλος ακολουθεί επώαση στους 72° C για 2min για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων από μία θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq πολυμεράση), παρουσία των dNTPs.

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μίγμα από το οποίο προστέθηκαν 47μl σε κάθε μικροσωληνάριο των 200μl. Το μίγμα αυτό για την κάθε αντίδραση (47μl) περιείχε 5μl dNTPs (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος KAPA Taq Buffer (τελικής συγκέντρωσης 1x), 1 μl MgCl₂ (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 0.2 μl από τον κάθε εκκινητή (τελικής συγκέντρωσης 10pmol), 0.1 μl από την Taq πολυμεράση (KAPA Taq) (τελικής συγκέντρωσης 0.5 U) και 35,5 μl ddH₂O. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο των 200μl προστέθηκαν 3μl cDNA, που προέρχονταν από την RT που προηγήθηκε. Εκτός από τα δείγματα cDNA στην διαδικασία της PCR χρησιμοποιήθηκε ένας θετικός μάρτυρας της αντίδρασης (μη αδρανοποιημένο στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10⁵ TCID₅₀) και ένας αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O) για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν.

Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν για την PCR ήταν τα παρακάτω :

Πίνακας 7.7.1 : Συνθήκες PCR για ανίχνευση θετικού κλώνου (*UG52-flap/UC53-flap*).

| Στάδιο της PCR | Θερμοκρασία | Χρόνος επώασης | |
|----------------------------------------------|-------------|----------------|-------------|
| Αρχική Αποδιάταξη του cDNA | 95 °C | 2 min | |
| Αποδιάταξη του cDNA | 95 °C | 30 sec | } 40 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση των εκκινητών | 63 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση | 72 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων | 72 °C | 2 min | |

Πίνακας 7.7.2: Συνθήκες PCR για ανίχνευση του αρνητικού κλώνου (*EntNS2-f/UC53-flap*).

| Στάδιο της PCR | Θερμοκρασία | Χρόνος επώασης | |
|----------------------------------------------|-------------|----------------|-------------|
| Αρχική Αποδιάταξη του cDNA | 95 °C | 2 min | |
| Αποδιάταξη του cDNA | 95 °C | 30 sec | } 40 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση των εκκινητών | 55 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση | 72 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων | 72 °C | 2 min | |

7.8 Nested-PCR

Σε ορισμένες περιπτώσεις ,στις οποίες δεν ήταν δυνατή η ανίχνευση του κλώνου θετικής ή αρνητικής πολικότητας λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του ιού (1 TCID₅₀) πραγματοποιήθηκε Nested PCR προκειμένου να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου . Έτσι πραγματοποιήθηκε αρχικά μια απλή PCR χρησιμοποιώντας ένα 1^ο ζεύγος εκκινητικών μορίων και στην συνέχεια ακολούθησε μια Nested PCR χρησιμοποιώντας ένα 2^ο ζεύγος εκκινητικών μορίων ,τα οποία υβριδοποιούνται πάνω στα προϊόντα της 1^{ης} PCR και οδηγούν στην παραγωγή ενός δεύτερου προϊόντος το οποίο είναι μικρότερο σε μέγεθος σε σχέση με το πρώτο. Η διαδικασία αυτή προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα, αλλά ωστόσο βασικό μειονέκτημά της είναι ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης επιμολύνσεων λόγω ότι μεσολαβούν πολλοί κύκλοι. Στην παρούσα εργασία για την διαδικασία της Nested PCR χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητικών μορίων ENV-1/ENV-2,των οποίων η αλληλουχία, η θέση και η πολικότητα απεικονίζονται στον πίνακα 7.5.1.Το αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος είναι στις 158 bp.

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 50 μl. Αρχικά προετοιμάστηκε ένα μίγμα από το οποίο προστέθηκαν 47μl σε κάθε μικροσωληνάριο των 200 μl. Το μίγμα αυτό για την κάθε αντίδραση (47μl) περιείχε: 5μl διαλύματος dNTPs (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος KAPA Taq Buffer (τελικής συγκέντρωσης 1X),1 μl MgCl₂ (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 0.2 μl από τον κάθε εκκινητή (τελικής συγκέντρωσης 10pmol), 0.1 μl από την Taq πολυμεράση (0.5 Unit) και 35,5 μl ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl από το προϊόν της πρώτης PCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την Nested PCR ήταν το παρακάτω:

| Στάδιο της PCR | Θερμοκρασία | Χρόνος επώασης | |
|-----------------------------------------------------|-------------|----------------|-------------|
| Αρχική Αποδιάταξη του DNA | 95 °C | 2 min | |
| Αποδιάταξη του DNA | 95 °C | 30 sec | } 30 κύκλοι |
| Υβριδοποίηση των εκκινητών | 55 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση | 72 °C | 30 sec | |
| Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων | 72 °C | 2 min | |

Πίνακας 7.8.2. : Συνθήκες Nested PCR για την ανίχνευση του θετικού ή αρνητικού κλώνου (ENV-1/ENV-2).

7.9 Ηλεκτροφόρηση

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 2%, ενώ για τα προϊόντα της Nested-PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή με συγκέντρωση 3%. Συγκεκριμένα σε κωνική φιάλη των 250 ml αναμίχθηκαν 40ml TBE με 0,8 gr αγαρόζης στην περίπτωση που το gel είχε συγκέντρωση 2% και 1,2 gr στην περίπτωση που το gel είχε συγκέντρωση 3% . Στην συνέχεια ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, έτσι ώστε να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Έπειτα αφού το διάλυμα κρυώσει προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου έτσι ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη προκειμένου να πήξει. Όταν πλέον σχηματιστεί η πηκτή αγαρόζης, αναμιγνύονται 10 μl από κάθε

προϊόν της PCR ή της Nested PCR με 2 μl χρωστικής και στην συνέχεια ακολουθεί η τοποθέτηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής.

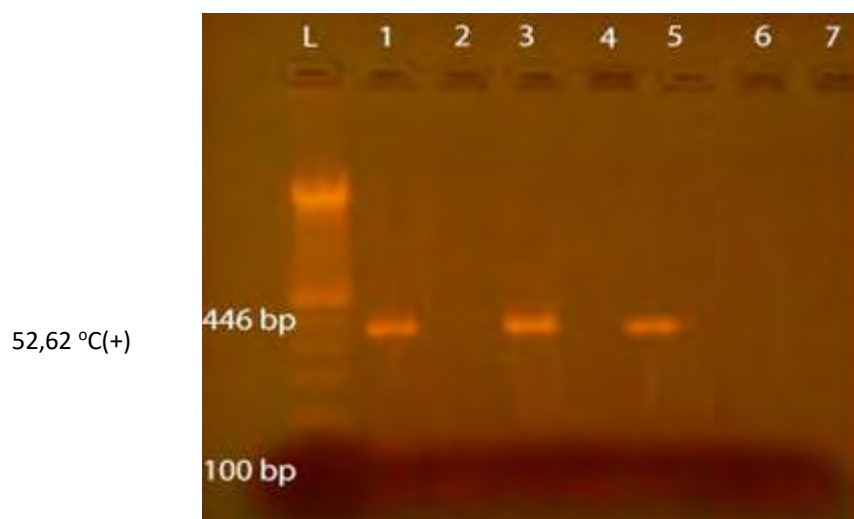
Τέλος για τον προσδιορισμό του μεγέθους των προϊόντων που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκε ένας μάρτυρας μοριακού βάρους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ο 50 bp και ο 100 bp DNA ladder (ανάλογα με το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 120 Volts για 30 min. Τέλος το gel αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να ελεγχθεί αν η θερμοκρασία αδρανοποίησης μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του γενώματος των εντεροϊών. Αρχικά για να ανιχνεύσουμε τον κλώνο θετικής πολικότητας, δηλαδή για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη του ιικού γενώματος στα κύτταρα πραγματοποιήθηκε RT με τον HEVC-425 και PCR με το εκκινητικό ζεύγος UG52-flap/UC53-flap. Για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου πραγματοποιήθηκε RT με τον EntNS4-RT ο οποίος είναι ένας ειδικός stem-loop εκκινητής για τον αρνητικό κλώνο και PCR με το ζεύγος εκκινητικών μορίων EntNS2-f/UC53-flap.

Στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται τα αποτελέσματα της PCR και της Nested PCR τόσο για τον θετικό όσο και για τον αρνητικό κλώνο, για τις συγκεντρώσεις $[10^5]$ και $[1]$ TCID₅₀ του στελέχους Sabin 1 μετά την αδρανοποίησή του στις αντίστοιχες θερμοκρασίες του πειράματος (52,62,72,82 ° C) και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd:

| | RT | PCR |
|-----------|-----------|--------------------|
| Εκκινητές | HEV-C 425 | UG52flap/UC53 flap |



1 Sabin 1 $[10^5]$ (μη αδρανοποιημένο)

2 Sabin 1 $[1]$ (μη αδρανοποιημένο)

3 Sabin 1 $[10^5]$ 52° C

4 Sabin 1 $[1]$ 52° C

5 Sabin 1 $[10^5]$ 62° C

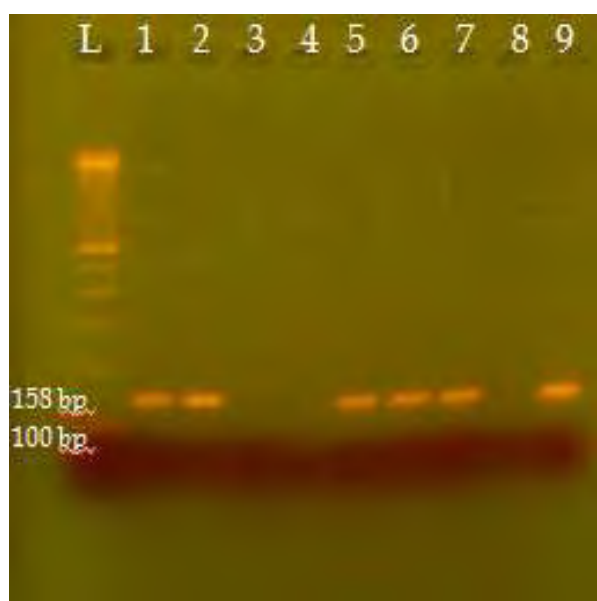
6 Sabin 1 $[1]$ 62° C

7 ddH₂O

Εικόνα 8.1: Ανίχνευση θετικού κλώνου μέσω απλής PCR, μετά από αδρανοποίηση του ιού (1 & 10^5 TCID₅₀) στους 52 & 62 ° C και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Στην περίπτωση που ο ιός (1 TCID₅₀) αδρανοποιήθηκε στους 52 και 62 °C, ο κλώνος αρνητικής πολικότητας δεν ανιχνεύθηκε με απλή PCR και για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκε Nested PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές ENV1 και ENV2 τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

| | RT | PCR | Nested PCR |
|-----------|-----------|--------------------|-------------|
| Εκκινητές | EntNS4-RT | EntNS2-f/UC53 flap | ENV-1/ENV-2 |



1 Sabin 1 [1] 52° C

2 Sabin 1 [1] 52° C

3 ddH₂O

4 ddH₂O

5 Sabin 1 [1] 62° C

6 Sabin 1 [1] 62° C

7 Sabin 1 [1] 62° C

8 ddH₂O

9 Sabin 1 10⁵ (Θετικός Μάρτυρας)

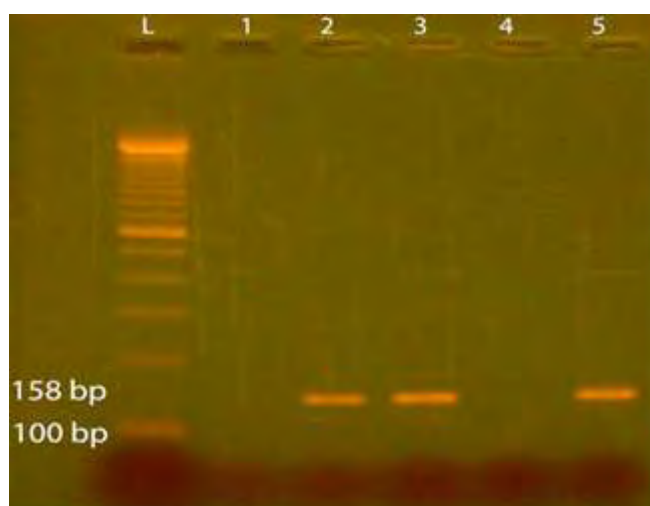
Εικόνα 8.2: Ανίχνευση αρνητικού κλώνου μέσω Nested-PCR μετά από αδρανοποίηση του στελέχους Sabin 1 (1 TCID₅₀) στους 52 & 62 °C και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Επιπρόσθετα μετά από αδρανοποίηση του ιού (1 TCID₅₀) στις θερμοκρασίες των 72 και 82°C, ο κλώνος θετικής πολικότητας δεν ανιχνεύθηκε μέσω απλής PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές UG52flap/UC53 flap. Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκε στην συνέχεια Nested PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Στην περίπτωση αυτή ο θετικός κλώνος ανιχνεύθηκε και στις 2 θερμοκρασίες αδρανοποίησης.

Στην παρακάτω περίπτωση ο ιός (1 TCID₅₀) αδρανοποιήθηκε στους 82°C, και στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε RT και PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές EntNS4-RT και UG52-flap/UC53-flap αντίστοιχα. Στην απλή PCR δεν εντοπίστηκε θετική ζώνη για τον κλώνο αρνητικής πολικότητας, για αυτό στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε Nested PCR με τους ENV1/ENV2, τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται στην παρακάτω εικόνα:

| | <i>RT</i> | <i>PCR</i> | <i>Nested PCR</i> |
|-----------|-----------|--------------------|-------------------|
| Εκκινητές | EntNS4-RT | EntNS2-f/UC53 flap | ENV-1/ENV-2 |

82° C(-)



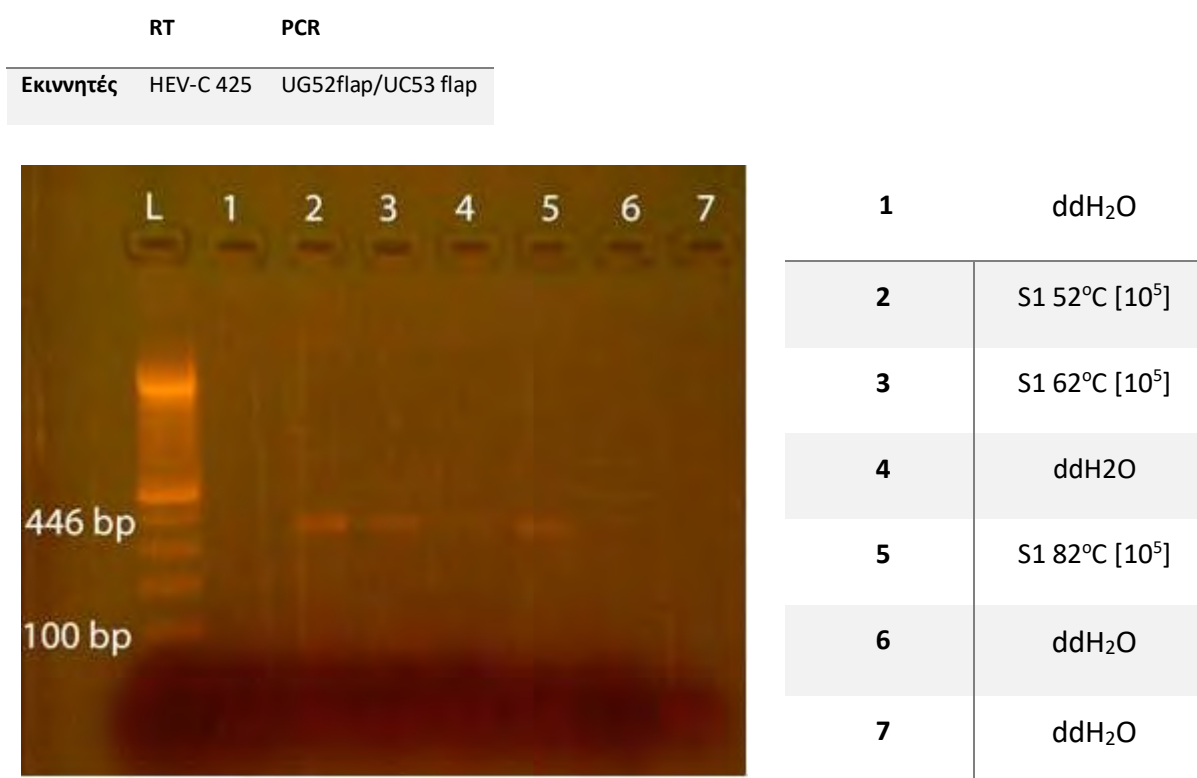
| 1 | ddH ₂ O |
|---|--------------------------------------------|
| 2 | Sabin 1 [1] 82°C A |
| 3 | Sabin 1 [1] 82°C B |
| 4 | ddH ₂ O |
| 5 | Sabin 1 10 ⁵ (θετικός Μάρτυρας) |

Εικόνα 8.3: Ανίχνευση αρνητικού κλώνου μέσω Nested-PCR μετά από αδρανοποίηση του στελέχους Sabin 1 (1 TCID₅₀) στους 82 ° C και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Επιπρόσθετα για να ελεγχθεί η ακεραιότητα του θετικού κλώνου που εντοπίζεται στα παραπάνω πειράματα ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Σε 1^ο στάδιο ο ιός αδρανοποιήθηκε απευθείας και δεν πραγματοποιήθηκε εκ νέου ενοφθαλμισμός του αδρανοποιημένου ιού σε κύτταρα Rd. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε RT με τον HEVC-425 ο οποίος είναι ειδικός για την ανίχνευση του θετικού κλώνου και στοχεύει στην 3'-UTR και έπειτα ακολούθησε PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό ζεύγος UG52flap/UC53 flap που στοχεύουν στην 5'-UTR. Επιλέγοντας αυτούς τους

εκκινητές που στοχεύουν στα 2 άκρα του γενώματος ελέγχεται η ακεραιότητα του θετικού κλώνου RNA από την 5'-UTR έως και την 3'-UTR. Επομένως όπως είναι κατανοητό ένα θετικό αποτέλεσμα στην PCR σημαίνει ότι ο θετικός κλώνος είναι ακέραιος και δεν έχει επηρεαστεί από την συγκεκριμένη θερμοκρασία αδρανοποίησης.

Για αυτό τον λόγο πραγματοποιήθηκε η παραπάνω διαδικασία τα αποτελέσματα της οποίας φαίνονται παρακάτω.



Εικόνα 8.4: Έλεγχος ακεραιότητας του θετικού κλώνου μέσω ανίχνευσής του με απλή PCR, μετά από απευθείας αδρανοποίηση του ιού (10^5 TCID₅₀) στους 52 62 & 82 ° C, χωρίς εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν τόσο από τις PCR όσο και από τις Nested PCR, για τον θετικό και για τον αρνητικό κλώνο και για τις 2 συγκεντρώσεις

του ιού [1] και [10⁵] TCID₅₀, εφόσον ο ιός αδρανοποιήθηκε στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος φαίνονται στους παρακάτω πίνακες:

➤ Sabin 1 [10⁵] TCID₅₀

| Θερμοκρασία αδρανοποίησης | PCR για (+) κλώνο(RT→HEV-425, PCR→UG52- flap/UC53-flap) | Nested PCR για (+) κλώνο (ENV1/ENV2) | PCR για (-) κλώνο (RT→EntNS4-RT, PCR→EntNS2-f/UC53- flap) | Nested PCR για (-) κλώνο (ENV1/ENV2) |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 52° C | + | + | + | + |
| 62° C | + | + | + | + |
| 72° C | - | + | - | + |
| 82° C | - | + | - | + |

Πίνακας 8.1: Αποτελέσματα PCR & Nested PCR για τον θετικό και τον αρνητικό κλώνο αντίστοιχα, μετά από αδρανοποίηση του ιού (Sabin 1 [10⁵] TCID₅₀) στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

➤ Sabin 1 [1] TCID₅₀

| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ | PCR ΓΙΑ (+) ΚΛΩΝΟ(RT→HEV- 425, PCR→UG52- FLAP/UC53-FLAP) | NESTED PCR ΓΙΑ (+) ΚΛΩΝΟ (ENV1/ENV2) | PCR ΓΙΑ (-) ΚΛΩΝΟ (RT→ENTNS4-RT, PCR→ENTNS2-F/UC53- FLAP) | NETED PCR ΓΙΑ (-) ΚΛΩΝΟ (ENV1/ENV2) |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 52° C | - | + | - | + |
| 62° C | - | + | - | + |

| | | | | |
|--------|---|---|---|---|
| 72 ° C | - | + | - | + |
| 82 ° C | - | + | - | + |

Πίνακας 8.2: Αποτελέσματα PCR & Nested PCR για τον θετικό και τον αρνητικό κλώνο αντίστοιχα, μετά από αδρανοποίηση του ιού (Sabin 1 [1] TCID₅₀) στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Στην περίπτωση που ο ιός (Sabin 1 [10⁵]TCID₅₀) αδρανοποιήθηκε απευθείας στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος ,χωρίς εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd ,τα αποτελέσματα της PCR που προέκυψαν για τον θετικό κλώνο είναι τα εξής:

- Sabin 1 [10⁵] TCID₅₀

| ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗΣ | PCR ΓΙΑ (+) ΚΛΩΝΟ(RT→HEV-425, PCR→UG52- FLAP/UC53-FLAP) |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 52 ° C | + |
| 62 ° C | + |
| 82 ° C | + |

Πίνακας 8.3 : Αποτελέσματα PCR για τον θετικό κλώνο, μετά από απευθείας αδρανοποίηση του ιού (Sabin 1 [10⁵] TCID₅₀) στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος χωρίς εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd.

Συμπερασματικά όπως παρατηρείται και στον πίνακα 8.1, για την συγκέντρωση [10⁵] TCID₅₀ και έπειτα από εκ νέου ενοφθαλμισμό του ιού σε κύτταρα Rd, η ανίχνευση τόσο του θετικού όσο και του αρνητικού κλώνου μέσω απλής PCR, σταματά στους 62

° C. Ωστόσο μέσω της Nested PCR ανιχνεύθηκε και ο θετικός και ο αρνητικός κλώνος στους 72 και 82 °C για την συγκέντρωση 10^5 TCID₅₀. Όσον αφορά την συγκέντρωση [1] TCID₅₀ (πίνακας 8.2) η ανίχνευση του θετικού και του αρνητικού κλώνου δεν ήταν εφικτή μέσω απλής PCR σε καμία από τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης. Ωστόσο μέσω της Nested τόσο ο θετικός κλώνος όσο και ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκαν σε όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης για την συγκέντρωση [1] TCID₅₀.

Όπως παρατηρείται στον πίνακα 8.3, στην περίπτωση που ο ιός (Sabin 1 [10^5] TCID₅₀) αδρανοποιήθηκε απευθείας στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος χωρίς να έχει προηγηθεί εκ νέου ενοφθαλμισμός του ιού σε κύτταρα Rd, ανιχνεύθηκε ο κλώνος θετικής πολικότητας στις θερμοκρασίες των 52, 62 και 82 °C. Επομένως η ανίχνευση του θετικού κλώνου στην περίπτωση αυτή αποδεικνύει ότι το ιικό γένωμα είναι ακέραιο και δεν φαίνεται να έχει επηρεαστεί από καμία από τις παραπάνω θερμοκρασίες αδρανοποίησης. Στην περίπτωση που είχε προηγηθεί εκ νέου ενοφθαλμισμός του ιού σε κύτταρα Rd, μετά την αδρανοποίησή του δεν θα μπορούσαμε να είμαστε 100% σίγουροι για την ακεραιότητα του γενώματος. Διότι σε αυτή την περίπτωση μπορεί να εντοπίζεται το ιικό γένωμα του ιού στα κύτταρα (ανίχνευση θετικού κλώνου) αλλά δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι όντως είναι ακέραιο. Επομένως η παραπάνω διαδικασία επιβεβαιώνει ότι το ιικό γένωμα δεν επηρεάζεται από την θερμοκρασία αδρανοποίησης.

9. Συζήτηση

Οι εντεροϊοί ευθύνονται για ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που εμφανίζονται στον άνθρωπο και έχουν εντοπιστεί τόσο στο περιβάλλον όσο και σε διάφορα τρόφιμα. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων για την γρήγορη και αποτελεσματική ανίχνευσή τους στα δείγματα αυτά αλλά και την αποτελεσματική έρευνα της μολυσματικότητας αυτών των στελεχών.

Ωστόσο έχει αποδειχθεί ότι τόσο το ιικό καψίδιο όσο και το ιικό RNA πρέπει να είναι λειτουργικά προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μόλυνση του κυττάρου-

ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα το καψίδιο του ιού φαίνεται να αποτελεί το “κλειδί” στην μόλυνση του κυττάρου-ξενιστή, καθώς προστατεύει το ιικό RNA από την δράση RNAασών αλλά επίσης είναι πολύ σημαντικό για την πρόσδεση του ισωματίου στον κυτταρικό υποδοχέα(42). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι το γονιδίωμα των περισσότερων RNA ιών συμπεριλαμβανομένου και των εντεροϊών είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό και φαίνεται να μην επηρεάζεται από εξωτερικές συνθήκες όπως είναι η θερμική αδρανοποίηση, καθώς προστατεύεται από το ιικό καψίδιο. Ωστόσο προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η θερμική αδρανοποίηση του ιού σε υψηλές θερμοκρασίες πιθανόν προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση του καψιδίου. Επομένως όπως είναι κατανοητό επακόλουθο αποτέλεσμα των δομικών αυτών αλλαγών είναι να μην μπορεί να προσδεθεί ο ιός στον κυτταρικό υποδοχέα και κατ' επέκταση να εισέλθει εντός του κυττάρου (42).

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί αν η θερμική αδρανοποίηση του στελέχους Sabin 1 μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα του ιικού γενώματος. Έτσι στο πλαίσιο αυτής της μελέτης χρησιμοποιήθηκε μια strand specific RT-PCR η οποία αποτελεί μία ειδική, ευαίσθητη και μη χρονοβόρα μέθοδο για την ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου. Σημαντικός σε αυτή την μέθοδο είναι ένας stem-loop εκκινητής(RT-primer), ο οποίος όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως διαθέτει μια δομή στελέχους-θηλιάς στο 5'-άκρο και μια ειδική ιική αλληλουχία στο 3'-άκρο. Ο ένας εκ των 2 εκκινητών που χρησιμοποιούνται μετέπειτα στην PCR είναι σχεδιασμένος με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να δεσμεύεται πάνω στην δομή στελέχους θηλιάς αυτού του ειδικού RT-primer, προσδίδοντας με αυτόν τρόπο υψηλή εξειδίκευση και ευαισθησία στη μέθοδο αυτή.

Πιο συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη, η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ελέγξουμε σε ποιες θερμοκρασίες και σε ποιες συγκεντρώσεις του ιού είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ο θετικός και ο αρνητικός κλώνος αντίστοιχα, μέσα στα κύτταρα και συνεπώς για να ελέγξουμε αν η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει είτε την δομή του καψιδίου, επιδρώντας με αυτό τον τρόπο την διαδικασία πρόσδεσης στον κυτταρικό υποδοχέα η αν μπορεί να επηρεάσει την ακεραιότητα γενώματος.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το γεγονός ότι ανιχνεύεται ο κλώνος θετικής πολικότητας, μετά την απευθείας αδρανοποίηση του ιού (Sabin 1 [10⁵] TCID₅₀) στις παραπάνω θερμοκρασίες του πειράματος χωρίς ο ιός να έχει μολύνει κύτταρα RD, επιβεβαιώνει την ακεραιότητα του ιικού γενώματος. Πιο συγκεκριμένα το αποτέλεσμα αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το ιικό γένωμα είναι ανθεκτικό και φαίνεται να μην επηρεάζεται από την θερμοκρασία αδρανοποίησης. Η υπόθεση αυτή έρχεται σε συμφωνία με προγενέστερες μελέτες που υποστηρίζουν ότι η δομή του ιικού γενώματος δεν επηρεάζεται από την θερμική αδρανοποίηση σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 50 °C (45).

Στην υψηλότερη συγκέντρωση του ιού (10⁵ TCID₅₀), η ανίχνευση τόσο του θετικού όσο και του αρνητικού κλώνου μέσω απλής PCR σταματά μετά από αδρανοποίηση στους 62 °C. Ωστόσο για την ίδια συγκέντρωση μέσω Nested, ο θετικός κλώνος ανιχνεύεται μέχρι και τους 82 °C, ενώ ο κλώνος αρνητικής πολικότητας ανιχνεύεται ακόμα και μετά από αδρανοποίηση στους 72 °C. Στην χαμηλότερη συγκέντρωση του ιού (1 TCID₅₀) η ανίχνευση του κλώνου θετικής αλλά και αρνητικής πολικότητας δεν ήταν εφικτή μέσω απλής PCR. Ωστόσο μέσω Nested ο θετικός αλλά και ο αρνητικός κλώνος ανιχνεύθηκαν σε όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης ακόμα και μετά από αδρανοποίηση στους 82 °C.

Συμπερασματικά αξίζει να σημειωθεί ότι η μέθοδος της θερμικής αδρανοποίησης των εντεροϊών όπως και άλλοι μέθοδοι που έχουν την δυνατότητα να καθιστούν τον ιό αντιγραφικά ανενεργό, έχουν εφαρμογές στη παραγωγή εμβολίων, τα οποία συμβάλλουν αναμφίβολα στην προστασία της δημόσιας υγείας από την μετάδοση σοβαρών ασθενειών. Ωστόσο κοινό σημείο και παράλληλα μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι η αδυναμία διάκρισης μεταξύ των ενεργών και των αντιγραφικά ανενεργών ιικών σωματιδίων, που αποτελεί ένα σημαντικό πεδίο για περαιτέρω έρευνα.

Βιβλιογραφία

1. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses : Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz .Elsevier,2012.
2. Apoptotic signaling cascades operating in poliovirus-infected cells.Blondel B, Autret A, Brisac C, Martin-Latil S, Mousson L, Pelletier I, Estaquier J, Colbere-Garapin F. Front Biosci (Landmark Ed). 2009 Jan 1;14:2181-92. Review.
3. Three-Dimensional Structure of Poliovirus at 2.9 Å Resolution. J. M. Hogle, M. Chow, D. J. Filman. Science. 1985 Sep 27;229(4720):1358-65.review.
4. Poliovirus CRE-Dependent VPg Uridylation Is Required for Positive-Strand RNA Synthesis but Not for Negative-Strand RNA Synthesis .Kenneth E. Murray and David J. Barton .J Virol. 2003 Apr; 77(8): 4739–4750.review.
5. Altered interactions between stem-loop IV within the 5' noncoding region of coxsackievirus RNA and poly(rC) binding protein 2: Effects on IRES-mediated translation and viral infectivity.Polen Sean, Joseph H.C. Nguyen, Bert L. Semler.Virology. 2009 Jun 20;389(1-2):45-58 .review.
6. Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses .Ping Zhang, Steffen Mueller, Marc C. Morais, Carol M. Bator, Valorie D. Bowman, Susan Hafenstein, Eckard Wimmer,band Michael G. Rossmann . Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 25;105(47):18284-9.review.
7. General Steps in Viral Replication Cycles. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology Twenty-Sixth Edition, Chapter 29. Jane Butel. The McGraw-Hill, 2013 p:407-28.book.
8. Picornaviridae :The viruses and their replication.Fields' Virology, volume 1.Vincent E. Racaniello. Edited by David Mahan Knipe,Peter M. Howley.Wolters Kluwer Health 2007 p:796-829.book.
9. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily.Cathy L. Mendelsoh, Eckard Wimmer,Vincent R. Racaniello. Cell. 1989 Mar 10;56(5):855-65. review.
10. Cell Recognition and Entry by Rhino- and Enteroviruses .Michael G. Rossmann, Jordi Bella,Prasanna R. Kolatkar,Yongning He,Eckard Wimmer,Richard J. Kuhn and Timothy S. Baker. Virology. 2000 Apr 10;269(2):239-47.review.

11. Poliovirus Cell Entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways James M. Hogle. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:677-702. review.
12. Replication of polio, rhino and Other Picornaviruses .*Virology - Chapter ten ,Part Three . Dr Richard Hunt.* 2015.
13. The structure–function relationship of the enterovirus 3-UTR. Jan Zoll , Hans A. Heus, Frank J.M. van Kuppeveld, Willem J.G. Melchers . *Virus Research* 139 (2009) 209–216. review.
14. The 5'-Untranslated Regions of Picornavirus RNAs Contain Independent Functional Domains Essential for RNA Replication and Translation. Jonathan B. Rohll, Neil Percy, Rebecca Ley, David J. Evans, Jeffrey W. Almond, and Wendy S. Barclay . *JOURNAL OF VIROLOGY*, JULY 1994, p. 4384-439. review
15. A new model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetical data which also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. Skinner, M.A., Racaniello, V.R., Dunn, G., Cooper, J., Minor, P.D. & Almond J.W. *J Mol Biol.* 1989 May 20;207(2):379-92 .review
16. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein .Sung K. Jang and Eckard Wimmer. *Genes Dev.* 1990 Sep;4(9):1560-72. review
17. Enterovirus Control of Translation and RNA Granule Stress Responses. Richard E. *Viruses* 2016 Mar 30;8(4):93. review.
18. A Segment of the 5' Nontranslated Region of Encephalomyocarditis Virus RNA Directs Internal Entry of Ribosomes during In Vitro Translation. Sung K. Jang, Hans-Georg Krausslich, I Martin J. H. Nicklin, Gregory M. Duke, Ann C. Palmenberg, and Eckard Wimmer. *J Virol.* 1988 Aug;62(8):2636-43. review.
19. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses .Lonneke van der Linden , Katja C. Wolthers and Frank J.M. van Kuppeveld . *Viruses* 2015 Aug 10;7(8):4529-62. review.
20. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. EDWARD ARNOLD, MING Luo, Gerrit Vriend, Michael G. Rossmann, Ann C. Palmenberg, Griffith D. Parks, Martin J. H. Nicklin, and Eckard Wimmer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Jan;84(1):21-5. review.
21. Polyprotein processing. *The Picornaviruses 1st Edition* .Edited by Ellie Ehrenfeld, Esteban Domingo Raymond P. Roos. American society for Microbiology (ASM) 2010, p:107-64 .book.

22. Proteolytic Processing of Picornaviral Polyprotein .Ann C. Palmenberg. Annu Rev Microbiol. 1990;44:603-23.review.
23. Polyprotein processing in picornavirus replication .Hans-Georg Kilausslich, Martin J.H. Nicklin, Chong-Kyo LEE and Eckard Wimmer. Biochimie. 1988 Jan;70(1):119-30.review.
24. NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus . Schein CH1, Oezguen N, Volk DE, Garimella R, Paul A, Braun W. Peptides. 2006 Jul;27(7):1676-84.review.
25. Enteroviruses :Chapter 9 ,Viral Infections of Humans Third Edition , Joseph L. Melnick. Edited by Alfred S. Evans. Springer 1989,p:191-248. book.
26. Picornaviruses :Encyclopedia of Life Sciences volume 26.David J Rowlands et al. Wi.le.y March 2007,p:18315-21.book.
27. Model of Picornavirus RNA Replication .Chapter 1,Viral genome replication .Aniko V. Paul, George A. Belov, Ellie Ehrenfeld, and Eckard Wimmer.Editors Craig E. Cameron ,Matthias G"otte ,Kevin D. Raney .Springer Science , 2009 p:3-23.book.
28. Novel, Structure-Based Mechanism for Uridylylation of the Genome-Linked Peptide (VPg) of Picornaviruses.Catherine H. Schein, David E. Volk, Numan Oezguen, and Aniko Paul. Proteins. 2006 Jun 1;63(4):719-26.review.
29. The poliovirus 2C cis-acting replication element mediated uridylylation of VPg is not required for synthesis of negative-sense genomes.Ian G. Goodfellow, Charlotta Polacek, Raul Andino and David J. Evans. J Gen Virol. 2003 Sep;84(Pt 9):2359-63.review
30. Biochemical and genetic studies of the initiation of human rhinovirus 2 RNA replication: identification of a cis-replicating element in the coding sequence of 2Apro Gerber, K., Wimmer, E. & Paul, A. V. J Virol. 2001 Nov; 75(22): 10979–10990.review.
31. Stimulation of poliovirus synthesis in a HeLa cell-free in vitro translation-RNA replication system by viral protein 3CDpro. Franco , Pathak HB, Cameron CE, Rombaut B, Wimmer E, Paul AV. J Virol. 2005 May;79(10):6358-67.review.
32. Picornavirus Morphogenesis. Ping Jiang, Ying Liu, Hsin-Chieh Ma, Aniko V. Paul and Eckard Wimmer.Microbiol Mol Biol Rev. 2014 Sep;78(3):418-37.review.
33. Morphogenesis of poliovirus : Association of the viral RNA with coat protein.Jacobson MF,Baltimore et al . J Mol Biol. 1968 Apr 28;33(2):369-7

34. Foot-and-mouth Disease. Marvin J. Grubman and Barry Baxt. Clin Microbiol Rev. 2004 Apr; 17(2): 465–49 .review.
35. Enteroviruses:Pathogenesis.Viral Infections of Humans ,Epidemiology and Control THIRD Edition,Chapter 9.Joseph L. Melnick. Edited by Alfred S. Evans. Springer 1989,p:223-34.book.
36. Pathology and Pathogenesis of Human Viral Disease. Enteroviruses ,Chapter 1.John E. Craighead . Elsevier,March 2000 p:1-28.book.
37. Picornaviruses: Pathogenesis and Molecular Biology .AL Cathcart, EL Baggs, and BL Semler.Elsevier 2015.book review.
38. Establishing evidence for enterovirus in chronic disease. M. Steven Oberste & Mark A. Pallansch. Ann N Y Acad Sci. 2003 Nov;1005:23-31..review.
39. Enteroviruses:vaccines,epidemiology,diagnosis,classification.Joseph L. Melnick, Charles A. Phillips. CRC Crit Rev Clin Lab Sci. 1970 Jan;1(1):87-118..review.
40. Enteroviruses. Key Features of Epidemiology of Enteroviruses.Viral Infections of Humans ,Epidemiology and Control THIRD Edition. Joseph L. Melnick .Edited by Alfred S. Evans. Springer 1989,p.:204-20.book.
41. Epidemiology of picornavirus. Encyclopedia of Life Sciences volume 26.David J Rowlands. Wi.le.y March 2007,p:18320-21.book.
42. Capsid and Infectivity in Virus Detection. Dean O. Cliver. Food Environ Virol. 2009 Dec;1(3-4):123-128 review.
43. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. Suphachai Nuanualsuwan and Dean O. Cliver. Appl Environ Microbiol. 2003 Jan;69(1):350-7.review.
44. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review .I. Bertrand, J.F. Schijven, G. Sa´ nchez, P. Wyn-Jones, J. Ottoson, T. Morin, M. Muscillo,M. Verani, A. Nasser, A.M. de Roda Husman, M. Myrmel, J. Sellwood, N. Cook and C. Gantzer. J Appl Microbiol. 2012 Jun;112(6):1059-74..review.
45. Long-Term Inactivation Study of Three Enteroviruses in Artificial Surface and Groundwaters, Using PCR and Cell Culture .A. M. de Roda Husman, W. J.

- Lodder, S. A. Rutjes, J. F. Schijven, and P. F. M. Teunis. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Feb;75(4):1050-7.review.
46. Infectivity of RNA from Inactivated Poliovirus. Suphachai Nuanualsuwan and Dean O. Cliver. *Appl. Environ. Microbiol.* March 2003 vol. 69 no. 3 1629-1632.review.
 47. Thermal Inactivation of Oral Polio Vaccine: Contribution of RNA and Protein Inactivation .B. Rombaut,B. Verheyden,K. Andries, and A. Boeye . *J Virol.* 1994 Oct; 68(10): 6454–6457.review.
 48. Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods.Bozkurt, Hayriye D'Souza, Doris H. Davidson, P. Michael. *J Food Prot.* 2015 Aug;78(8):1597-617.review.
 49. Thermal inactivation of poliovirus type 1.Marco Strazynskia, Johannes Krämera, Barbara Becker. *Int J Food Microbiol.* 2002 Mar 25;74(1-2):73-8.review.
 50. Thermal inactivation of oral polio vaccine: contribution of RNA and protein inactivation. Rombaut, B., B. Verheyden, K. Andries, and A. Boeye. *J Virol.* 1994 Oct; 68(10): 6454–6457.review
 51. Effect of heat treatment on hepatitis A virus and norovirus in New Zealand greenshell mussels (*Perna canaliculus*) by quantitative real-time reverse transcription PCR and cell culture. Hewitt, J. and Greening, G.E. *J Food Prot.* 2006 Sep;69(9):2217-23.review.
 52. Inactivation of hepatitis A virus in heat-treated mussels. Croci, L., Ciccozzi, M., De Medici, D., Di Pasquale, S., Fiore, A., Mele, A. and Toti, L. *J Appl Microbiol.* 1999 Dec;87(6):884-8.review.