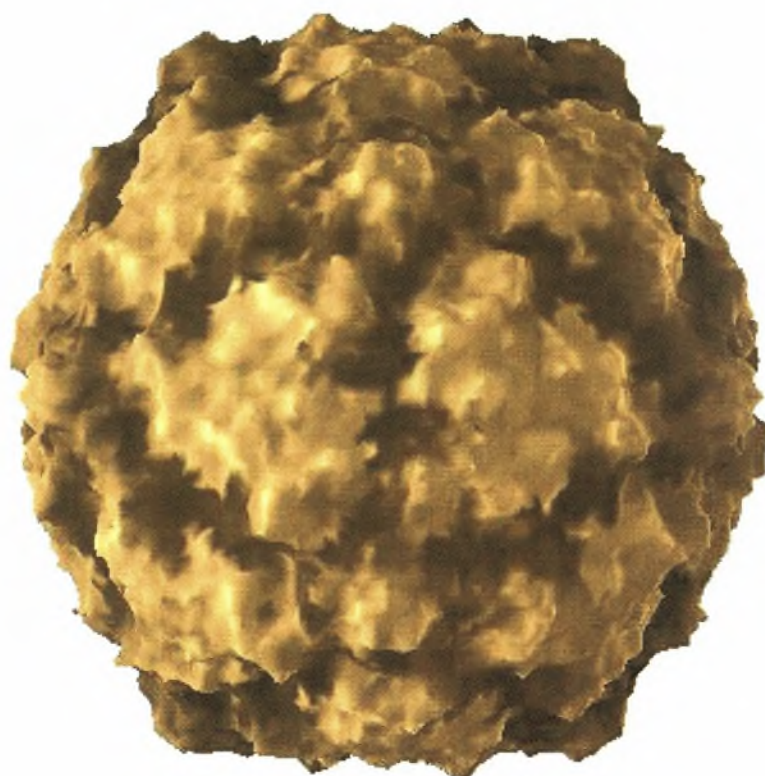




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ
ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΗΝ 5'-ΜΗ ΚΩΔΙΚΗ
ΠΕΡΙΟΧΗ



Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

ΑΝΑΓΝΩΣΤΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Λάρισα 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

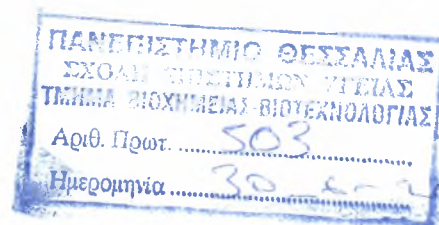
Αριθ. Εισ.: 7362/1
Ημερ. Εισ.: 20-07-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΑΝΑ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087215

Στοιχεία Εργασίας



Επιβλέπων Καθηγητής: Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Τριμελής Επιτροπή:

Μαρκουλάτος Π. : Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, του Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σταθόπουλος Κ. : Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Πατρών.

α.α'.
η.μ

Μόσιαλος Δ. : Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, Τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας:

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας των Picorna ιών. Οι Εντεροϊοί είναι ένα γένος ιών που φέρει θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA [(+)ssRNA] και συνδέονται με διάφορες ασθένειες του ανθρώπου και των θηλαστικών. Το γένος των εντεροϊών περιλαμβάνει τα ακόλουθα είδη: polio-ιούς, ανθρώπινους εντεροϊούς A, HEV-A, ανθρώπινους εντεροϊούς B, HEV-B, ανθρώπινους εντεροϊούς C, HEV-C, ανθρώπινους εντεροϊούς D, HEV-D, και τουλάχιστον τρία ζωικά είδη (εντεροϊούς βοοειδών, πιθηκόμορφων, και χοίρων). Συνολικά διακρίνονται 64 ορότυποι. Όλοι περιέχουν ένα γονιδίωμα RNA περίπου 7.500 βάσεων θετικής πολικότητας. Μετά από τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή, το γονιδίωμα μεταφράζεται σε μια ενιαία πολυπρωτεΐνη, η οποία υποβάλλεται σε επεξεργασία από τις ιικές πρωτεάσες και μετατρέπεται στις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου και τις μη δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στην αντιγραφή του ιού.

Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων προσβάλλοντας το κεντρικό νευρικό σύστημα, το μυοκάρδιο, τους σκελετικούς μύες, το πάγκρεας, το δέρμα και τις βλεννώδεις μεμβράνες και είναι υπεύθυνοι για την παραλυτική πολιομυελίτιδα, κρούσματα της οποίας απαντώνται ακόμη σε αρκετές υποβαθμισμένες περιοχές του πλανήτη μας. Από αυτή τη σκοπιά η διάγνωση και η καταπολέμησή τους είναι ιδιαίτερης σημασίας. Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησής τους περιλαμβάνουν συχνά χρονοβόρα πρωτόκολλα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να καταρτιστεί ένα πρωτόκολλο κατηγοριοποίησης των 64 οροτύπων των εντεροϊών σε 12 κατηγορίες με βάση την 5'-UTR περιοχή έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η προσεγγιστική διάγνωσή τους σε ασθενείς. Η πραγματοποίηση της RT-PCR έδωσε ένα προϊόν ~500 ζεύγη βάσεων το οποίο υποβλήθηκε σε ανάλυση RFLP με το περιοριστικό ένζυμο HhaI. Αντίστοιχη μελέτη έχει ήδη γίνει όσον αφορά τα πρότυπα στελέχη με ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα και στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε η κατηγοριοποίηση άγνωστων κλινικών στελεχών.

Περιεχόμενα

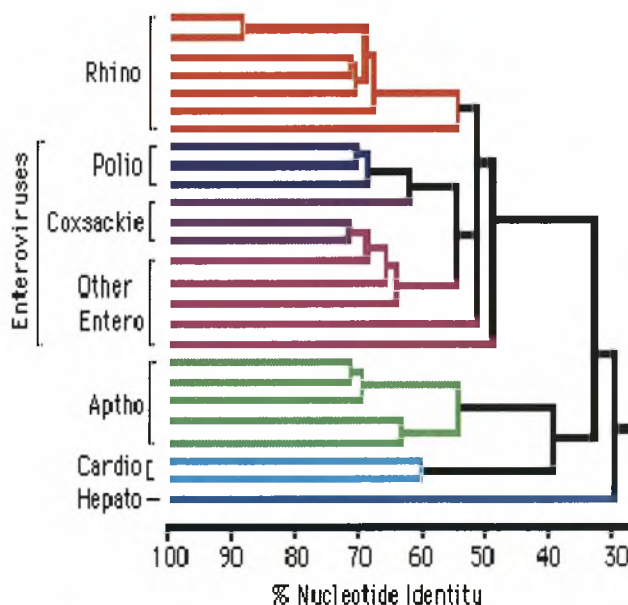
1. Εισαγωγή.....	5
1.1 Ταξινόμηση.....	5
1.2.1 Δομή.....	6
1.2.1.1 Καψίδιο	6
1.2.1.2 Γονιδίωμα.....	8
1.2.1.3 Η 5'-UTR περιοχή	9
1.2.1.4 Η ORF περιοχή.....	11
1.2.1.5 Η 3'-UTR περιοχή	13
1.2.2 Κύκλος Ζωής.....	14
1.2.2.1 Υποδοχείς εντεροϊών.....	16
1.2.2.2 Μετάφραση.....	18
1.2.2.3 Αντιγραφή.....	19
1.3 Επιδημιολογία	20
1.4 Παθογένεια.....	21
1.5 Διάγνωση.....	24
2. Πειραματική διαδικασία.....	26
2.1 Σκοπός της μελέτης	26
2.2 Υλικά και μέθοδοι	26
2.2.1 Πρότυπες Αλληλουχίες	26
2.2.2 Επιλογή Εκκινητικών μορίων.....	29
2.2.3 Επιλογή ενζύμων	29
2.2.4 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την..... πειραματική διαδικασία.....	29
2.2.5 Εκχύλιση ιϊκού RNA από κυτταροκαλιέργειες	31
2.2.6 Αντίστροφη μεταγραφή – Αλυσιδωτή..... αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)	31
2.2.7 RFLP	33
2.3 Αποτελέσματα της μελέτης RFLP	33
3. Συζήτηση	40
4. Βιβλιογραφία	44

1. Εισαγωγή

1.1 Ταξινόμηση

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια των *Picornaviridae* και με βάση τις ασθένειες που προκαλούν στον άνθρωπο είναι το πιο σημαντικό γένος. Στην ίδια οικογένεια ανήκουν και οι ρινοϊοί (rhinoviruses), οι καρδιοϊοί (cardioviruses), οι αφθοϊοί (aphthoviruses), οι ιοί της Ηπατίτιδας Α και οι parecho-ιοί. Συγκρίνοντας τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των εντεροϊών και την βιολογία τους, προκύπτει ένα σύστημα ταξινόμησης, με βάση το οποίο οι εντεροϊοί, που προσβάλλουν τον άνθρωπο, διαχωρίζονται σε πέντε ομάδες: **α)** στους πολιοϊούς που περιλαμβάνουν τους PV1-3, **β)** ανθρώπινους εντεροϊούς Α, HEV-A, (coxsackie ιοί Α και enterovirus 71) **γ)** ανθρώπινους εντεροϊούς Β, HEV-B, (coxsackie ιοί Β, echo-ιοί, coxsackie Α9 ιός, και εντεροϊοί 69 και 73) **δ)** ανθρώπινους εντεροϊούς C, HEV-C, (coxsackie ιοί Α-1, 11, 13, 15, 17-22, 24), **ε)** και

ανθρώπινους εντεροϊούς D, HEV-D, (εντεροϊοί 68 και 70). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν την ταξινόμηση των πολιοϊών μαζί με τους εντεροϊούς της ομάδας HEVC, επειδή παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα



Εικόνα 1. Φυλογενετική Ταξινόμηση των Picornaviridae. Από <http://www.stanford.edu/group/virus/picornava/2000/Picornadendro.gif>

στην δομή του γενώματος και την σύστασή του (Brown et al., 2003).

Γενικά, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τα μέλη της ομάδας των εντεροϊών, ακόμα και τα πιο παθογόνα στελέχη, χαρακτηρίζονται από ένα υψηλό ποσοστό υποκλινικών ενδείξεων (Muir et al., 1998). Οι περισσότερες είναι ασυμπτωματικές και ως εκ τούτου, οι εντεροϊοί εθεωρούντο από

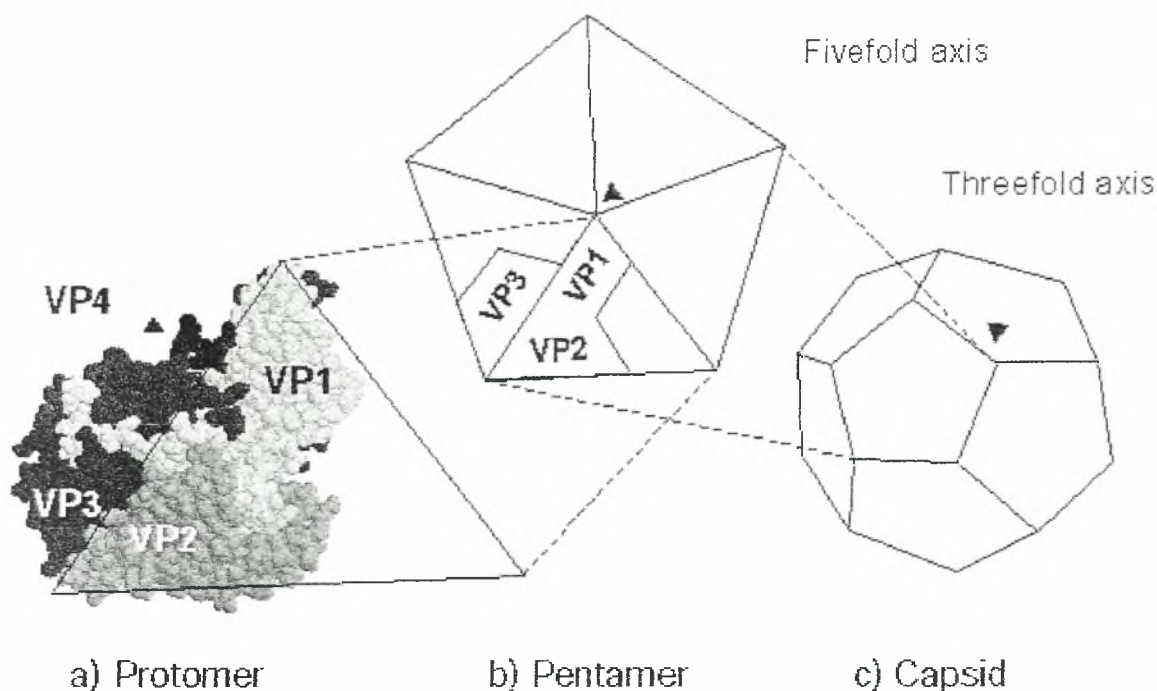
πολλούς ως μη σημαντικοί για να βρεθούν στο επίκεντρο συστηματικής και εμπειριστατωμένη έρευνας. Παρόλα αυτά όμως, οι εντεροϊοί είναι υπεύθυνοι για σοβαρές, ή ακόμα και θανατηφόρες ασθένειες. Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων ως αποτέλεσμα προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος, του μυοκαρδίου και των σκελετικών μυών, του παγκρέατος, του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών. Πιο συγκεκριμένα, οι ασθένειες που οφείλονται σε εντεροϊούς είναι η μηνιγγίτιδα, η καρδιομυοπάθεια, ασθένειες του αναπνευστικού, σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και η νόσος ποδιών και στόματος καθώς επίσης και η παραλυτική πολιομυελίτιδα που σχετίζεται με τα στελέχη των πολιοϊών (Brown E. H., 1972).

1.2 Βιολογία των εντεροϊών

1.2.1 Δομή

1.2.1.1 Καψίδιο

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι *ricoga* ιοί, δεν περιβάλλονται από λιπιδικό ελυτρο περικλείουν το γένωμά τους σε ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Έχουν προσδιορισθεί αρκετές απεικονίσεις της δομής των καψιδίων με ακρίβεια $\sim 3.5\text{\AA}$. Τα καψίδια έχουν διάμετρο περίπου 30nm και χαρακτηρίζονται από τρεις άξονες συμμετρίας, τον πενταμερή, τον τριμερή και τον διμερή που αποτελούνται από 60 αντίγραφα τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών που καλούνται VP1, VP2, VP3 και VP4 (Rueckert R.R., 1985).



Εικόνα 2. Δομική Οργάνωση ενός εντεροϊού. (από Rueckert R.R., 1996)

α) Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από τα προϊόντα πρωτεολυτικής διάσπασης της P1 πολυπρωτεΐνης, τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1 έως VP4. Η επιφάνεια του ιικού σωματίου σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3, ενώ η VP4 είναι εσωτερική.

β) Πέντε πρωτομερή συνενώνονται σε ένα πενταμερές. Φαίνεται ο πενταεδρικής συμμετρίας άξονας.

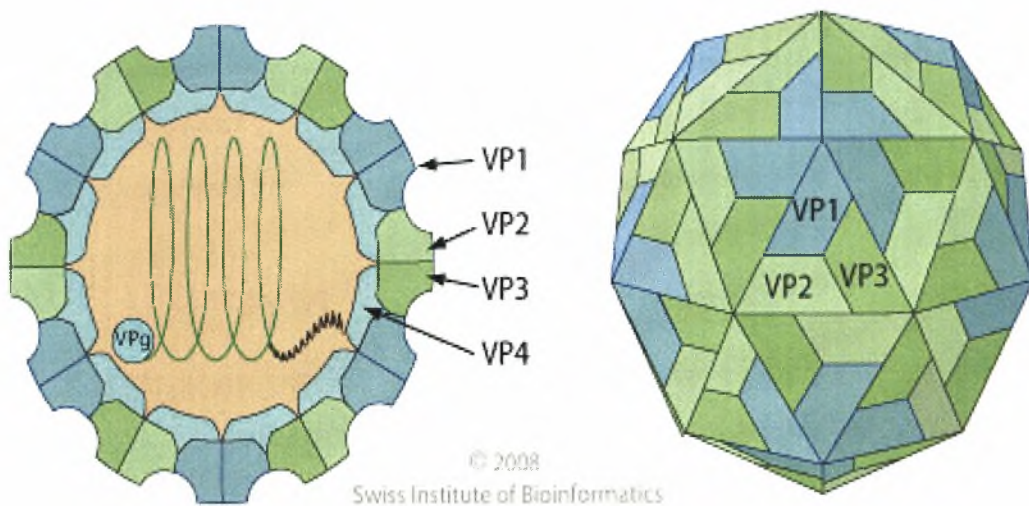
γ) Ένα εικοσαεδρικό καψίδιο σχηματίζεται από δώδεκα πενταμερή. Ένας από τους είκοσι άξονες τριεδρικής συμμετρίας φαίνεται στο δεξιό άκρο της εικόνας.

Το γένωμα του ιού, RNA θετικής πολικότητας, μεταφράζεται σε μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη και έπειτα με πρωτεόλυση η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα πολυπεπτίδια VP0, VP1 και VP3 τα οποία μεταξύ τους σχηματίζουν τα πρωτομερή του καψιδίου. Στη συνέχεια κάθε μια τέτοια τριάδα αλληλεπιδρά με τις υπόλοιπες και σχηματίζονται πενταμερή πρωτομερών [(VP0, VP1, VP3)₅]. Ακολουθεί η συνένωση των πενταμερών στη δομή [(VP0, VP1, VP3)₅]₁₂ (Stanway G., 1990). Τελικό στάδιο αποτελεί το πακετάρισμα των μορίων RNA του ιού στο καψίδιο κατά το οποίο λαμβάνει χώρα η «αντίδραση ωρίμανσης» όπου η πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις πρωτεΐνες VP2 και VP4. Η πρωτεΐνη VP4 βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου και καθοδηγεί τη συναρμολόγηση των πενταμερών.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Οι αντιγονικές θέσεις είναι οι εξής:

1. N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1
2. N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
3. N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3
4. N-AgIIIΒ αποτελείται από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2

Τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 αλληλεπιδρούν με την VP4 στο εσωτερικό του καψιδίου. Στο τέλος κάθε πενταμερούς άξονα μια βαθειά επιφανειακή κοιλότητα, αύλακα, περιβάλλει μια προεξοχή σχήματος αστεριού και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα.



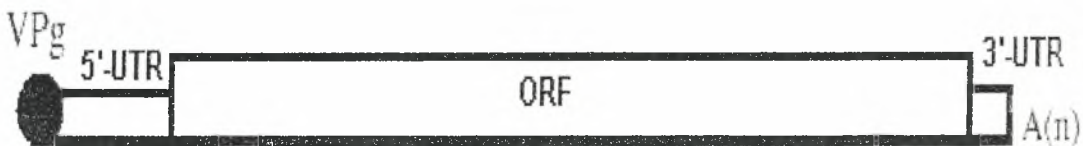
Εικόνα 3. Τρισδιάστατη Δομή των καψιδίων των εντεροϊών. Από Swiss Institute of Bioinformatics

1.2.1.2 Γονιδίωμα

Το γένωμα των εντεροϊών είναι ένα μόριο RNA μονόκλωνο θετικής πολικότητας (+ssRNA). Το μέγεθός του είναι περίπου 7.500 νουκλεοτιδικές βάσεις και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως mRNA κατευθείαν μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Στο 5'-άκρο το ιικό mRNA είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με μια βασική πρωτεΐνη 23 αμινοξέων, την VPg, η οποία

συμβάλει στον εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο και φαίνεται να παίζει και ένα ρόλο εκκινήτη για την έναρξη της αντιγραφής του γενώματος.

Παρατηρώντας κανείς το γένωμα από το 5'-άκρο προς το 3'-άκρο μπορεί να παρατηρήσει την 5'-μη κωδική περιοχή (5'-UTR) για να ακολουθήσει έπειτα το κύριο τμήμα του γενετικού υλικού γνωστό ως ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, Open Reading Frame (ORF). Το τμήμα αυτό είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση όλων των ιικών πρωτεϊνών δομικών και μη δομικών. Τέλος ακολουθεί ακόμα μια αμετάφραστη περιοχή στο 3'-άκρο (3'-UTR) η οποία καταλήγει σε μια πολυαδενυλιωμένη ουρά.



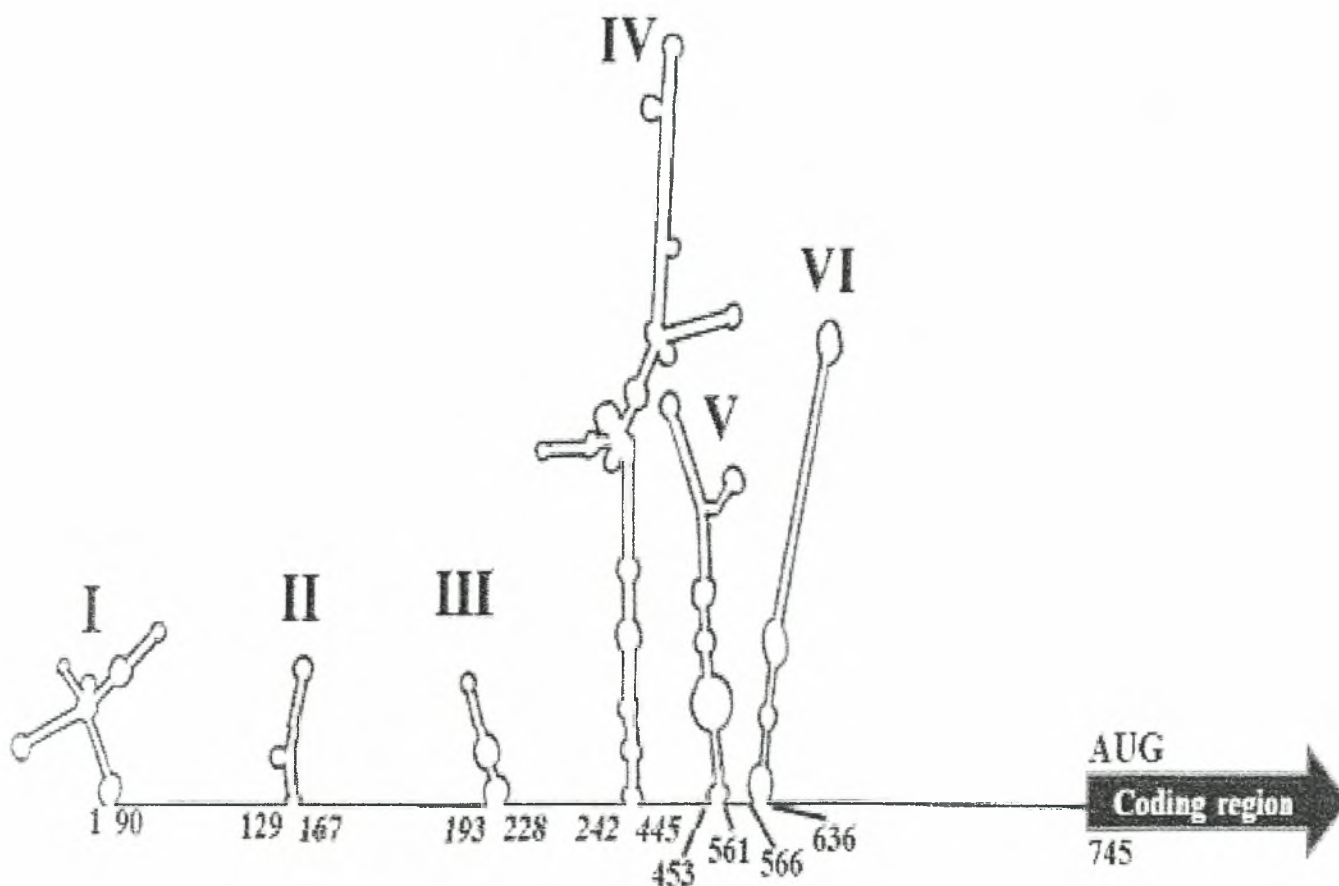
Εικόνα 4. Οι 3 βασικές περιοχές του γενώματος των εντεροϊών.

1.2.1.3 Η 5'-UTR περιοχή

Η 5'-UTR περιοχή αποτελείται από 750 περίπου νουκλεοτιδικές βάσεις δηλαδή το 10% του συνολικού γενώματος. Η περιοχή αυτή δεν μεταφράζεται σε πρωτεΐνη και μεταξύ κοντινών φυλογενετικά ιών παρουσιάζει πολύ μεγάλη ομοιότητα ως προς την αλληλουχία των βάσεων (Stanway et al., 1984). Περιέχει μεγάλα τμήματα νουκλεοτιδίων τα οποία διατηρούνται πλήρως ή σχεδόν από είδος σε είδος. Είναι πιθανό ότι το μήκος και η γενικότερη φύση της περιοχής είναι σημαντικά για τον καθορισμό των χαρακτηριστικών του ιού εντός του κυττάρου ξενιστή.

Οι βάσεις της 5'-UTR έχει βρεθεί ότι σχηματίζουν ένα πλέγμα δευτεροταγών δομών με την ονομασία IRES (Internal Ribosome Entry Site) λειτουργώντας έτσι σαν θέσεις αναγνώρισης σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ RNA-πρωτεϊνών-ριβοσωμάτων οι οποίες είναι υπεύθυνες για την μετάφραση του γενώματος του ιού αλλά και για την μολυσματικότητά του.

Λαμβάνοντας υπόψη τις βιοχημικές μελέτες, την αρχή ελάχιστης ενέργειας και συγκρίνοντας με άλλες αναλύσεις αλληλουχιών, μπορούν να προκύψουν μοντέλα που να παρουσιάζουν τον τρόπο αναδίπλωσης της 5'-μη κωδικής περιοχής (Skinner et al., 1989).



Εικόνα 5. Δευτεροταγής δομή της 5'-UTR του CBV1

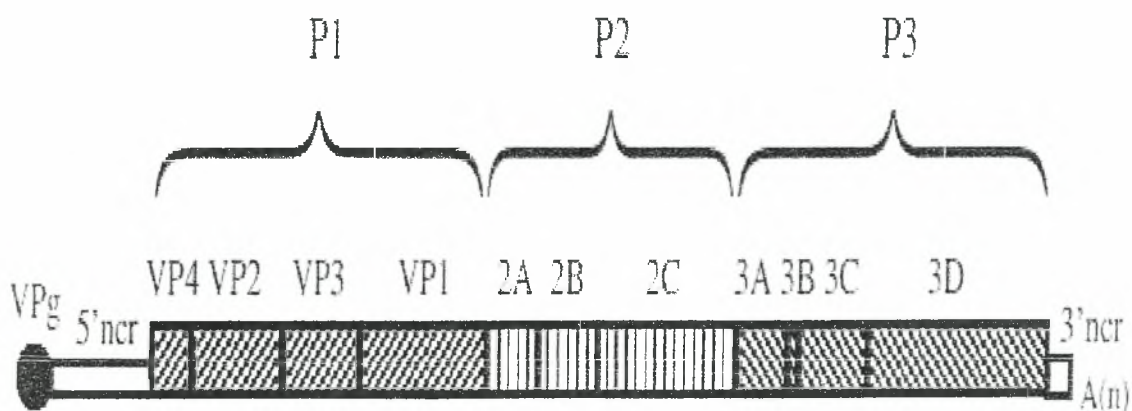
Στην παραπάνω εικόνα διακρίνεται η δομή τριφυλλίου της περιοχής I η οποία είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και για την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου. Έχει βρεθεί ότι μια σειρά από κυτταρικές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με αυτή τη δομή και υποβοηθούν την πρόσδεση ιικών πρωτεϊνών. Οι περιοχές από II έως VI αποτελούν τα προαναφερθέντα στοιχεία IRES.

Η δομή του τριφυλλίου είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των εντεροϊών και των ρινοϊών ενώ περιέχει τέσσερις περιοχές: τις A, B, C και D (εικόνα 5). Στην περιοχή B συνδέονται οι κυτταρικές πρωτεΐνες PCBP (poly (rC)-binding

proteins), ενώ η περιοχή D, αναγνωρίζεται από την ιϊκή πρωτεΐνη 3C που είναι μια πρωτεάση ή πιο πιθανά από την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD. Το σύμπλεγμα μεταξύ του 5'-άκρου-PCBP-3CD θεωρείται ότι περιλαμβάνει έναν διακόπτη για το αν το ιικό αυτό RNA θα χρησιμοποιηθεί σαν mRNA κατά την μετάφρασή ή αν θα χρησιμοποιηθεί για την αντιγραφή του ιού (Murray et al., 2001; Parsley et al., 1997; Silvera et al., 1999).

1.2.1.4 Η ORF περιοχή

Η περιοχή ORF κωδικοποιεί μια μόνο πολυπρωτεΐνη με μήκος 2100-2400 αμινοξέων. Στη συνέχεια η πολυπρωτεΐνη διασπάται σε τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες P1, P2 και P3. Οι πρωτεΐνες 2A, 3C και 3CD είναι πρωτεάσες. Το πρώτο βήμα καταλύεται από την πρωτεάση 2A η οποία κόβει την πολυπεπτιδική αλυσίδα μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της VP1 και του δικού της αμινοτελικού άκρου διαχωρίζοντας έτσι τις δομικές (P1) από τις μη δομικές πρωτεΐνες (P2 και P3). Η υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται από την πρωτεάση 3C.



Εικόνα 6. Το γένωμα των εντεροϊών. Οι P1, P2 και P3 είναι προϊόντα της αρχικής πρωτεολυτικής διάσπασης της ιικής πολυπρωτεΐνης. Από Vance et al. 1997

Οι τέσσερις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 κωδικοποιούνται από το 5'-άκρο της περιοχής ORF. Οι VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοιο μέγεθος μεταξύ των διαφορετικών ριζογονα ιών. Η VP1

κυμαίνεται από 209-302 αμινοξέα, η VP2 από 218-272 και η VP3 από 221-246. Η VP4 είναι μικρότερη σε μέγεθος και κυμαίνεται μεταξύ 68 και 85 αμινοξέων (Stanway G., 1990).

Όσον αφορά τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού αυτές κωδικοποιούνται από αλληλουχίες που βρίσκονται προς το 3'-άκρο της περιοχής ORF. Συνολικά υπάρχουν 7 λειτουργικές πρωτεΐνες οι: 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D. Όπως έχει παρατηρηθεί οι πρωτεΐνες αυτές είναι περισσότερο συντηρημένες φυλλογενετικά σε σχέση με αυτές του καψιδίου γεγονός που υποδεικνύει την έλλειψη εξελικτικής πίεσης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ανθρώπου αλλά και την ανάγκη να παραμένει αμετάβλητη η ενζυμική τους λειτουργία. Η λειτουργία των πρωτεϊνών αυτών παρατίθεται συνοπτικά στον πίνακα που ακολουθεί. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η 3D πρωτεΐνη η οποία μεταξύ ορισμένων οροτύπων διατηρείται μέχρι και 95%.

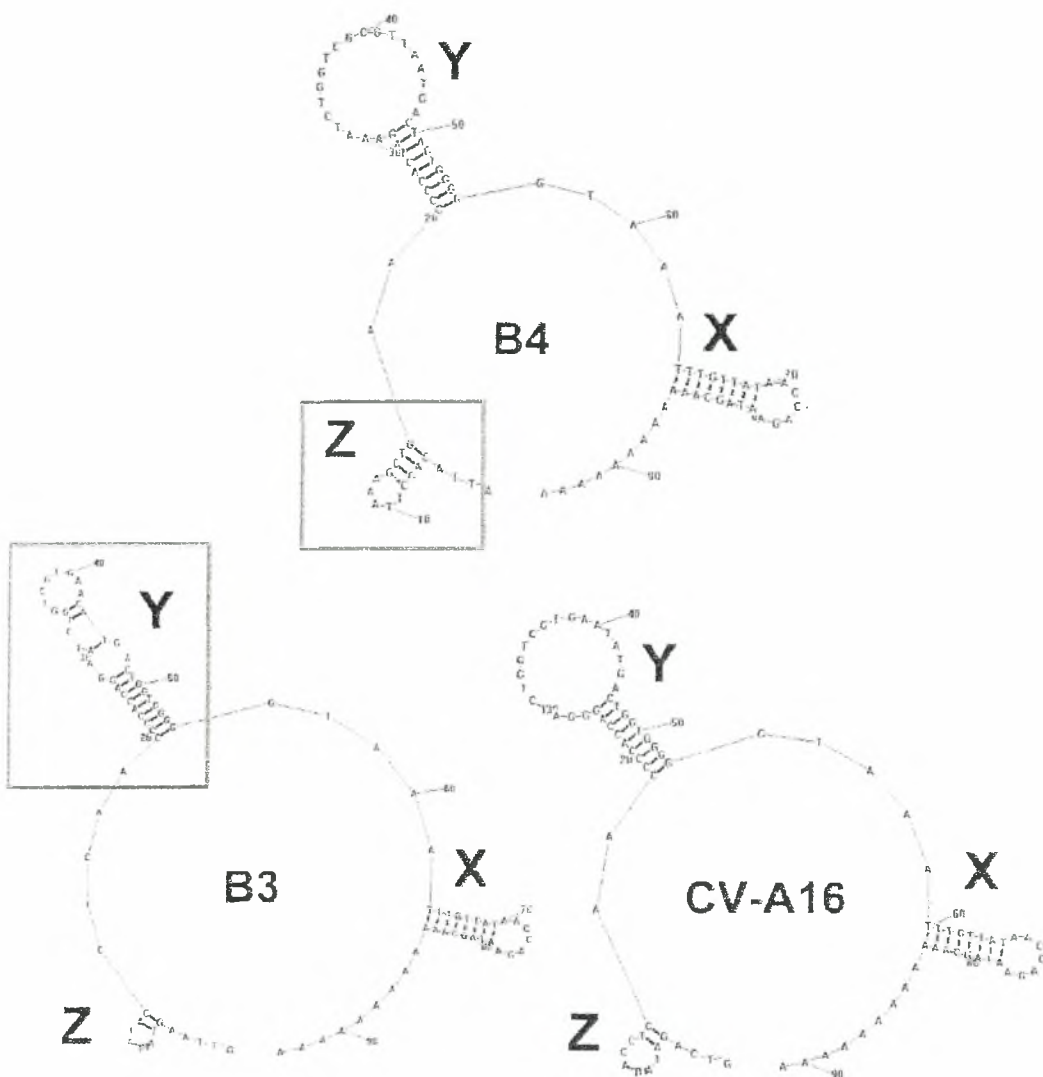
Μη-δομική πρωτεΐνη	Λειτουργία
2A	Πρωτεάση: Υπεύθυνη για το πρώτο ρήγμα στην αρχική πολυρωτεΐνη που χωρίζει τις δομικές από τις μη-δομικές πρωτεΐνες.
2B	Όπως και η πρόδρομη 2BC εμποδίζουν την μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi και αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης (Barco et al., 1995)
2C	Ελικάση
3A	Αναστέλλει την μεταφορά πρωτεϊνών από το ΕΔ στο Golgi, με αποτέλεσμα να μειώνει τις εκκρίσεις (Wessels et al., 2005)
3B	VPg: Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του γενώματος του ιού
3C	Πρωτεάση κυστεΐνης: Διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων

Πίνακας 1. Λειτουργία των μη δομικών πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γένωμα των εντεροϊών.

1.2.1.5 Η 3'-UTR περιοχή

Η 3'-UTR περιοχή είναι σημαντική για την αναγνώριση του RNA από την πολυμεράση κατά την έναρξη της σύνθεσης του (-) κλώνου RNA. Ο όμοιος διαχωρισμός της 3'-UTR στις ίδιες ομάδες, φυλογενετικά, με αυτές που έχουν να κάνουν με την περιοχή κωδικοποίησης πρωτεϊνών δείχνει ότι η εξέλιξη της 3'-UTR συνδέεται στενά με αυτήν των ιικών πρωτεϊνών. Είναι αρκετά μικρότερη της 5'-UTR με μήκος περίπου 100 νουκλεοτιδίων. Το πολυαδενυλιωμένο τμήμα του γενώματος του ιού δεν ανήκει στην περιοχή αυτή καθώς κωδικοποιείται γενετικά και έχει διαφορετικό μήκος στα διάφορα γένη των picorna ιών.

Η μελέτη της 3'-UTR αλληλουχίας δείχνει ότι οι εντεροϊοί μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τέσσερις ομάδες αλλά η δευτεροταγής δομή της παρουσιάζει μόνο δύο διακριτούς πλυθισμούς. Οι δευτεροταγείς αυτές δομές ουσιαστικά είναι τρεις θηλιές που ονομάζονται X, Y και Z. Φαίνεται ότι αυτές οι δομές είναι οι λειτουργικές μονάδες που συνδέονται με ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην αντιγραφή.



Εικόνα 7. Δευτεροταγής δομή της 3'-UTR περιοχής των εντεροϊών

1.2.2 Κύκλος Ζωής

Προκειμένου να αρχίσει ένας μολυσματικός κύκλος, ο ιός πρέπει να συνδεθεί με έναν υποδοχέα της κυτταρικής επιφάνειας ενός ευαίσθητου κυττάρου. Με τη δέσμευση στον υποδοχέα, ο εντεροϊός υποβάλλεται σε δομικές αναδιοργανώσεις με συνέπεια τη μετατροπή σε ένα σωματίδιο που έχει χάσει την πλειοψηφία της εσωτερικής καψιδιακής πρωτεΐνης VP4, έχει εξωτερικεύσει το N-τελικό άκρο της VP1, και έχει έναν διαφορετικό συντελεστή καταβύθισης (135S αντί 160S του εγγενούς καψιδίου), αλλαγμένες αντιγονικές ιδιότητες και αυξημένη ευαισθησία σε πρωτεάσες. Διαφοροποιημένα σωματίδια ρολιο-ϊών βρίσκονται στα ενδοσώματα του

κυττάρου σύντομα μετά από τη μόλυνση (Fenwick & Wall 1973), αλλά η περιοχή εισόδου μιας παραγωγικής μόλυνσης δεν είναι ακόμα γνωστή.

Πριν συντεθούν τα συμπληρωματικά αρνητικής-πολικότητας αντίγραφα του γονιδιώματος, το γενωμικό RNA ενεργεί ως πρότυπο για την πρωτεϊνική σύνθεση. Οι προερχόμενες από ιό πρωτεΐνες πρέπει να συντεθούν πρώτα για να δημιουργηθεί η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση που στερείται το σύστημα του ξενιστή. Η μετάφραση αρχίζει από το IRES, στην 5' UTR (Jang et al. 1988, Pelletier και Sonenberg 1988). Η ORF περιοχή κωδικοποίησης μεταφράζεται ως ενιαία πολυπρωτεΐνη, η οποία διασπάται από τις ιικές πρωτεάσες, σε τρεις πρωτεΐνες προδρόμων P1, P2 και P3 (Kitamura et al. 1981). Οι P2 και P3 πρωτεΐνες διασπώνται σε επτά μη-δομικές πρωτεΐνες. Τα P3 προϊόντα περιλαμβάνουν τις πρωτεάσες 3C και 3CD, οι οποίες απαιτούνται στο «κόψιμο» άλλων πρωτεϊνών του ιού από τα προδρόμα πρωτεϊνικά μόρια

Το ίδιο μόριο RNA που έχει χρησιμοποιηθεί στη μετάφραση, χρησιμοποιείται έπειτα ως πρότυπο για τη σύνθεση των αρνητικών κλώνων RNA από την ιική πολυμεράση 3D. Αυτοί οι κλώνοι χρησιμοποιούνται στη σύνθεση μεγάλων ποσοτήτων θετικής πολικότητας αντιγράφων τα οποία χρησιμοποιούνται στη μετάφραση ιικών πρωτεϊνών, καθώς επίσης και για εγκλεισμό στα ιικά καψίδια. Η μικρή πρωτεΐνη VPg συνδέεται με το 5'-άκρο όλων των αντιγράφων (Flanegan et al. 1977).

Η διαδικασία μόλυνσης ενισχύεται από την αποικοδόμηση του ευκαριωτικού παράγοντα έναρξης 4GII (eIF4GII) (Gradi et al. 1998, Svitkin et al. 1999) και προφανώς και της πολύ-A δεσμευτικής πρωτεΐνης (Kerekatte et al. 1999), από έναν μηχανισμό που περιλαμβάνει την πρωτεάση 2A (Hellen et al. 1991, Wyckoff et al. 1992). Αυτές οι αποικοδομήσεις είναι μεταξύ των γνωστών αλλαγών στο κύτταρο ξενιστή, με συνέπεια τη διακοπή της κυτταρικής, cap-εξαρτώμενης, πρωτεϊνικής σύνθεσης από ανεπαρκώς κατανοητούς μηχανισμούς, οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια διαφορετική, cap-ανεξάρτητη, μέθοδο έναρξης μετάφρασης (Jang et al. 1988, Pelletier & Sonenberg 1988), ώστε να διεξάγουν την πρωτεϊνική σύνθεση στο μολυσμένο κύτταρο.

Ο σχηματισμός ενός νέου καψιδίου αρχίζει καθώς η P1 πρόδρομος πρωτεΐνη διασπάται στις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3, και αυτές οι πρωτεΐνες

διαμορφώνουν ένα ετεροτριμερές (Korant 1973). Έκτοτε, πέντε τριμερή σχηματίζουν ένα πενταμερές, (Phillips et al. 1968). Δώδεκα πενταμερή συνδέονται μαζί για να διαμορφώσουν το προκαψίδιο το οποίο γεμίζεται με ένα αντίγραφο του θετικής-πολικότητας γονιδιώματος. Δεν είναι γνωστό εάν τα κενά προκαψίδια διαμορφώνονται αρχικά και γεμίζουν έπειτα με το μόριο RNA, ή αν σχηματίζονται γύρω από ένα μόριο RNA. Κατά τη διάρκεια του εγκλεισμού του RNA, η πλειοψηφία της καψιδιακής πρωτεΐνης VP0 διασπάται σε VP2 και VP4. Αυτό καλείται πρωτεόλυση ωρίμανσης, η οποία θεωρείται ότι «κλειδώνει» το καψίδιο σε μια ώριμη δομή. Ρολιο-ιοί με μεταλλάξεις που τους καθιστούν ανίκανους σε αυτή την πρωτεόλυση, είναι ελαττωματικοί στον εγκλεισμό RNA (Compton et al. 1990, Ansardi & Morrow 1995), ή παρατηρείται συσσώρευση 150S μορίων που εμφανίζονται όπως τα προκαψίδια που γεμίζουν με RNA, αλλά είναι ιδιαίτερα ασταθή (Hindiyeih και λοιποί. 1999). Όλα τα παραπάνω ενδιάμεσα στάδια που περιγράφονται ανωτέρω μπορούν να καταδειχθούν σε ένα μολυσμένο κύτταρο από την ανάλυση καταβύθισης: το ετεροτριμερές (5S), το πενταμερές (14S), το κενό καψίδιο (περίπου 75S), και το ώριμο ιικό σωματίο (160S).

Ένα μολυσμένο κύτταρο μπορεί χαρακτηριστικά να παραγάγει 10^4 έως 10^5 ιικά σωματίδια, τα οποία απελευθερώνονται με τη λύση του κυττάρου. Η λύση εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της αυξανόμενης διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών (Carrasco 1977), η οποία προκύπτει από τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις των μη-δομικών πρωτεϊνών 3A και 3AB (Lama & Carrasco 1992a, Lama & Carrasco 1992b), 2BC (Aldabe et al. 1997), και 2B (Lama & Carrasco 1992b, van Kuppeveld et al. 1997).

1.2.2.1 Υποδοχείς εντεροϊών

Η έναρξη της ιικής μόλυνσης εξαρτάται από τη σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Η σύνδεση σε αυτά τα μόρια είναι συγκεκριμένη και κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, οι ιοί έχουν προσαρμοστεί για να χρησιμοποιήσουν ποικίλους υποδοχείς. Διάφοροι τέτοιοι υποδοχείς είναι γνωστοί για διάφορους εντεροϊούς. Υπάρχουν διάφορα παραδείγματα στενά συνδεδεμένων ιών που

χρησιμοποιούν διαφορετικούς υποδοχείς για την είσοδο τους στο κύτταρο ξενιστή. Αφ' ενός, μερικοί εξελικτικά απόμακροι ιοί μπορούν να χρησιμοποιήσουν τον ίδιο υποδοχέα, όπως ο υποδοχέας CAR των coxsackie και αδένο-ιών, (Bergelson et al., 1997a). Επιπλέον, υπάρχουν ιοί που έχουν αποδειχθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουν τουλάχιστον δύο διαφορετικούς υποδοχείς. Ένα παράδειγμα τέτοιων ιών είναι ο CAV9 (Roivainen et al. 1991a, Hughes et al. 1995, Roivainen et al. 1996). Εκτός από τα αρχικά μόρια υποδοχέων, πολλοί εάν όχι όλοι οι ιοί χρειάζονται και πρόσθετες πρωτεΐνες, συνήθως ονομάζονται συν-υποδοχείς, για την είσοδο. Ο CAV21 έχει αποδειχθεί ότι απαιτεί την παρουσία και του ICAM-1 και τον παράγοντα επιτάχυνσης της αποικοδόμησης (DAF) για την είσοδο στο κύτταρο (Shafren et al. 1997), και είναι αναγκαία η μετα-σύνδεση με την μικροσφαιρίνη β2 στη διαδικασία εισόδου του CAV9 (Triantafilou et al. 1999).

Όταν οι rhino-ιοί βρέθηκαν να έχουν μια στενή αύλακα γύρω από τον άξονα πενταπλής συμμετρίας, αυτές οι αύλακες προτάθηκαν ότι είναι οι περιοχές αναγνώρισης υποδοχέων (Rossmann et al. 1985). Το βασικό πλεονέκτημα από την χρήση της αυλάκωσης για την σύνδεση του ιού στον υποδοχέα, είναι ότι με αυτόν τον τρόπο εξουδετερώνονται τα ογκώδη, για το μέγεθος της αύλακας, αντισώματα του οργανισμού, ξεφεύγοντας έτσι από το ανοσοποιητικό σύστημα (Stanway G., 1990).

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο εναλλακτικοί υποδοχείς για τον CAV9, η ιντεγκρίνη $\alpha_{vb}3$ και ένας μη αναγνωρισμένος υποδοχέας (Hughes et al. 1995, Roivainen et al. 1996). Συνήθως, στους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στην σχηματιζόμενη αυλάκωση (Rossmann et al., 1985).

Γενικά, φαίνεται ότι οι ιοί είναι κάπως καιροσκοπικοί στη χρήση υποδοχέων τους, όντας ικανοί να προσδένονται σε διαφορετικούς υποδοχείς κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Αυτή η άποψη υποστηρίζεται από τη διαπίστωση ότι υπάρχει παραλλαγή στην ιδιομορφία υποδοχέων σε δεδομένο ορότυπο CBV, ανάλογα με την ιστορία «διάβασης» μέσα από τα κύτταρα ξενιστές και μεταξύ των διάφορων απομονώσεων (Bergelson et al. 1997b).

Υποδοχέας	Στελέχη
Υπεροικογένεια ανοσοσφαιρινών: PVR ICAM-1 CAR	PV 1-3 CAV13, 15, 18, 20, 21 CBV1-6
Ιντεγκρίνες: Ιντεγκρίνη $\alpha_{\nu\beta 3}$ Ιντεγκρίνη $\alpha_{2\beta 1}$ (VLA)	CAV9, EV9 EV1
Άλλος: DAF, CD55	CAV13, 18, 21 CBV1, 3, 5 EV7, 13, 21, 29, 33, 70

Πίνακας 2. Κυτταρικοί υποδοχείς πρόσδεσης των εντεροϊών

1.2.2.2 Μετάφραση

Όπως είναι γνωστό τα ευκαριωτικά mRNA μεταφράζονται με ένα σύστημα το οποίο είναι cap-εξαρτώμενο. Δηλαδή ο παράγοντας eIF4E αλληλεπιδρά με το 5'-κάλυμα του mRNA και με τον παράγοντα eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με την πρωτεΐνη PABP (poly(A)-binding protein) (Gallie D. R., 1991). Ο παράγοντας eIF4G συνδέεται και με μια ελικάση, τον παράγοντα eIF4A και μέσω του παράγοντα eIF3 με την μικρή υπομονάδα του ριβοσώματος, έχοντας ένα ρόλο «πρωτεΐνης σκαλωσιάς» ("scaffold protein").

Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος, σηματοδοτεί μια σειρά αλλαγών μέσα στο κύτταρο ξενιστή, όπως για παράδειγμα τροποποίηση των κανονικών μεταφραστικών παραγόντων (Lloyd, 1988). Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω αποικοδομούνται παράγοντες της cap-εξαρτώμενης μετάφρασης όπως οι eIF4GI και eIF4GII. Είναι φανερό ότι αυτές οι αλλαγές στο μολυσμένο κύτταρο εμποδίζουν την εξαρτώμενη από το 5'-κάλυμα μετάφραση των mRNA, ευνοώντας την μετάφραση μέσω στοιχείων IRES.

Κατά την μετάφραση του γενώματος των εντεροϊών, ο παράγοντας eIF4G συνδέεται στο στοιχείο IRES μέσω του παράγοντα eIF4B, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο το ιικό mRNA στο ριβόσωμα (Ochs et al., 1999). Η σύνδεση του παράγοντα eIF4B στο στοιχείο IRES πραγματοποιείται στην δομική περιοχή V, ενώ αλληλουχίες της δομικής περιοχής VI συμβάλλουν στην σύνδεση αυτή του παράγοντα, χωρίς όμως να είναι απολύτως απαραίτητες

για την μετάφραση του ιϊκού γενώματος. Εκτός όμως από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες οι οποίοι συνδέονται στο στοιχείο IRES και προάγουν την μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιϊκού RNA, όπως είναι η πρωτεΐνη των 57kDa που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η πρωτεΐνη La των 52kDa (La auto antigen) και η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP (Poly(rC) Binding Protein) (Ochs et al., 2002). Τέλος, το κωδικόνιο έναρξης που χρησιμοποιείται βρίσκεται σε απόσταση 30-150 νουκλεοτίδια μετά από το στοιχείο IRES και αναγνωρίζεται μέσω της διαδικασίας της σάρωσης.

1.2.2.3 Αντιγραφή

Πριν συντεθούν τα συμπληρωματικά αρνητικής-πολικότητας αντιγράφα του γονιδιώματος, το γενωμικό RNA ενεργεί ως πρότυπο για την πρωτεϊνική σύνθεση. Το ίδιο μόριο RNA που έχει χρησιμοποιηθεί στη μετάφραση, χρησιμοποιείται έπειτα ως πρότυπο για τη σύνθεση των αρνητικών κλώνων RNA από την ιϊκή πολυμεράση 3D.

Αυτή η διαδικασία απαιτεί ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών τόσο του κυττάρου όσο και του ιού καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία επάνω στο RNA τα οποία δρουν *in cis* ρυθμίζοντας την αντιγραφή.

Cis-δραστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την αντιγραφή αποτελούν:

1. Η 3'-UTR και η πολυαδενυλιωμένη ουρά, είναι γνωστό ότι το μέγεθος της πολυαδενυλιωμένης ουράς αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την αντιγραφή του ιού (Barton et al., 2001)
2. Η δομή τριφυλλίου που βρίσκεται στο 5' άκρο της 5'-UTR επηρεάζει την σταθερότητα την μεταγραφή και την αντιγραφή των εντεροϊών. Θεωρείται ότι αυτή η δομή αλληλεπιδρά με την 3'-UTR μέσω πρωτεϊνών σχηματίζοντας ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (RNP) σύμπλοκο, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Gamarnik et al., 1998).

3. Μια δομή φουρκέτας που βρίσκεται στην περιοχή 2C του γενώματος είναι απαραίτητη για την σύνθεση της VPgpUpU η οποία χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται διαφορετικός μηχανισμός ουριδιλίωσης της πρωτεΐνης VPg, για την έναρξη της αντιγραφής των κλώνων θετικής και αρνητικής πολικότητας. (Goodfellow et al., 2000, Morasco et al., 2003)

Ένα από τα πρώτα βήματα κατά την έναρξη της αντιγραφής, είναι ο σχηματισμός της ουριδιλιωμένης VPg, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται σαν εκκινητής από την ιική πολυμεράση. Υπάρχουν δύο μοντέλα που περιγράφουν τον σχηματισμό της ουριδιλιωμένης VPg. Σύμφωνα με το πρώτο, η VPg ουριδιλιώνεται στην πολυαδενυλιωμένη ουρά όπου και δρα σαν εκκινητής για την έναρξη της αντιγραφής του αρνητικού κλώνου. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, η VPg ουριδιλιώνεται στην φουρκέτα *cre(2C)*, με αποτέλεσμα να παράγονται αρκετά μόρια VPgpUpU τα οποία και χρησιμοποιούνται σαν εκκινητικά μόρια για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας, αναγνωρίζοντας τις δύο αδενίνες που βρίσκονται στο 3' άκρο του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Sharma et al., 2005).

Κατά την αντιγραφή του ιικού γενώματος, υπάρχει μια ασυμμετρία όσον αφορά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας σε σχέση με τον κλώνο αρνητικής πολικότητας. Η ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την δημιουργία των εκκινητικών μορίων (ουριδιλίωση της VPg στην 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά και στην φουρκέτα *cre(2C)*), μπορεί να εξηγήσει τον λόγο για τον οποίο παρατηρείται απότομη αύξηση των κλώνων θετικής πολικότητας (Morasco et al., 2003).

1.3 Επιδημιολογία

Οι εντεροϊοί μολύνουν εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως κάθε έτος, με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκβάσεων που κυμαίνονται από την ασαφή μόλυνση και την ήπια αναπνευστική ασθένεια (κοινό κρυολόγημα) έως την

ασθένεια ΗFM, την οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα, την ασηπτική μηνιγγίτιδα, την μυοκαρδίτιδα και την οξεία χαλαρή παράλυση. Στις Ηνωμένες Πολιτείες οι εντεροϊοί είναι υπεύθυνοι για 30.000 έως 50.000 εισαγωγές μηνιγγίτιδας ετησίως.

Δεξαμενή των εντεροϊών του ανθρώπου αποτελεί μόνο ο άνθρωπος. Εντεροϊοί βρίσκονται στο κατώτερο και ανώτερο τμήμα του πεπτικού σωλήνα και γι' αυτό μπορούν να μεταδοθούν τόσο με την κοπρανοστοματική οδό όσο και με τις αναπνευστικές απεκκρίσεις. Σε περιοχές με χαμηλή στάθμη υγιεινής η κοπρανοστοματική οδός επικρατεί. Εντεροϊοί απομονώνονται και από λύματα. Κατά συνέπεια είναι δυνατή η μετάδοση με την αλυσιδωτή οδό

Κόπρανα → λύματα → νερό → στοματοεντερική οδός

Για τον ιό της ηπατίτιδας Α (HAV) συχνή είναι η μετάδοση μέσω οστρακοειδών (μύδια) που αναπτύσσονται σε νερά που δέχονται κοπρανώδη ρύπανση.

Πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς, όπως και στις περισσότερες ασθένειες, είναι τα μικρά παιδιά και γενικά τα άτομα μικρής ηλικίας τα οποία συνήθως δεν έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις. Ενήλικες μπορούν και αυτοί να μολυνθούν και να νοσήσουν, αν δεν παρουσιάζουν ανοσία για κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο.

Εντεροϊοί μπορούν να βρεθούν σε εκκρίσεις του αναπνευστικού (σάλιο, πτύελα ή ρινική βλέννα) με αποτέλεσμα να μολύνουν τα άτομα που θα έρθουν σε επαφή με αυτά. Εντεροϊοί εντοπίζονται συνήθως στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου (CDC, June 1998). Γι' αυτό το λόγο καλές συνθήκες υγιεινής μπορούν να μειώσουν την μετάδοση των ιών αυτών, ενώ η εποχή που μεταδίδονται συνήθως οι εντεροϊοί είναι το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

1.4 Παθογένεια

Οι εντεροϊοί αποτελούν για τον άνθρωπο συνήθεις παράγοντες εμφανών και υποκλινικών λοιμώξεων. Οι περισσότεροι εντεροϊοί (όχι ο

HAV) μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον μπορούν να προκαλέσουν ποικίλα κλινικά σύνδρομα.

Οι πολιοϊοί είναι δυνατόν να προκαλέσουν παραλύσεις, ενώ οι υπόλοιποι εντεροϊοί σχετίζονται με την εμφάνιση μυϊτίδας, μυοκαρδίτιδας, μηνιγγίτιδας, επιπεφυκίτιδας, εξανθημάτων, ήπιων λοιμώξεων των ανωτέρων αναπνευστικών οδών και ηπατίτιδας.

Διάφοροι εντεροϊοί μπορούν να προκαλέσουν το ίδιο σύνδρομο, ενώ ο ίδιος εντεροϊός μπορεί να προκαλέσει ποικιλία συνδρόμων, είτε με την μορφή σποραδικών κρουσμάτων ή ακόμη και επιδημιών.

Οι εντεροϊοί εισέρχονται στο σώμα του ανθρώπου και των ζώων από τη στοματική οδό. Αρχική θέση πολλαπλασιασμού τους αποτελεί ο λεμφικός ιστός του πεπτικού σωλήνα, περιλαμβανομένου και του φάρυγγα.

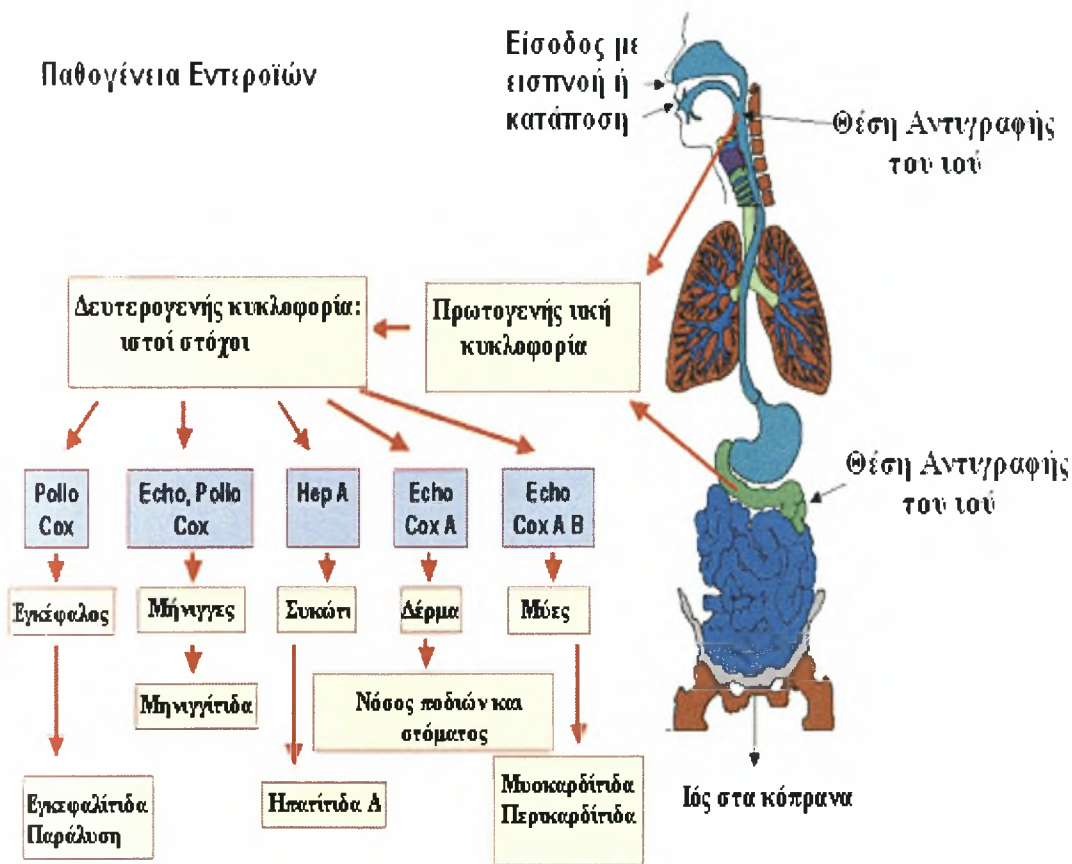
Από το έντερο διασπείρονται προς δυο κατευθύνσεις:

1. Προς το αίμα (ιαιμία) και από εκεί προς τους ιστούς και τα όργανα
2. Κατά μήκος του εντερικού σωλήνα απεκκρινόμενοι με τα κόπρανα.

Ο μηχανισμός με τον οποίο οι εντεροϊοί δρουν παθογενετικά είναι η λυτική λοίμωξη των ξενιστών κυττάρων που απολήγει σε καταστροφή τους. Εκτός από την τοπική δράση στα κύτταρα του εντερικού σωλήνα μπορεί να υπάρξει στάδιο ιαιμίας με επακόλουθη μεταφορά του ιού στα όργανα στόχους (νωτιαίος μυελός, εγκέφαλος, μηνιγγες, μυοκάρδιο, ήπαρ, δέρμα κ.λ.π.).

Πιο αναλυτικά οι πολιοϊοί μπορούν να προσβάλλουν τα επιχώρια λεμφογάγγλια και ακολούθως να προκαλέσουν ιαιμία, συνήθως γύρω στην 6^η-9^η μέρα μετά τη μόλυνση. Τότε εμφανίζονται τα πρώτα μη ειδικά συμπτώματα όπως κακοδιαθεσία, πυρετός, κεφαλαλγία και έμετος. Εφόσον προσβάλλονται κύτταρα του Κ.Ν.Σ. μπορεί να προκύψει μη παραλυτική πολιομυελίτιδα (1-2%) ή παραλυτική πολιομυελίτιδα (0,1-1%).

Οι Coxsackie-ιοί και οι ECHO-ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύτερο φάσμα νόσων. Αρχική θέση πολλαπλασιασμού τους είναι ο φάρυγγας και το λεπτό έντερο. Οι ιοί αυτοί μπορούν να προκαλέσουν παραλύσεις μυών, φυσαλιδώδη στοματίτιδα ή ερπητική κυνάγχη (Coxsackie A), επιδημική μυαλγία και πλευροδυνία (Coxsackie B) μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα (Coxsackie B), μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Coxsackie B και εντεροϊός 71), εξανθήματα, κ.τ.λ.. Ο ιός Coxsackie B4 θεωρείται υπεύθυνος για την πρόκληση διαβήτη.



Εικόνα 8. Παθογένεια των εντεροϊών. Από Dr. Richard Hunt, University of South Carolina

1.5 Διάγνωση

Υπάρχουν αρκετοί λόγοι που μας ωθούν να βρούμε ένα γρήγορο διαγνωστικό πρωτόκολλο για τους εντεροϊούς. Η απομόνωση τους σε κυτταροκαλλιέργεια και η αναγνώριση της κυτταροπαθογόνου δράσης τους χρειάζονται υψηλό επίπεδο εργαστηριακής εξειδίκευσης και είναι χρονοβόρες τεχνικές. Τα πράγματα γίνονται ακόμα πιο δύσκολα αν σκεφτεί κανείς ότι κάποιοι ορότυποι Coxsackie A δεν αναπτύσσονται καθόλου σε κυτταροκαλλιέργεια (όπως οι ορότυποι 17,22,23,31,32,40,53,54).

Μια δεύτερη προσέγγιση, αυτή του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου έχει ελάχιστη έως καθόλου εφαρμογή στα κλινικά εργαστήρια ενώ το μόνο δείγμα στο οποίο θα μπορούσαν να ανιχνευτούν είναι τα κόπτρανα.

Η έλλειψη ενός ευρείας συμβατότητας αντιγόνου έχει μπλοκάρει την ανάπτυξη ανοσολογικών πρωτοκόλων για τους εντεροϊούς. Επιτυχία έχει παρατηρηθεί μόνο σε οροτυπικές υπο-ομάδες όπως για παράδειγμα η ομάδα των Coxsackie B ιών η οποία διαθέτει ένα αντιγόνο κοινό για όλους. Η χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων φαίνεται πιο επιτυχημένη αλλά δεν λύνει το πρόβλημα.

Η χρήση ανιχνευτών cDNA δίνουν την δυνατότητα για απευθείας ανίχνευση του ιού στα σωματικά υγρά αλλά η ευαισθησία αυτών των μεθόδων πρέπει να αυξηθεί καθώς ξεκινούν από ένα κατώτατο όριο του 33%.

Η πιο πολλά υποσχόμενη μέθοδος απευθείας ανίχνευσης είναι η εφαρμογή της PCR. Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούν την τεχνική της RT-PCR για την ανίχνευση των εντεροϊών παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία, απαιτούν λιγότερη εργασία και λιγότερο χρόνο για την ολοκλήρωσή τους, μπορούν να ανιχνεύσουν όλους τους γνωστούς εντεροϊούς, ενώ κάποια από αυτά παρουσιάζουν και δυνατότητα οροτυπικής ταυτοποίησης. Συνήθως, οι περιοχές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των εντεροϊών είναι η 5'-UTR και η περιοχή του γονιδίου της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης. Τρεις γενικές στρατηγικές έχουν προταθεί. Αυτή της καθολικής ανίχνευσης πολλών ή όλων των οροτύπων, η ανά ομάδα ιών ειδική PCR, για την ανίχνευση περιορισμένου αριθμού οροτύπων, και τέλος η ορο-ειδική, για την ανίχνευση ενός μόνο οροτύπου.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι μοριακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των εντεροϊών, στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές της 5'-UTR, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ανίχνευση όλων των μελών του γένους αυτού (Romero J. R., 1999). Η 5'-UTR είναι σημαντική καθώς έρχεται σε επαφή με πρωτεΐνες του ξενιστή και επομένως η εξέλιξη της εξαρτάται από τον ξενιστή. Για το λόγο αυτό φαίνεται ότι ο ρυθμός μεταλλάξεων στην 5'-UTR είναι ιδιαίτερα χαμηλός κάτι το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα να σχεδιάσουμε ένα πρωτόκολλο που θα έχει διάρκεια στο χρόνο και ακρίβεια.

Η δεύτερη προσέγγιση ξεκινά από το γεγονός ότι η αλληλουχία του γονιδίου της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης σχετίζεται με τον ορότυπο. Το βασικότερο πρωτόκολλο που στοχεύει στο γονίδιο της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης περιλαμβάνει την πραγματοποίηση nested RT-PCR η οποία συνδυάζεται με αλληλούχιση (Nix et al., 2006), παρέχοντας την δυνατότητα ανίχνευσης και οροτυπικής ταυτοποίησης όλων των γνωστών στελεχών των εντεροϊών.

2. Πειραματική διαδικασία

2.1 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου το οποίο θα μπορεί να ανιχνεύει και να ταυτοποιεί κλινικά στελέχη εντεροϊών. Η περιοχή στην οποία βασίζεται το συγκεκριμένο πρωτόκολλο είναι η 5'-UTR διότι περιέχει συντηρημένες περιοχές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση όλων των εντεροϊών (Romero J. R., 1999). Παρ' όλο που η ενδο-οροτυπική ποικιλότητα στην 5'-UTR είναι τόσο μεγάλη που δεν μπορεί να υπάρξει σαφής αντιστοίχιση μεταξύ της 5'-UTR και του ορότυπου (Oberste et al., 1999, Mulders et al., 2000), πραγματοποιώντας ανάλυση RFLP, θα μπορούσε να γίνει ομαδοποίηση μεταξύ των εντεροϊών (Siafakas et al., 2002, Siafakas et al., 2003). Έπειτα από ενθαρρυντικά αποτελέσματα με τα πρότυπα στελέχη εντεροϊών προχωρήσαμε στην δοκιμή του υπό μελέτη πρωτοκόλλου σε κλινικά δείγματα.

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Πρότυπες Αλληλουχίες

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι υπάρχουσες αλληλουχίες των 5'-μη κωδικών περιοχών των πρότυπων στελεχών εντεροϊών για το σχεδιασμό των εκκινητικών μορίων και την επιλογή των ενζύμων περιορισμού. Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2 και βρίσκονται δημοσιευμένες σε βάσεις δεδομένων όπως στο GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) και στο ευρωπαϊκό ινστιτούτο βιοπληροφορικής (<http://www.ebi.ac.uk/>)

Εντεροϊοί	Στελέχη	Αριθμός καταχώρησης
Coxsackie A1	T.T. (Tompkins)* (Coxsackie, NY/47)	AF499635 , AF329684
Coxsackie A2	Fleetwood	AY421760 , AF303036
Coxsackie A3	Olson	AY421761 , AF303037
Coxsackie A4	High Point	AY421762 , AY028214
Coxsackie A5	Swartz	AY421763

Coxsackie A5	G.S.	AF303044
Coxsackie A6	C.G.	AY028215
Coxsackie A6	Gdula	AY421764
Coxsackie A7	Parker	AY421765 , AF329685
Coxsackie A8	Donovan	AY421766 , AY028216
Coxsackie A9	P. Bozek	AY028216
Coxsackie A9	Griggs	D00627
Coxsackie A10	Kowalik	AY421767 , AF303042
Coxsackie A11	Belgium 1* (Belgium/51)	AF499636 , AF329686
Coxsackie A12	Texas-12	AY421768 , AF303041
Coxsackie A13	Flores* (Mexico/52)	AF499637 , AF465511 , AF303040
Coxsackie A14	G-14	AY421769 , AF329687
Coxsackie A15	G-9* (South Africa/50)	AF499638 , AF465512 , AY028217
Coxsackie A16	G-10* (South Africa/51)	U05876
Coxsackie A16	Tainan/5079/98 (Taiwan)	AF177911
Coxsackie A17	G-12* (South Africa/51)	AF499639 , AF329688
Coxsackie A18	G-13* (South Africa/50)	AF499640 , AF465513 , AF303038
Coxsackie A19	NIH-8663 (Dohi)* (Japan/52)	AF499641 , AF329689
Coxsackie A20	IH-35* (New York/55)	AF499642 , AF465514 , AF303039
Coxsackie A21	Coe (California/54)	D00538
Coxsackie A21	Kuykendall* (California/52)	AF546702 , AF465515
Coxsackie A22	Chulman (New York/55)	AF499643 , AF329690
Coxsackie A24	Joseph	AY028218
Coxsackie A24	EH 24/70 (Singapore/70)	D90457
CBV1	Japan	M16560 ,
CBV2	Ohio-1/Ohio/US/47	AF081485 , AF085363
CBV3	Nancy/Connecticut/US/49*	M88483 , M33854 , M16572
CBV4	JVB/New York/US/51 (Benschoten)*	X05690
CBV5	Faulkner/Kentucky/US/52*	AF114383 ,
CBV5	1954/UK/85 (Peterborough/UK/85)	X67706
CBV6	Schmitt/Philippines/53 (1-15-21)*	AF039205 , AF105342 , AF114384
E1	Farouk/Egypt/51*	AF029859
E2	Cornelis/Connecticut/US/51*	AY302545 , AF465518
E3	Morrissey/Connecticut/US/51*	AY302553
E4	Pesacek/Connecticut/US/51*	AY302557 , X89534
E5	Noyce/Maine/54*	AF083069
E6	D'Amori* (Rhode Island/55)	AY302558 , AF405325
E6	Charles "wild type, lytic"	U16283
E7	Wallace* (Ohio)	AY036579 , AY302559 , AF465516
E9	Hill/Ohio/US/53*	X84981
E9	Barty	X92886
E11	Gregory* (Ohio)	X80059
E12	Travis* (Philippines/53) (wildtype)	X79047
E12	Travis (Rhodanine resistant variant)	X77708
E13	Del Carmen* (Philippines/53)	AY302539 , AF405311
E14	Tow* (Rhode Island/54)	AY302540 , AF405312
E15	Ch 96-51 (Charleston)* (West Virginia/51)	AY302541 , AF405313
E16	Harrington* (Massachusetts/51)	AY302542
E17	CHHE-29* (Mexico City)	AY302543
E18	Metcalf* (Ohio)	AF317694 , AF405314
E19	Burke* (Ohio)	AY302544

E19	K/542/81	AY167107
E20	JV-1* (Washington DC/55)	AY302546 , AF405316
E21	Farina (E26D)* (Massachusetts/50)	AY302547 , AF405317
E24	DeCamp* (Ohio/56)	AY302548 , AF405318
E25	JV-4* (Washington DC/57)	AY302549
E26	Coronel (11-3-6)* (Philippines/53)	AY302550 , AF405319
E27	Bacon (1-36-4)* (Philippines/53)	AY302551 , AF405320
E29	JV-10* (Washington DC/55)	AY302552 , AF405321
E30	Bastianni* (New York/58)	AF162711 , AF311938
E31	Caldwell* (Kansas/55)	AY302554 , AF405322
E32	PR-10* (Puerto Rico)	AY302555 , AF405323
E33	Toluca-3* (Mexico/59)	AY302556 , AF405324
Polio 1	Mahoney (Ohio/41)	J02281 , V01148 , V01149
Polio 1	Sabin (LSc, 2ab)	V01150
Polio 2	Lansing* (Michagan/37)	M12197
Polio 2	Sabin (P712, Ch, 2ab)	X00595
Polio 3	Leon* (California/37)	K01392
Polio 3	Sabin (Leon 12a-1-b)	K00043
EV68	Fermon* (California/62)	AY426531
EV69	Toluca-1* (Toluca, Mexico/59)	AY302560
EV70	J670/71* (Japan/71)	D00820 , DQ201177 ,
EV71	Tainan/5746/98 (Taiwan POC)	AF304457
EV71	BrCr* (California/70) ?	U22521
EV73	CA55-1988*	AF241359 , AF241360
EV74	USA/CA75-10213	AY556057
EV75	USA/OK85-10362	AY556070
EV76	???	AY697458
EV77	USA/TX97-10394	AY843302
EV79	USA/CA82-10385	AY843309
EV79	USA/CA79-10384	AY843297
EV80	USA/CA67-10387	AY843298
EV81	USA/CA68-10389	AY843299
EV82	USA/CA64-10390	AY843300
EV83	USA/CA76-10392	AY843301
EV84	CIV2003-10603	DQ902712
EV85	BAN00-10353	AY843303
EV86	BAN00-10354	AY843304
EV87	BAN01-10396	AY843305
EV88	BAN01-10398	AY843306
EV89	BAN00-10359	AY697459
EV90	CAM1956	AB192877
EV90	BAN99-10399	AY697460
EV90	F950027	AY773285
EV91	BAN00-10406	AY697461
EV97	BAN99-10355	AY843307
EV100	BAN2000-10500	NC_009887
EV101	CIV03-10361	AY843308

Πίνακας 3. Πρότυπα στελέεση εντεροϊών και αριθμός καταχώρησης στη γονιδιακή τράπεζα GenBank των αλληλουχιών της 5'-UTR.

2.2.2 Επιλογή Εκκνητικών μορίων

Για τον σχεδιασμό των εκκνητικών μορίων, πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση των στελεχών του πίνακα 2, με τη βοήθεια του προγράμματος ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>). Στη συνέχεια, επάνω στις συντηρημένες περιοχές σχεδιάστηκαν τα εκκνητικά μόρια που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.

Όνομα	Θέση	Πολικότητα	Αλληλουχία 5'-3'
TS1	66-85	Sense	TACC(CT)TTGTACGCCTGTTTT
HEV-C-9	538-558	Antisense	GGACACCCAAAGTAGTCGGTTC

Πίνακας 4. Εκκνητικά μόρια. Η θέση υπολογίστηκε με βάση το στέλεχος *Coxsackie B1*

2.2.3 Επιλογή ενζύμων

Για την επιλογή του περιοριστικού ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάλυση RFLP, δοκιμάστηκαν αρκετά ένζυμα, σε θεωρητικό επίπεδο, αναζητώντας την αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου στις αλληλουχίες των στελεχών του πίνακα 2. Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ενζύμων που μελετήθηκαν, ήταν ότι αναγνώριζαν περιοχές πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη, λόγω του ότι υπάρχει μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των βάσεων στην 5' NTR (Stanway et al., 1984). Το περιοριστικό ένζυμο που επιλέχθηκε τελικά ήταν το Hha I (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) το οποίο αναγνωρίζει και κόβει την αλληλουχία GCG/C. Σύμφωνα με την θεωρητική μελέτη, εάν χρησιμοποιηθεί το συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο, οι εντεροϊοί του πίνακα 2 διαχωρίζονται σε 18 ομάδες κατά την ανάλυση RFLP.

2.2.4 Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία

Κατά το πειραματικό μέρος της εργασίας δεν ήταν διαθέσιμα κλινικά δείγματα από όλα τα στελέχη των εντεροϊών που παρουσιάζονται στο θεωρητικό μέρος. Αυτά που χρησιμοποιήθηκαν κατά το πειραματικό μέρος της εργασίας παρατίθενται στον πίνακα 4.

Εντεροϊός	Δείγμα	Προέλευση	Έτος απομόνωσης
CAV9	A9 611/80/1	Cantacuzino Institute, Romania	1980
	A9 65/89/1	Cantacuzino Institute, Romania	1989
	A9 113/73/2	Cantacuzino Institute, Romania	1973
	A9 115		
	1		
	2		
	3		
	5		
CAV16	5441		
CBV1	B1 99/74/1	Cantacuzino Institute, Romania	1974
	B1 98/74/2	Cantacuzino Institute, Romania	1974
	B1 88/74/9	Cantacuzino Institute, Romania	1974
CBV2	B2 116/95/2	Cantacuzino Institute, Romania	
	B2 118/95/1	Cantacuzino Institute, Romania*	
	5207 B	Hellenic Pasteur Institute	1984
	5211 B	Hellenic Pasteur Institute	1984
CBV3	B3 109/85/1	Cantacuzino Institute, Romania	1978
	B3 123/95/1	Cantacuzino Institute, Romania	1985
	B3 77/78/3	Cantacuzino Institute, Romania*	1995
CBV4	B4 169/75/1	Cantacuzino Institute, Romania	
	B4 69/86/1	Cantacuzino Institute, Romania	1986
CBV5	B5 14/76/1	Cantacuzino Institute, Romania*	1970
	B5 254/77/1	Cantacuzino Institute, Romania	1977
	81020	Hellenic Pasteur Institute	2001
	6451G	Hellenic Pasteur Institute	1984
CBV6	B6 86/73/1	Cantacuzino Institute, Romania	1973
	B6 7/73/19	Cantacuzino Institute, Romania	1973
	AB-19	Cantacuzino Institute, Romania	
E3	138/79/1	Romania	1979
	243/97/1	Romania	1997
E5	156/98/1		
E6	24/79/118		
	Founariotakis	Greece	2001
	Bledakis	Greece	2001
	Tsikandilakis	Greece	2001
	Fregadakis		
E7	44/73/1		
E9	307/77/1	Romania	1977
	121/82/1	Romania	1982
E11	257/98/1	Romania	1998
E13	85451	Greece	2001
	86716	Greece	2001
	Pleurakis	Greece	2001
	Papadakis	Greece	2001
E14	1817	Greece	1980
	1729	Greece	1980
	1374	Greece	1980
E30	85671	Greece	2001
	86027	Greece	2001
	85929	Greece	2001

Πίνακας 5. Κλινικά στελέχη εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκαν πειραματικά

2.2.5 Εκχύλιση ιϊκού RNA από κυτταροκαλλιέργειες

Η απομόνωση του ιϊκού RNA έγινε με την μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Casas I,1995). Από κάθε μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν 100μl, τα οποία επώασαμε για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου με 300μl διαλύματος αποτελούμενου από: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol, 25 mM sodium citrate και 40 μg/tube γλυκογόνο με σκοπό την λύση των κυττάρων. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης διατηρημένης στους -20°C . Μετά από καλό vortex τα δείγματα έμειναν στον πάγο για 20min και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10min στις 14.000xg στους $+4^{\circ}\text{C}$. Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 0,5ml παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10min στις 14.000xg στους $+4^{\circ}\text{C}$. Η αιθανόλη απομακρύνθηκε πλήρως και το εκχυλισθέν RNA αφέθηκε να στεγνώσει σε αποστειρωμένο περιβάλλον σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της απομόνωσης το ολικό κυτταρικό και ιϊκό RNA επαναδιαλύθηκε σε 100μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, ελεύθερου νουκλεασών και φυλάχθηκε στους -20°C .

2.2.6 Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Για την σύνθεση cDNA από το προϊόν της εκχύλισης του RNA, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Αρχικά, 5μl από το RNA επώασθηκαν με 1μl τυχαίων εκκινητών (random primers) $d(N)_9$ (Takara Biomedical group, Shiga, Japan), 1μl dNTPs 10mM και 5μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, ελεύθερου νουκλεασών στους 65°C για 5 min. Αφού τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως στον πάγο και υποβλήθηκαν σε σύντομη φυγοκέντρηση, σε καθένα απ' αυτά προστέθηκε μείγμα αποτελούμενο από: 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (first strand buffer), 2μl DTT 0,1M, 100 μονάδες αντίστροφης μεταγραφής Invitrogen Superscript II και 10 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών, RNase Inhibitor (HT Biotechnology, UK). Τέλος, προστέθηκε απεσταγμένο και

αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό (Sigma Aldrich, St Louis MO), έως τελικού όγκου 20μl. Ακολούθησε επώαση στους 25°C για 12 λεπτά, στους 42 °C για 50 λεπτά και στην συνέχεια έγινε απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με επώαση στους 70°C για 15 min.

Από τα cDNA που δημιουργήθηκαν, στη συνέχεια ενισχύθηκε ένα τμήμα που αντιστοιχεί σε ένα μέρος της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελούταν από 3μl cDNA, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Taq Buffer –Paq5000 Stratagene), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs) 10mM, 2μl εκκινητικών μορίων 25pmol, 0,5μl (2,5 unit) Paq DNA πολυμεράσης (Paq5000 Stratagene) και αποσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό (Sigma Aldrich, St Louis MO), έως τελικού όγκου 50μl.

Προηγήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95°C για 2 λεπτά και στη συνέχεια, ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών όπως παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης
TS1-HEVC9	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 40°C για 20sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 30sec } 40κύκλοι

Πίνακας 6. Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR)

Η PCR ολοκληρώθηκε με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 72°C για 5 λεπτά.

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της RT-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT-PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen, Life Technologies, Pairsley, UK) συγκέντρωσης 2% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Από το προϊόν της PCR χρησιμοποιήθηκαν 10μl, τα οποία αφού αναμίχθηκαν με 2μl χρωστικής, μεταφέρθηκαν στο πήκτωμα

αγαρόζης και αναλύθηκαν σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση ~115V. Η οπτική παρατήρηση των προϊόντων της RT-PCR στο πήκτωμα αγαρόζης έγινε μέσω συσκευής εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας (Foto/Phoresis I, Fotodyne)

2.2.7 RFLP

Κατά την μελέτη RFLP, χρησιμοποιήθηκε όγκος δείγματος DNA που αντιστοιχούσε περίπου 1μg ποσότητας DNA, το οποίο προστέθηκε σε διάλυμα που περιείχε: 2μl ρυθμιστικού 10x, 1μl (=10units) ενζύμου HhaI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό (Sigma Aldrich, St Louis MO), έως τελικού όγκου 20μl. Ακολούθησε επώαση 2 ωρών στους 37 °C και στη συνέχεια προστέθηκαν 3μl Loading Buffer 10x (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) για να τερματιστεί η αντίδραση.

Τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορήθηκαν στη συνέχεια σε πήκτωμα αγαρόζης (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK) συγκέντρωσης 3% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA) που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο σε συγκέντρωση 1μg/ml. Ολόκληρο το προϊόν της πέψης μεταφέρθηκε στο πήκτωμα αγαρόζης και ηλεκτροφορήθηκε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόστηκε τάση 70V για 2 περίπου ώρες. Το πήκτωμα στη συνέχεια φωτογραφήθηκε στην αντίστοιχη συσκευή και για τον προσδιορισμό του μεγέθους των τμημάτων χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα GelPro 4.0.

2.3 Αποτελέσματα της μελέτης RFLP

Αρχικά πραγματοποιήθηκε θεωρητική μελέτη, χρησιμοποιώντας τις αλληλουχίες των στελεχών, όπως αυτές παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Σύμφωνα με την θεωρητική αυτή μελέτη, αν πραγματοποιηθεί PCR με τα εκκινητικά μόρια TS1/HEV-C-9 και πέψη με το περιοριστικό ένζυμο HhaI, τα στελέχη των εντεροϊών του πίνακα 2, ομαδοποιούνται σε 18 ομάδες, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 6. Τα εκκινητικά μόρια αυτά έχουν την ικανότητα

να αναγνωρίζουν όλα τα στελέχη του πίνακα 2 δίνοντας ένα προϊόν μεγέθους 492 βάσεων. Ακόμη, κατά την πειραματική διαδικασία, το ζεύγος εκκινητικών μορίων TS1/HEV-C-9, ενίσχυσε επιτυχώς τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν, δίνοντας καθαρό προϊόν στο οποίο ακολούθησε ανάλυση RFLP.

Θεωρητικά αποτελέσματα της μελέτης RFLP με το περιοριστικό ένζυμο HhaI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (GCG/C)	
Μέγεθος τμημάτων περιορισμού	Στελέχη
Ομάδα 1: Άκοπα	CAV2, CAV4, CAV12 CBV1, CBV3, CBV5_Peterbourgh, CBV6 E1, E7, E12, E13, E14, E15, E17, E18, E29, E30, E31, E32, E33 EV71_California, EV88, EV83, EV82
Ομάδα 2: 456, 40	EV70
Ομάδα 3: 417, 69	CAV3, 10, 16_G-10, 16_Taiwan E11, E19, E24, EV80, EV81*, EV89*
Ομάδα 4: 353, 133	CAV20 CBV4 E9_Hill, E21, E27 EV71_Taiwan, EV101, EV79
Ομάδα 5: 377, 68, 33	EV76
Ομάδα 6: 346, 78, 62	CAV14
Ομάδα 7: 295, 72, 62, 57	E3
Ομάδα 8: 284, 130, 72	CAV8* E2 *
Ομάδα 9: 287, 200	CAV5 E20, E25 EV69, EV73, EV86, EV77
Ομάδα 10: 270, 140, 65	EV75, EV87
Ομάδα 11: 270, 220	CAV11, CAV15, CAV17, CAV18, CAV21, CAV22

	E5, E6, E16, E26 EV74, EV84, EV97, EV100
Ομάδα 12: 268, 116, 113	CAV7
Ομάδα 13: 234, 220, 43	CAV1, CAV13, CAV19, CAV24 PV1(M), PV2(L), PV1(Sabin), PV2(Sabin), EV91
Ομάδα 14: 255, 152, 45, 27	CAV6
Ομάδα 15: 211, 203, 72	CBV2 E9_Barty, EV85*
Ομάδα 16: 197, 155, 134	CBV5_Kentucky CAV9_Griggs
Ομάδα 17: 198, 155, 69, 64	E4
Ομάδα 18: 158, 134, 86, 78	PV3(L), PV3(Sabin)
*Τα στελέχη CAV8 και E2, EV81 και EV89 και ο EV85 παρουσιάζουν ίδιο προφίλ τμημάτων περιορισμού με τα άλλα μέλη της ομάδας με τα οποία κατηγοριοποιούνται, αλλά οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία κατά μήκος του γενώματος	

Πίνακας 7. Θεωρητικό προφίλ τμημάτων περιορισμού με το περιοριστικό ένζυμο HhaI

Κατά το πειραματικό μέρος της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν 53 κλινικά στελέχη εντεροϊών (πίνακας 4). Τα πειραματικά αποτελέσματα μετά από ανάλυση RFLP παρατίθενται στον πίνακα 7.

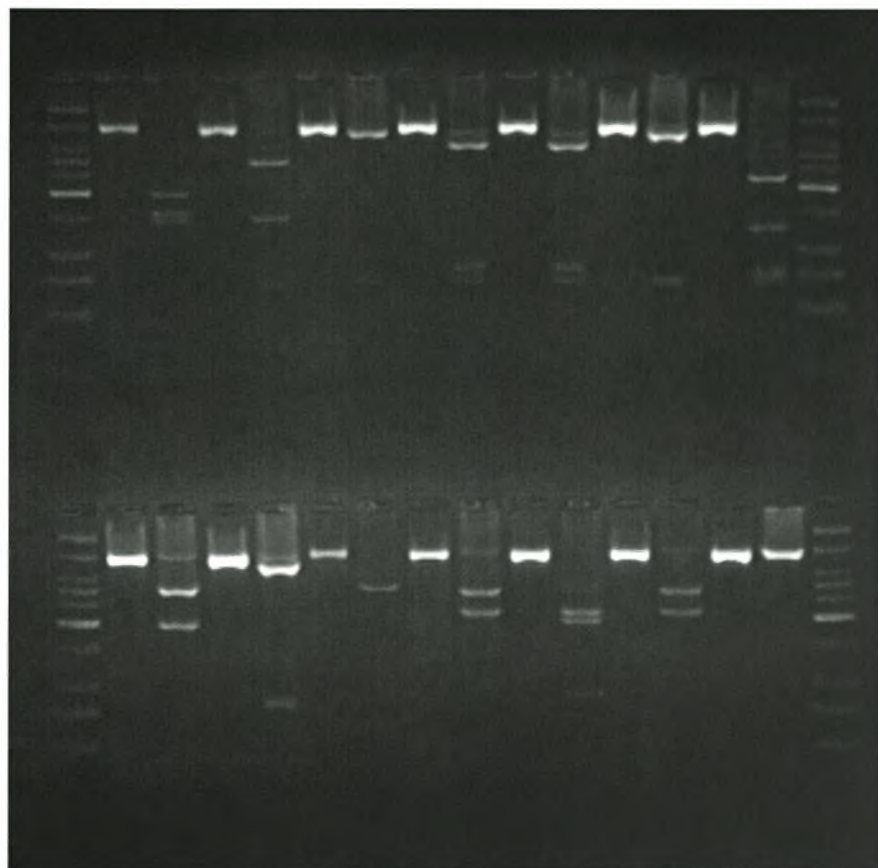
Εντεροϊός	Δείγμα	Μέγεθος τμημάτων περιορισμού (bp)	Εικόνα	Αριθμός μπάντας (άκοπο/κομμένο)
CAV9	Πρότυπο	197, 153, 139	2.3.1	2/3
	A9 611/80/1	287, 145, 69	2.3.1	4/5
	A9 65/89/1	424, 70	2.3.1	6/7
	A9 113/73/2	424, 350,85,72	2.3.1	8/9
	A9 115	424,335,83,71	2.3.1	10/11
	1	420, 69	2.3.1	12/13
	2	350, 814, 219, 129, 77, 69	2.3.1	14/15
	3	292, 189	2.3.1	B 2/3
	5	380, 81	2.3.1	B 4/5
	CAV16	Πρότυπο	άκοπο	2.3.2
5441		Άκοπο	2.3.2	B 14/15

CBV1	Πρότυπο B1 99/74/1 B1 98/74/2 B1 88/74/9	άκοπο 215, 139, 80 215, 139, 80 215, 139, 80		
CBV2	Πρότυπο B2 116/95/2 B2 118/95/1 5207 B 5211 B	211, 203, 72 211, 203, 72, 211, 203, 72, 211, 203, 72, 211, 203, 72,		
CBV3	Πρότυπο B3 109/85/1 B3 123/95/1 B3 77/78/3	άκοπο 206, 93, 79 186, 143, 85, 68	2.3.2 2.3.2 2.3.2	2/3 4/5 6/7
CBV4	Πρότυπο B4 169/75/1 B4 69/86/1	415,80 353, 133 353, 133		
CBV5	Πρότυπο B5 14/76/1 B5 254/77/1 81020 6451G	άκοπο 285, 224 363, 300, 191, 153, 147 άκοπο 449	2.3.2 2.3.2 2.3.2 2.3.2	B 2/3 B 4/5 B 6/7 B 8/9 B 10/11
CBV6	Πρότυπο B6 86/73/1 B6 7/73/19 AB-19	άκοπο 291, 128, 154 291, 220 341, 150	2.3.2 2.3.2 2.3.2	8/9 10/11 12/13 14/15
E3	Πρότυπο 138/79/1 243/97/1	300, 88, 62 277,213 217, 196, 90	2.3.1 2.3.1 2.3.1	B 6/7 B 8/9 B 10/11
E5	Πρότυπο 156/98/1	277,213 470	2.3.1 2.3.1	B 12/13 B 14/15
E6	Πρότυπο 24/79/118 Founariotakis Bledakis Tsikandilakis Fregadakis	209,192,87 209, 192, 87 209,192, 89 209,189,89 209,196,89 209, 192, 87	2.3.3 2.3.3 2.3.3 2.3.3 2.3.3 2.3.3	2/3 4/5 6/7 8/9 10/11 12/13
E7	Πρότυπο 44/73/1	274,150,73 268,147,73	2.3.3 2.3.3	B 2/3 B 4/5
E9	Πρότυπο 307/77/1 121/82/1	244,214 209, 189, 87 214, 196, 89	2.3.3 2.3.3 2.3.3	B 6/7 B 8/9 B 10/11
E11	Πρότυπο 257/98/1	485 214, 196, 87	2.3.3 2.3.3	B 12/13 B 14/15
E13	Πρότυπο 85451 86716 Pleurakis Paradakis	άκοπο 234, 214, 100 239, 219, 100 244, 224, 102 239, 219, 100	2.3.4 2.3.4 2.3.4 2.3.4	2/3 4/5 6/7 8/9 10/11
E14	Πρότυπο 1817 1729 1374	άκοπο 270, 239 262, 229 262, 234	2.3.4 2.3.4 2.3.4 2.3.4	12/13 14/15 B 2/3 B 4/5
E30	Πρότυπο 85671 86027	άκοπο 214, 200, 90 219, 196, 87	2.3.4 2.3.4 2.3.4	B 6/7 B 8/9 B 10/11

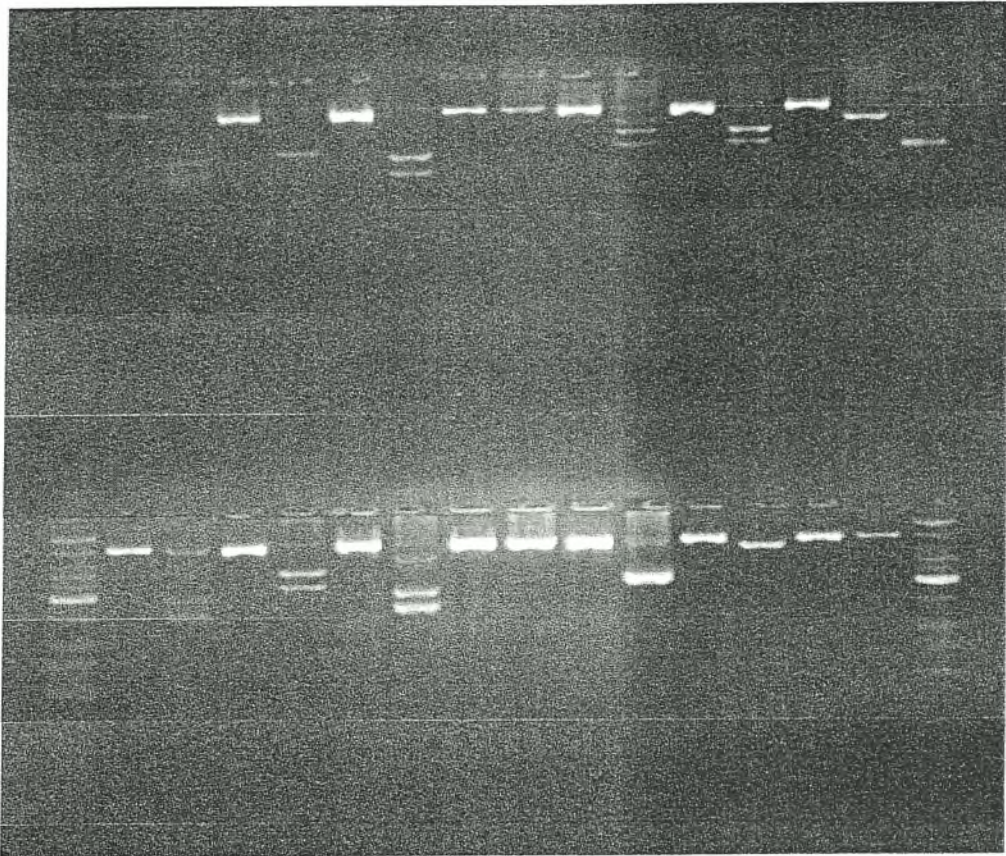
	85929	219, 191, 85	2.3.4	B 12/13
--	-------	--------------	-------	---------

Πίνακας 8. Πειραματικό προφίλ τμημάτων περιορισμού με το περιοριστικό ένζυμο HhaI σε κλινικά δείγματα. Στην τελευταία στήλη, όπου προηγείται το γράμμα «B» ο αναγνώστης παραπέμπεται στην δεύτερη σειρά μπαντών στην αντίστοιχη φωτογραφία.

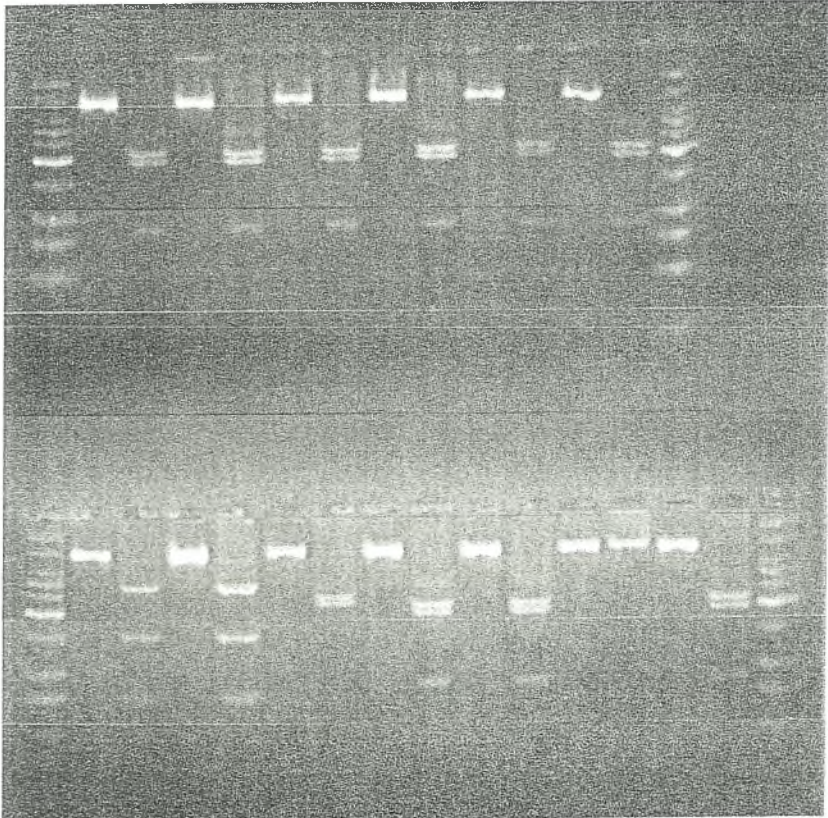
Εικ. 2.3.1

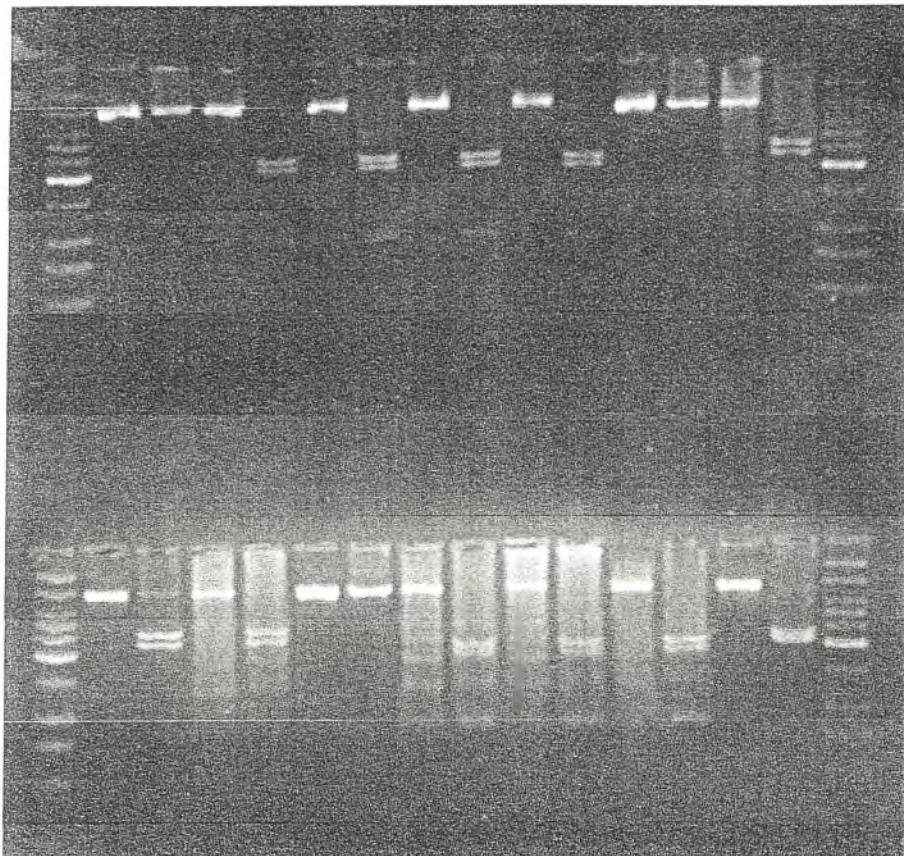


Εικ. 2.3.2



Εικ. 2.3.3





Etik. 2.3.4

3. Συζήτηση

Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ 5'-UTR ΚΑΙ ΤΟ ΖΕΥΓΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ TS1/HEVC9

Η παρούσα εργασία αποτέλεσε το τελικό στάδιο για να καταρτιστεί ένα πρωτόκολλο κατηγοριοποίησης των 64 οροτύπων των εντεροϊών σε 12 κατηγορίες με βάση την 5'-UTR περιοχή έτσι ώστε να είναι ευκολότερη η προσεγγιστική διάγνωσή τους σε ασθενείς. Για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε η 5'-UTR διότι περιέχει συντηρημένες περιοχές οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση όλων των εντεροϊών (Romero J. R., 1999). Ακόμη, παρ' όλο που η ενδο-οροτυπική ποικιλότητα στην 5'-UTR είναι τόσο μεγάλη και δεν μπορεί να υπάρξει σαφής αντιστοίχιση μεταξύ της 5'-UTR και του ορότυπου (Oberste et al., 1999 / Mulders et al., 2000), πραγματοποιώντας ανάλυση RFLP, θα μπορούσε να γίνει ομαδοποίηση των στελεχών των εντεροϊών (Siafakas et al., 2002 / Siafakas et al., 2003). Αξίζει να σημειωθεί στο σημείο αυτό μια σημαντική «παράπλευρη» ανακάλυψη. Φαίνεται πως η χρήση της συγκεκριμένης περιοχής του ιικού γενώματος μας οδήγησε στο να δημιουργήσουμε το ζεύγος εκκινήτων TS1/HEVC9 το οποίο παρουσιάζει τη μεγαλύτερη εξειδίκευση συνολικά για το γένος των εντεροϊών από κάθε άλλο ζεύγος εκκινήτων που αναφέρεται μέχρι σήμερα στην παγκόσμια βιβλιογραφία.

Η ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΣΕ ΟΜΑΔΕΣ ΚΑΤΑ ΤΟ ΠΡΟΤΥΠΟ RFLP

Σύμφωνα με τη θεωρητική μελέτη, τα στελέχη του πίνακα 2, διαχωρίζονται σε 18 ομάδες, μετά από ανάλυση RFLP με το περιοριστικό ένζυμο HhaI, όπως φαίνεται στον πίνακα 6. Από αυτές τις ομάδες, είναι αρκετές που περιέχουν λίγα στελέχη (ένα ή δύο ή τρία), με αποτέλεσμα να μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός. Η κάθε ομάδα περιλαμβάνει στελέχη τα οποία δίνουν ίδια μήκη τμημάτων περιορισμού μετά από ανάλυση RFLP.

Ωστόσο όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα 7 δεν υπάρχει πλήρης αντιστοιχία μεταξύ των θεωρητικώς αναμενόμενων

αποτελεσμάτων RFLP, των πρότυπων στελεχών και των κλινικών. Μόνο για λίγα στελέχη εντεροϊών υπάρχει συμφωνία των προτύπων κοπής μεταξύ θεωρητικού-προτύπου-κλινικού τα οποία παρατίθενται στον πίνακα 9. Αυτό σε μεγάλο βαθμό συνέβη επειδή μια σειρά από κλινικά δείγματα περιείχαν περισσότερα του ενός ιικού στελέχους (μόλυνση των ασθενών από 2 ή 3 διαφορετικούς εντεροϊούς). Για να χωριστούν λοιπόν πλήρως τα 64 στελέχη σε 12 ομάδες απαιτείται ο καθαρισμός των δειγμάτων και η απομόνωση του κάθε ιικού στελέχους χωριστά.

Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης RFLP με το περιοριστικό ένζυμο HhaI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (GCG/C)		
Μέγεθος τμημάτων περιορισμού	Πρότυπα Στελέχη	Κλινικά Στελέχη
Ομάδα 1: Άκοπα	CAV16	5441
Ομάδα 2: 211, 203, 72	CBV2	B2 116/95/2 B2 118/95/1 5207 B 5211 B
Ομάδα 3: 209, 192, 87	E6	24/79/118 Founariotakis Bledakis Tsikandilakis Fragadakis
Ομάδα 4: 274, 150, 73	E7	44/73/1

Πίνακας 9. Ομαδοποίηση κλινικών στελεχών που έχουν ίδιο πρότυπο με RFLP με το αντίστοιχο πρότυπο στέλεχος και το θεωρητικός αναμενόμενο.

Μέχρι το πέρας της διαδικασίας του καθαρισμού και επανομαδοποίησης των κλινικών στελεχών η πειραματική διαδικασία έφερε στο φως και άλλα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Μια σειρά στελεχών τα οποία σύμφωνα με το πρότυπο RFLP δεν ομαδοποιούνται μαζί με τα πρότυπα φαίνονται να προέρχονται από την ίδια γεωγραφική τοποθεσία ή την ίδια χρονική περίοδο. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 10.

**Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης RFLP με το περιοριστικό ένζυμο
HhaI (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (GCG/C)**

Κλινικά Στελέχη	Μέγεθος τμημάτων περιορισμού	Προέλευση	Έτος απομόνωσης
B1 99/74/1	215, 139, 80	Cantacuzino Institute, Romania	1974
B1 98/74/2	215, 139, 80	Cantacuzino Institute, Romania	1974
B1 88/74/9	215, 139, 80	Cantacuzino Institute, Romania	1974
B4 169/75/1	353, 133	Cantacuzino Institute, Romania	1986
B4 69/86/1	353, 133	Cantacuzino Institute, Romania	
E9 307/77/1	209, 189, 87	Romania	1977
E9 121/82/1	214, 196, 89	Romania	1982
E13 85451	234, 214, 100	Greece	2001
E13 86716	239, 219, 100	Greece	2001
E13 Pleurakis	244, 224, 102	Greece	2001
E13 Papadakis	239, 219, 100	Greece	2001
E14 1817	270, 239	Greece	1980
E14 1729	262, 229	Greece	1980
E14 1374	262, 234	Greece	1980
E30 85671	214, 200, 90	Greece	2001
E30 86027	219, 196, 87	Greece	2001
E30 85929	219, 191, 85	Greece	2001

Πίνακας 10. Ομαδοποίηση κλινικών στελεχών τα οποία δεν έχουν όμοιο πρότυπο RFLP με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη και τα θεωρητικώς αναμενόμενα αποτελέσματα.

Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι έχουμε τη δυνατότητα να διαπιστώσουμε ιικές μολύνσεις που οφείλονται στην ίδια επιδημία. Η δυνατότητα αυτή αφενός μας επιτρέπει αφενός να παρατηρούμε την εξέλιξη των ιών και την πρόκληση επιδημιών και αφετέρου να προσεγγίζουμε θεραπευτικά τους ασθενείς με παρόμοια φαρμακευτική αγωγή εφόσον διαπιστωθεί ότι αυτή είναι αποτελεσματική στη συγκεκριμένη επιδημία.

ΓΕΝΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

Η μελέτη του μήκους τμημάτων περιορισμού στην 5'-μη κωδική περιοχή παραμένει ως ένας πιθανός γρήγορος τρόπος ομαδοποίησης και προσεγγιστικής ταυτοποίησης των εντεροϊών. Οι θέσεις που αναγνωρίζονται από τα ένζυμα περιορισμού φαίνεται να εντοπίζονται σε συγκεκριμένα σημεία και δεν είναι τυχαία κατανομημένες, για τα διάφορα στελέχη. Παρόλα αυτά,

καλό θα ήταν να χρησιμοποιηθούν περισσότερα πρότυπα και κλινικά στελέχη για να υποστηριχθεί αυτή η άποψη. Επιπλέον, ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από την χρήση διαφορετικών ενζύμων περιορισμού, θα μπορούσε να αυξήσει την ειδικότητα της μεθόδου παρέχοντας ακόμη και ικανότητα εξειδικευμένης ταυτοποίησης αρκετών στελεχών.

4. Βιβλιογραφία

Kottaridi C, Bolanaki E, Siafakas N, Markoulatos P, 2005, Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification, *Diagn Microbiol Infect Dis*, Vol.53(2), p.113-119

Siafakas Nikolaos, Panayotis Markoulatos, Constantin Vlachos, Glyn Stanway, Georgina Tzanakaki, Jenny Kourea-Kremastinou, 2003, Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay, *Molecular and Cellular Probes*, Vol.17, p.113-123

Siafakas Nikolaos, Dimitrios Papaventsis, Stamatina Levidiotou-Stefanou, Nicholas C. Vamvakopoulos & Panayotis Markoulatos, 2005, Classification and Structure of Echovirus 5'-UTR Sequences, *Virus Genes*, Vol.31(3), p.393-306

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

Tuija Poyry, Leena Kinnunen, Timo Hyypia, Betty Brown, Christine Horsnell, Tapani Hovi and Glyn Stanway 4, Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses, 1996

Glyn Stanway, Structure, function and evolution of picornaviruses, *Journal of General Virology* (1990)

Jing-Yi Lin, Mei-Ling Li, Peng-Nien Huang, Kun-Yi Chien, Jim-Tong Horng and Shin-Ru Shih, Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication, *Journal of General Virology* (2008)

JONATHAN B. ROHLL, NEIL PERCY, REBECCA LEY, DAVID J. EVANS, JEFFREY W. ALMOND, AND WENDY S. BARCLAY, The 5'-Untranslated Regions of Picornavirus RNAs Contain Independent Functional Domains Essential for RNA Replication and Translation, *JOURNAL OF VIROLOGY*, JULY 1994

Elaine Hendry, Hideki Hatanaka, Elizabeth Fry, Michael Smyth, John Tate, Glyn Stanway, Juhana Santti, Marita Maaronen, Timo Hyypiä and David Stuart, The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses, © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

M. Steven Oberste, Kaija Maher, Mark A. Pallansch, Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2, *Virus Research* 58 (1998)

Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch. 1999. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948.

Oberste M. Steven, Kaija Meher, Mary R. Flemister, George Marchetti, David R. Kilpatrick, and Mark A. Pallansch, 2000, Comparison of Classic and Molecular Approaches for the Identification of Untypeable Enteroviruses, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 38(3), p.1170-1174

Oberste M. Steven, David Schnurr, Kaija Maher, Suleiman al-Busaidy, Mark A. Pallansch, 2001, Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype, *Journal of General Virology*, Vol. 82, p.409-416

Oberste M. Steven, Suzanne M. Michele, Kaija Maher, David Schnurr, Daniel Cisterna, Nina Junttula, Moyez Uddin, Jean-Jacques Chomel, Chi-Shan Lau, Walid Ridha, Suleiman al-Busaidy, Helene Norder, Lars O. Magnius, Mark A. Pallansch, 2004a, Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75, *Journal of General Virology*, Vol.85, p.3205-3212

Oberste M. Steven, Kaija Maher, David Schnurr, Mary R. Flemister, Judith C. Lovchik, Heather Peters, Wendy Sessions, Carol Kirk, Nando Chatterjee, Susan

Fuller, J. Michael Hanauer and Mark A. Pallansch, 2004b, Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses, *Journal of General Virology*, Vol.85, p.2577-2584

Oberste M. Steven, Kaija Maher, Suzanne M. Muchele, Gael Belliot, Moyez Uddin, Mark A. Pallansch, 2005, Enteroviruses 76, 89, 90, 91, represent a novel group within the species Human enterovirus A, *Journal of General Virology*, Vol.86, p.445-451

Oberste M. Steven, Kaija Maher, Alford J. Williams, Naomi Dybdahl-Sissoko, Betty A. Brown, Michelle S. Gookin, Silvia Panaranda, Nada Mishrik, Moyez Uddin and Mark A. Pallansch, 2006, Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses, *Journal of General Virology*, Vol.87, p.119-128

Oberste M. Steven, Kaija Maher, William A. Nix, Suzanne M. Michele, Moyez Uddin, Dabid Schnurr, Suleiman al-Busaidy, Chantal Akoua-Koffi, Mark A. Pallansch, 2007, Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species *Human Enterovirus B*, *Virus Research*, Vol.128, p.34-42

Abraham, R., T. Chonmaitree, J. McCombs, B. Prabhakar, P.T. Lo Verde, and P.L. Ogra. 1993. Rapid detection of poliovirus by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification: application for differentiation between poliovirus and nonpoliovirus enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 31: 395-399.

Hyypiä T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, Kinnunen L, Stanway G. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Sep 15;89(18):8847-51

Zhu JP, Xu ZG, Chen H, Zhang X, Fan DY, Wang J. Primary detection of pathogen from children with hand, foot, and mouth disease in Beijing, 2007, *Bing Du Xue Bao.* 2009 Jan;25(1):23-8. Chinese.

Rueckert R.R. Picornaviruses and their replication. In *Virology*, New York, Raven Press (ed. B.N. Fields) 1985:705-738

King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. (2000). Picornaviridae. In "Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses" (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego.

T. Hyypiä and G. Stanway, Biology of coxsackie A viruses, *Adv. Virus Res* 42 (1993), pp. 343-373

M. Smyth, J. Hall, E. Fry, D. Stuart, G. Stanway and T. Hyypiä, Preliminary crystallographic analysis of coxsackievirus A9, *J. Mol. Biol* 230 (1993)

Eng Lee Tan, Li Li Gaynor Yong, Seng Hock Quak, Wei Cheng Andrea Yeo, Vincent Tak Kwong Chow and Chit Laa Poh, Rapid detection of Enterovirus 71 by real-time TaqMan RT-PCR, *Journal of Clinical Virology* Volume 42, Issue 2, June 2008, Pages 203-206

M.S. Oberste, W.A. Nix, K. Maher and M.A. Pallansch, Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing, *J Clin Virol* 26 (2003), pp. 375-377.

Lai K. Kay-Yin, Linda Cook, Sharon Wendt, Lawrence Corey, and Keith R. Jerome, 2003, Evaluation of Real-Time PCR versus PCR with Liquid-Phase Hybridization for Detection of Enterovirus RNA in Cerebrospinal Fluid, *Journal of clinical microbiology*, Vol.41(7), p.3133-3141

Muir Peter, Ulrike Kämmerer, Klaus Korn, Mick N. Mulders, Tuija Pöyry, Benedikt Weissbrich, Reinhard Kandolf, Graham M. Cleator, and Anton M. van Loon for The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis, *Molecular Typing of Enteroviruses: Current Status and Future Requirements*, *Clin Microbiol Rev.* 1998 January; 11(1): 202-227

Jawhar Gharbi, Thomas Bourlet, Jean-Luc Bailly, Odette G. Gaudin, Mahjoub Aouni, Bruno Pozzetto. Variations in the recognition of echovirus type 11 strains by a group-specific anti- P1 monoclonal antibody *Journal of Clinical Virology*, Volume 14, Issue 1, September 1999, Pages 1-8

Tiina Rekand, Rune Male, Andreas O. Myking, Svein J. T. Nygaard, Johan A. Aarli, Lars Haarr, Nina Langeland, Detection of viral sequences in archival spinal cords from fatal cases of poliomyelitis in 1951–1952 *Journal of Virological Methods*, Volume 114, Issue 1, December 2003, Pages 91-96

Allyn Spear, Nidhi Sharma, James Bert Flanagan, Protein–RNA tethering: The role of poly(C) binding protein 2 in poliovirus RNA replication *Virology*, Volume 374, Issue 2, 10 May 2008, Pages 280-291

Lynn S. Silvestri, Jessica M. Parilla, B. Joan Morasco, Sushma A. Ogram, James B. Flanagan, Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the 3' poly(A) tail *Virology*, Volume 345, Issue 2, 20 February 2006, Pages 509-519

