

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Χριστίνα Α. Κοτταρίδη

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ
ΤΩΝ ΕΧΘΟ ΙΩΝ

2007

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΗΝΑΣ ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ

Καθηγητής Μικροβιολογίας εκτός Ιατρικής Μικροβιολογίας

Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΝΙΚΟΣ ΚΑΤΗΣ

Καθηγητής Ιολογίας Φυτών

Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ

Καθηγητής Μικροβιολογίας

Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Χριστίνα Α. Κοτταρίδη

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ
ΤΩΝ ΕΧΘΟ ΙΩΝ**

*στους γονείς μου
στο γιο μου
στο σύζυγό μου*

Χριστίνα Α. Κοτταρίδη

2007

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ
ΤΩΝ ΕΧΟ ΙΩΝ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

Αριθμός προκαταρτικών σελίδων: 10

Συνολικός αριθμός σελίδων: 222

Αριθμός πινάκων: 12

Αριθμός εικόνων: 41

Αριθμός παραρτημάτων: 3

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 333

ΣΥΝΟΨΗ

Η οικογένεια των Picorna ιών αποτελείται από 6 γένη τα οποία συγκεντρώνουν μικρούς μη ελυτροφόρους RNA-ιούς θετικής πολικότητας με αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο στελέχη. Οι Echo ιοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών το οποίο είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και αποτελείται από 64 ορότυπους. Οι ορότυποι αυτοί σήμερα ταξινομούνται με βάση μοριακά και βιολογικά δεδομένα στα παρακάτω πέντε είδη: (i) PV (πολιοϊοί 1-3), (ii) HEV-A (CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 και EV71), (iii) HEV-B (CAV9, CBV1-6, όλοι οι echo ιοί και ο EV69), (iv) HEV-C (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22 και CAV24) και (v) HEV-D (EV68 και EV70). Το γονιδίωμα όλων των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7,4-7,5 Kb. Στους εντεροϊούς, διακρίνονται από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), στην οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF), μήκους περίπου 2100 κωδικονίων, από το οποίο κωδικοποιείται μια πολυπρωτεΐνη, που στη συνέχεια πρωτεολύεται από ικές πρωτεάσες για να προκύψουν οι δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού και τέλος μία 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), που καταλήγει σε πολυαδενυλιωμένη ουρά - περιοχή (poly-A tract). Η P1 περιοχή της πολυπρωτεΐνης κωδικοποιεί για τις δομικές-καψιδιακές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1, και ακολουθούν η πρωτεάση 2A^{pro} και οι πρωτεΐνες 2B και 2C (συμμετέχουν στην αντιγραφή του RNA) που κωδικοποιούνται από την P2 περιοχή. Τέλος η P3 περιοχή περιλαμβάνει την πρωτεΐνη 3AB, την ική πρωτεάση 3C^{pro} και την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}.

Οι κλασσικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού μέσω κυτταροκαλλιέργειας, και στην εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντιορούς. Η ορολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών, ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών σε κλινικά δείγματα και χρησιμοποιείται επιτυχώς για να ανιχνεύσει και αυτούς τους οροτύπους που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε

κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη.

Σκοπός της παρούσας μελέτης υπήρξε, αρχικά, η ανάλυση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος των Echo ιών (προτύπων και κλινικών στελεχών) από άποψη καταλληλότητας για τη διάγνωση αυτών. Στη συνέχεια, κάποιες από τις περιοχές των κλινικών στελεχών, που πολλαπλασιάστηκαν με την χρήση ειδικών εκκινητών, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πρωτοταγή τους διάταξη. Με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής, επιχειρήθηκε η νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη των αλληλουχημένων γενετικών περιοχών, με στόχο τη διερεύνηση των σχέσεων, που επικρατούν τόσο μεταξύ των κλινικών όσο και μεταξύ κλινικών και προτύπων στελεχών σε δομικές (VP1) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3D) περιοχές του γενώματος του ιού. Αποδείχθηκε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση του γονότυπου με τον ορότυπο τόσο στο 5' όσο και στο 3' άκρο του γονιδίου VP1 η οποία διακόπτεται στα γειτονικά μη-δομικά γονίδια, ενώ όσο η αλληλούχιση προχωρά προς το 3' τμήμα του γενώματος των Echo ιών, τόσο τα κλινικά στελέχη απομακρύνονται εξελικτικά από τα πρότυπα και παρουσιάζουν ενδείξεις ανασυνδυασμού με άλλα κλινικά τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα τοπολογικά και χρονικά.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον αναπληρωτή καθηγητή Ζήση Μαμούρη και στον επίκουρο καθηγητή Κων/νο Σταθόπουλο που με τίμησαν δεχόμενοι να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή αυτής της διατριβής καθώς επίσης και στα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή Νίκο Κατή, τον καθηγητή Μηνά Αρσενάκη, τον καθηγητή Αντώνη Μανιάτη και τον αναπληρωτή καθηγητή Δημήτρη Κουρέτα.

Ένα θερμό ευχαριστώ στους συναδέλφους μου Ελένη Παξιμάδη, Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου, Βαγγέλη Δεδεψίδη Ελίνα Χορευτή και Γιάννη Καρακασιλιώτη για το ιδιαίτερα φιλικό κλίμα στο χώρο εργασίας όπου μοιραστήκαμε ευχάριστες αλλά και δύσκολες στιγμές.

Ιδιαίτερος ευχαριστώ τη συνάδελφό μου Ευγενία Μπολανάκη για την άψογη συνεργασία, την εποικοδομητική ανταλλαγή απόψεων και τη φιλία που αναπτύξαμε καθώς μοιραστήκαμε κοινές ανησυχίες καθόλο το διάστημα της εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής.

Ευχαριστώ θερμά τον αναπληρωτή καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτο που ως επιβλέπων της παρούσας διατριβής καταρχήν με εμπιστεύτηκε. Χωρίς τη δική του πολύτιμη καθοδήγηση, το αληθινό ενδιαφέρον, την έμπνευση, την κατανόηση και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις, ο αγώνας για την τελέσφορη εκπόνηση αυτής της διατριβής πιθανόν να μην ήταν επιτυχής. Τον ευχαριστώ επιπλέον για την ευγένεια του χαρακτήρα του που για μένα ήταν ιδιαίτερα σημαντική στην καθημερινή μας συνεργασία.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Ανδρέα και Παναγιώτα, που δεν έχουν σταματήσει λεπτό να με στηρίζουν και να με εμπυχώνουν. Ιδιαίτερος τους ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά την περίοδο της συγγραφής της παρούσας διατριβής. Στο σύζυγό μου Μανώλη Πετράκη, μεγάλο ευχαριστώ για την αγάπη, την υπομονή, τη συμπαράσταση και την προτροπή να γίνομαι καλύτερη και να εμβαθύνω με όλη μου τη δύναμη σε κάθε τι που μου ανατίθεται.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A1. Γενικά χαρακτηριστικά των εντεροϊών.....	1
A1.1. Ταξινόμηση.....	1
A1.2. Δομή-λειτουργία.....	3
A1.2.1. Δομή Καψιδίου.....	5
A1.2.2. Δομικές Πρωτεΐνες.....	6
A1.2.3. Λειτουργικές Πρωτεΐνες.....	11
A1.2.3.1 Η πολυμεράση 3D.....	12
A1.2.3.2. Η λειτουργική πρωτεΐνη 2C.....	13
A1.2.3.3. Οι Πρωτεάσες 3C και 2A.....	14
A1.2.3.4. Γενικά περί πρωτεόλυσης.....	17
A1.2.3.5. Η πρωτεΐνη VPg.....	18
A1.2.3.6 Οι λειτουργικές πρωτεΐνες 2B και 3A.....	18
A1.2.4. Οργάνωση Γονιδιώματος.....	22
A1.2.4.1. Η 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR).....	23
A1.2.4.2. Η 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR).....	29
A1.3. Υποδοχείς των εντεροϊών.....	30
A1.4. Κύκλος ζωής των εντεροϊών.....	35
A1.4.1. Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς είσοδος στα κύτταρα και ξεδίπλωμα των ιών.....	35
A1.4.2. Μετάφραση του ιϊκού RNA.....	38
A1.4.3. Επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης.....	39
A1.4.4. Αντιγραφή του γενόματος και σύνθεση του νέου ιϊκού mRNA.....	41
A1.4.5. Σχηματισμός του καψιδίου.....	43
A1.4.6. Αποτελέσματα του ιϊκού πολλαπλασιασμού στο κύτταρο ξενιστής.....	44
A2. Επιπτώσεις των εντεροϊών στην υγεία.....	47
A2.1. Παθογένεια.....	47
A2.2. Ανοσολογική απόκριση.....	47
A2.3. Θεραπεία.....	48
A2.4. Επιδημιολογία και μοριακή επιδημιολογία των εντεροϊών.....	49
A3. Διάγνωση των εντεροϊών.....	51
A4. Εξέλιξη των εντεροϊών.....	55
A4.1. Η εξέλιξη στους πολιοϊούς.....	55
A4.1.1. Οι μεταλλάξεις στους πολιοϊούς.....	55
A4.1.2. Ο ανασυνδυασμός στους πολιοϊούς.....	56
A4.1.3. Ανασυνδυασμοί πολιοϊών in vivo.....	59
A4.2. Ο ανασυνδυασμός στους μη – πολιο – εντεροϊούς.....	61
A4.3. Ένα νέο μοντέλο στη γενετική των εντεροϊών.....	63
A5. Σκοπός της διατριβής.....	65

Κεφάλαιο 2

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. Πειραματικά στελέχη.....	66
B1.1. Πρότυπα στελέχη.....	66
B1. 2. Κλινικά στελέχη	68
B2. Επεξεργασία κλινικών δειγμάτων.....	71
B2.1. Επεξεργασία κοπράνων.....	71
B3. Κυτταροκαλλιέργειες.....	72
B3. 1. Απόψυξη των κυττάρων.....	74
B3.2. Αναδιπλασιασμοί κυτταροκαλλιεργειών.....	74
B3.3. Απομόνωση εντεροϊών σε καλλιέργειες κυττάρων Rd, L ₂₀ -B, Vero και Hep-2	76
B4. Διαδοχικές αραιώσεις μολυσμένων κυττάρων	77
B5. Ταυτοποίηση εντεροϊών με δεξαμενές ειδικών αντιορών	78
B6. Εκχύλιση	80
B7. Εκκινητές	81
B8. Αντίστροφη Μεταγραφή	83
B9. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-PCR	84
B9.1. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της RT - PCR σε αгарόζη	85
B9.2. Καθαρισμός των προϊόντων της PCR – προσδιορισμός πρωτοταγούς διάταξης	86
B10. Νουκλεοτιδική και φυλογενετική ανάλυση	87
B10.1. Διόρθωση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών	87
B10.2. Εύρεση νουκλεοτιδικής ομοιότητας	88
B10.3. Στοιχίση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων (clustalW - clustalX)	91
B10.4. Κατασκευή φυλογενετικών δέντρων (clustalX – phylip)	94
B10.5. Αξιολόγηση φυλογενετικών δέντρων (clustalX – philip)	95
B10.6. Απεικόνιση φυλογενετικών δέντρων (treeview).....	96
B10.7. Ποσοστιαία μελέτη νουκλεοτιδικής ομολογίας (mega).....	96
B10.8. Ανάλυση ανασυνδυασμών.....	98

Κεφάλαιο 3

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ενίσχυση γενωμικών περιοχών των echo ιών με διαφορετικά πρωτόκολλα RT-PCR.....	102
3.2. Αξιολόγηση της οροεξουδετέρωσης και των μοριακών τεχνικών διάγνωσης για την ταυτοποίηση των echo ιών.....	105
3.3.Μοριακή φυλογένεια των γονιδίων VP1, 2A και 2B κλινικών στελεχών echo ιών:επιδημιολογική συσχέτιση και παρατηρήσεις επί της γενετικής ποικιλομορφίας.....	111
3.4. Αναζήτηση εξελικτικών σχέσεων και πιθανών ανασυνδυασμών στο 3' άκρο του γονιδιώματος των echo ιών.....	119

Κεφάλαιο 4

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	124
-------------------------	------------

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	137
ΣΤ. ABSTRACT	138
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	140
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	171
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	175
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	176

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι Echo ιοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών, οι οποίοι με τη σειρά τους κατατάσσονται στην οικογένεια Picornaviridae. Η ονομασία αυτής της οικογένειας ιών προέρχεται από το λατινική λέξη Pico (πολύ μικρό) και τη λέξη RNA και, κατ' αυτόν τον τρόπο, συνιστά μία μεγάλη ομάδα μικροσκοπικών ιών με μονόκλωνο, RNA γενετικό υλικό, θετικής πολικότητας, χωρίς στάδιο DNA (Rueckert, 1985). Οι Picorna ιοί ανήκουν στους περισσότερο ποικιλόμορφους (πάνω από 200 ορότυποι) και από παλαιότερα γνωστούς ιούς (οι πρώτες αναφορές προέρχονται από την Αίγυπτο γύρω στο 1400 π.Χ.). Ένας από τους πρώτους Picorna ιούς που ταυτοποιήθηκε από τους Loeff και Frosch (1898) ήταν ο ιός FMDV (Foot and Mouth Disease Virus). Η πολυομελίτιδα αναγνωρίστηκε ως ιική νόσος το 1909 από τους Landsteiner και Popper, παρότι ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά αρκετά αργότερα, στη δεκαετία του 1930. Οι Echo ιοί (από τα αρχικά των λέξεων *Enteric Cytopathic Human Orphan*) απομονώθηκαν αρχικά το 1951 από τα κόπρανα ενός ασυμπτωματικού ασθενούς και αποτελούν την μεγαλύτερη υπο-ομάδα με 28 οροτύπους.

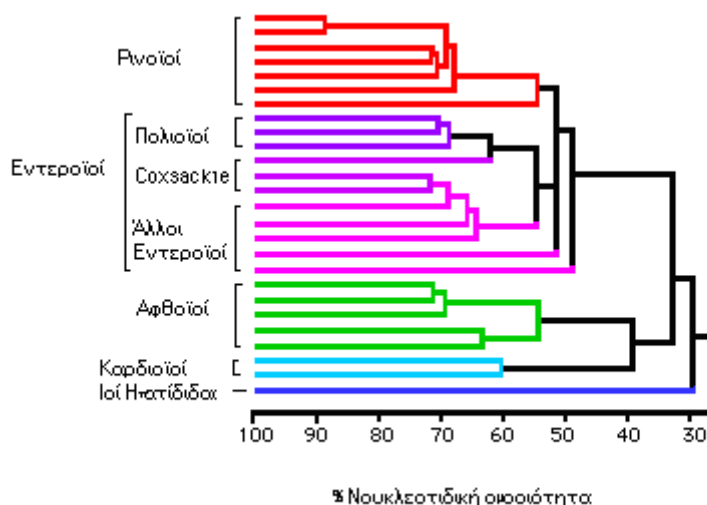
A1. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

A1.1. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η οικογένεια των Picorna ιών περιλαμβάνει 230 οροτύπους, οι οποίοι ομαδοποιούνται σε εννέα γένη ιών (Pringle, 1999) με βάση τη διαφοροποίηση, την οποία παρουσιάζουν στα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά, στους ξενιστές και στα όργανα που προσβάλλουν, καθώς και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (π.χ στην ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και την επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους - pH). Σύμφωνα, λοιπόν, με αυτές τις διαφοροποιήσεις, διακρίνονται τα γένη των Εντεροϊών (Enterovirus), των Ρινοϊών (Rhinovirus - ιοί του απλού κρυολογήματος), των ιών της Ηπατίτιδας Α (Hepatovirus), των Καρδιοϊών (Cardiovirus), των Παρεκοϊών (Parechovirus) και των Κομπουϊών (Kobuvirus), τα οποία παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια καθώς και τα τρία γένη των Ερμποϊών (Erbovirus), των Αφθοϊών

(Arhthovirus) και των Τεσκοϊών (Teschovirus), τα οποία δεν παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Τέλος, χωριστά από τα παραπάνω γένη κατατάσσονται εκείνα των μη ταυτοποιημένων Picorna ιών και των περιβαλλοντικών δειγμάτων (King et al., 2000).

Αρχικά, το γένος των εντεροϊών, με βάση την παθογένειά των μελών του στον άνθρωπο και σε πειραματικά ζώα, χωρίστηκε σε τέσσερα είδη: το είδος των Πολιοϊών, των Coxsackie A και B ιών και το είδος των Echo ιών (Committee on the Enteroviruses, 1957). Στη συνέχεια, με τη χρήση ειδικών αντιορών, αυτά τα είδη χωρίστηκαν επιπρόσθετα σε 64 αντιγονικά διακριτούς οροτύπους (Πολιοϊοί 1-3, Coxsackie A ιοί 1-24, Coxsackie B ιοί 1-6 και Echo ιοί 1-33) («Fields Virology», Melnick J.L., 1996). Ωστόσο, μετέπειτα αναλύσεις της πρωτοταγούς διάταξης των Echo ιών 22 και 23 έδειξαν, ότι αυτοί οι ιοί διαθέτουν σημαντικά χαρακτηριστικά, που τους διαχωρίζουν από τους υπόλοιπους ιούς του γένους των εντεροϊών. Συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται από μεγάλη διαφοροποίηση της πρωτοταγούς οργάνωσης του γονιδιώματός τους και ιδιαίτερα του τμήματος, που αφορά στις πρωτεΐνες του καψιδίου. Έτσι, οι Echo 22 και 23 αναταξινομήθηκαν ως ένα νέο γένος, αυτό των Parecho ιών 1 και 2 αντίστοιχα (Joki-Korpela and Hyypria, 2001).

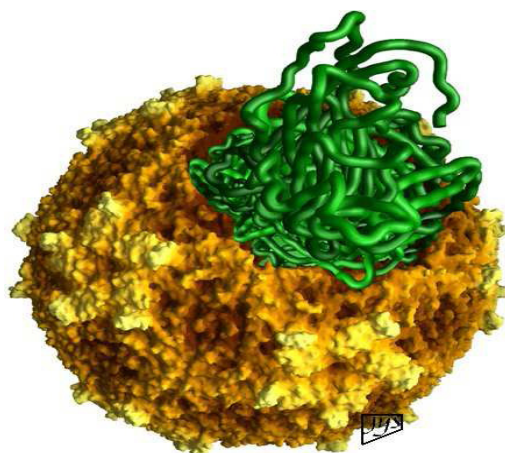


Με την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών, η γενωμική ανάλυση διαδέχτηκε την οροταυτοποίηση, ως μέσο ανίχνευσης και ταξινόμησης των εντεροϊών. Το 1999, η αναταξινόμηση των εντεροϊών με βάση την πρωτοταγή τους οργάνωση (νουκλεοτιδική και αμινοξική) έγινε αποδεκτή από την Διεθνή Κοινότητα Ταξινόμησης Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV). Σύμφωνα, λοιπόν, με τα

σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των εντεροϊών χωρίζεται σήμερα σε 8 είδη (King et al., 2000). Από αυτά, τα πέντε (Poliovirus, και Human Enterovirus A – D) παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Βάσει αναλύσεων της πρωτοταγούς τους δομής και της VP1 περιοχής τους οι 65 ορότυποι, που αποτελούν το σύνολο των ανθρώπινων εντεροϊών, διανέμονται στα είδη που προαναφέρθηκαν ως εξής. Το είδος A (HEVA) αποτελείται από τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και από τον εντεροϊό 71. Το είδος B (HEVB) περιλαμβάνει όλους τους Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21, E24-E27, E29-E33), τον Coxsackie A9 και τους Εντεροϊούς 69 και 73 (EV69, EV73) (Oberste et al., 2001). Το είδος C (HEVC) αποτελείται αποκλειστικά από Coxsackie A ιούς και συγκεκριμένα από τους A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24. Τέλος, το είδος D περιλαμβάνει τους πρόσφατα ταυτοποιημένους ιούς EV68 και EV70, ενώ το είδος των πολιοϊών περιλαμβάνει τους πολιοϊούς Polio 1-3.

Ο διαχωρισμός των πολιοϊών από τους εντεροϊούς του είδους C βασίζεται στην ικανότητά τους να προκαλούν πολιομυελίτιδα, διαφορετικά οι πολιοϊοί παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τους ιούς αυτού του είδους. Μάλιστα, πρόσφατες μελέτες (Brown et al., 2003) συστήνουν, ότι οι πολιοϊοί θα έπρεπε να αναταξινομηθούν και να συμπεριληφθούν στο είδος C των εντεροϊών. Γενικότερα η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς αναβαθμίζεται εξαιτίας της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων (Enterovirus 74-75 - Oberste et al., 2004a και Enterovirus 77-78 - Norder et al., 2003), ενώ ακόμη και σήμερα, υπάρχει ένας ικανοποιητικός αριθμός στελεχών, τα οποία φέρουν τον τίτλο «μη ταυτοποιημένα».

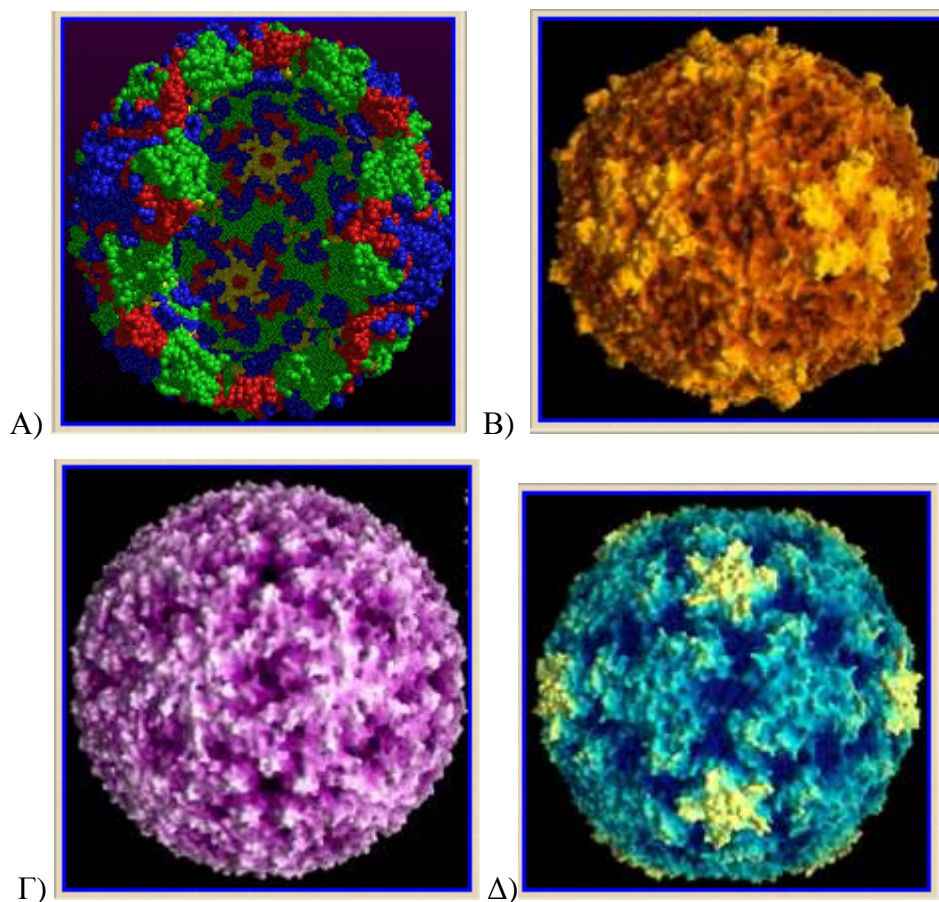
A1.2. ΔΟΜΗ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ



Εικόνα 2. Το ιικό σωματίδιο (virion) ενός Picorna ιού (Mentovirus) του γένους των καρδιοϊών. Ανατύπωση από Witwer et al., 2001.

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί είναι εξ' ορισμού μικροί, RNA ιοί, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας (Rueckert, 1985). Μέχρι σήμερα έχει αναλυθεί κρυσταλλογραφικά η τρισδιάστατη οργάνωση 10 οροτύπων Picorna ιών, των PV1, PV3 (Hogle et al., 1985, Hogle et al., 1987), CBV3 (Muckelbauer et al., 1995), CAV9 (Hendry et al., 1999), BEV (bovine

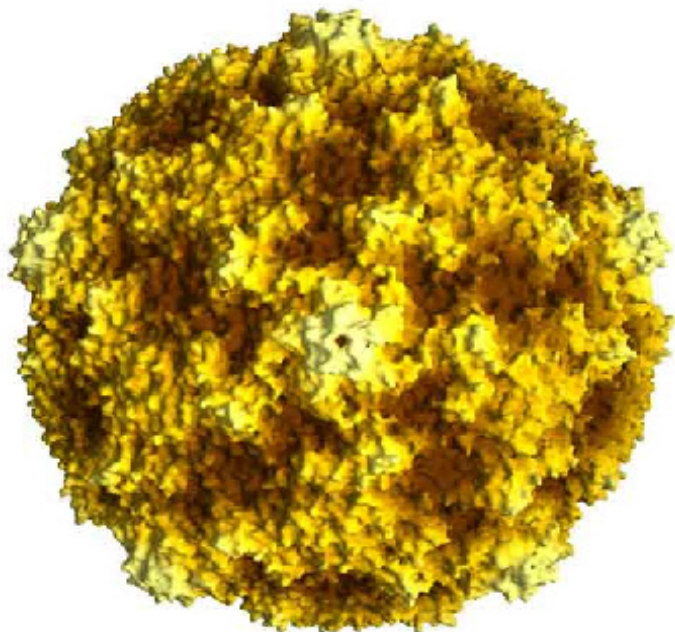
enterovirus – εντεροϊός των βοοειδών), EV1, SVDV-(Jimenez-Clavero et al, Lin et al., 2002), CAV21 (Xiao et al., 2005) και FMDV (Foot-and-mouth disease virus) (Acharya et al., 1989), παρέχοντας αντιπροσωπευτική εικόνα, όχι μόνο για τη δομή αλλά και τη βιολογία των εντεροϊών.



Εικόνα 3. Κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X διαφόρων Picorna ιών. A) Ρινοϊός 16, B) Mengovirus, Γ) Ιός FMDV (γένος Αφθοϊών), Δ) Μοριακή επιφάνεια του Ρινοϊού 14. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.virology.net/Big_Virology/BVRNAPicorn.html

A1.2.1. Δομή Καψιδίου

Η θεμελιώδης αρχιτεκτονική δομή του καψιδίου είναι η ίδια για όλα τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae. Το καψίδιο των εντεροϊών έχει διάμετρο 25 - 35nm και συνίσταται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών (VP1-VP4) (Rueckert, 1985). Η βασική δομική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές, το οποίο συνίσταται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4. Κατά την συγκρότηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το ώριμο εικοσαεδρικό καψίδιο πενταμερούς συμμετρίας, το οποίο σταθεροποιείται, καθώς ταυτόχρονα πραγματοποιείται η πρωτεόλυση της VP0 (στις VP2 και VP4) και ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού στο νεοσχηματιζόμενο ιικό σωματίο. Η διάσπαση της VP0 δεν παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις, μιας και στο ώριμο καψίδιο παραμένουν αδιάσπαστα ένα με δύο αντίγραφα αυτής, με την λειτουργική σημασία αυτού του φαινομένου να μην είναι ακόμη γνωστή.

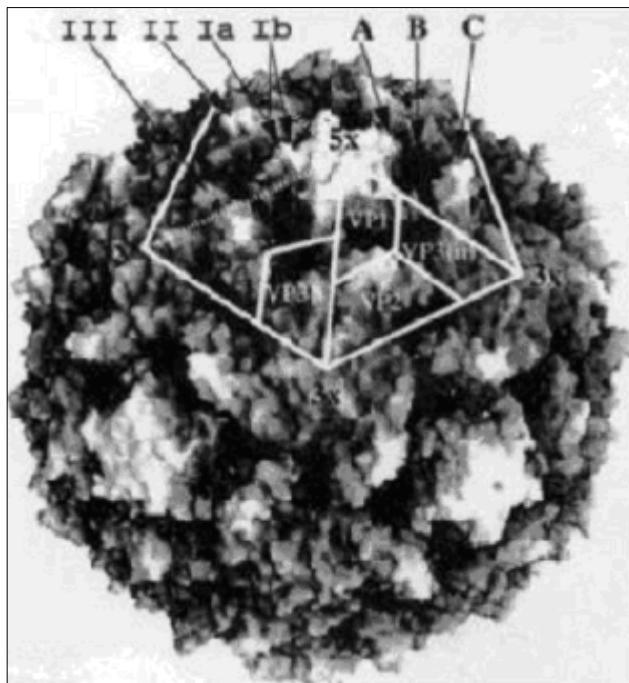


Εικόνα 4. Η καψιδική δομή του ιού Coxsackie B3. Όλα τα καψίδια των CoxsackieB ιών, ανεξαρτήτως οροτύπου, είναι πανομοιότυπα με το καψίδιο αυτό. Στη μπροστινή όψη της εικόνας διακρίνεται ένα κέντρο το οποίο αντιστοιχεί σε έναν άξονα πενταμερούς συμμετρίας. Γύρω από το κέντρο της εικόνας διακρίνονται πέντε επαναλαμβανόμενες δομές. Μεταξύ των δύο κέντρων πενταμερούς συμμετρίας που διακρίνονται είναι δυνατό να σχεδιαστεί μία νοητή διαχωριστική γραμμή. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατό να διακριθεί ένας από τους άξονες διμερούς συμμετρίας στην καψιδική δομή της εικόνας. Επίσης είναι δυνατή η διάκριση αξόνων τριμερούς συμμετρίας. Η εικόνα είναι προϊόν τρισδιάστατης ανάλυσης και έχει σχεδιαστεί από τον Dr. Jean-Yves Sgro (Institute of Molecular Virology, University of Wisconsin, Madison campus). Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.unmc.edu/Pathology/Enteroviruslab/default.htm

Τοπολογικά, οι VP1, VP2 και VP3 εντοπίζονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου του ιού, ενώ η VP4 στην εσωτερική. Συγκεκριμένα, οι αναλύσεις δείχνουν, ότι στην επιφάνεια, η VP1 συγκεντρώνεται εξωτερικά σε μία περιοχή, η οποία περιβάλλει

τον άξονα πενταμερούς συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 είναι τοποθετημένες η μία δίπλα στην άλλη σε μεγαλύτερη απόσταση από τον άξονα. Η VP4, η οποία στερείται σχεδόν ολοκληρωτικά δευτεροταγούς δομής, διαμορφώνει μία εκτεταμένη δομή, η οποία εντοπίζεται εσωτερικά

κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες έχοντας το N-τερματικό της άκρο κοντά στον πενταμερή άξονα και το C-τελικό, κοντά στον άξονα τριμερούς συμμετρίας εσωτερικά. Τα πενταμερή σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων του N-τελικού και του C-τελικού άκρου των VP1, VP3 και VP4. Τα γειτονικά πενταμερή, συνδέονται μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3 πρωτεϊνών και πιστεύεται, ότι αυτή η χαλαρή σύνδεση διευκολύνει την αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιϊκού RNA κατά την είσοδο στο κύτταρο ξενιστή (Stanway, 1990).



Εικόνα 5. Το καψίδιο των Picorna ιών. Διακρίνεται η δομή πενταμερούς συμμετρίας και η τοπολογική συσχέτιση των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects200/0/Polio/PoliovirusPathogenesis.htm.

A1.2.2. Δομικές Πρωτεΐνες

Οι καψιδικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται προς το 5' άκρο του γονιδιώματος των εντεροϊών και το μέγεθός τους είναι ποικίλει στα διάφορα γένη των Picorna ιών. Η πρωτεΐνη VP1 αποτελείται από 209 έως 302 αμινοξέα, η VP2 από 218-272, η VP3 από 221-246, ενώ, τέλος, η VP4 είναι αρκετά μικρότερη, με μήκος που ποικίλλει αρκετά, από 68 έως 85 αμινοξέα (με εξαίρεση τους ιούς της ηπατίτιδας Α, όπου έχει μήκος 17 αμινοξέα) (Palmenberg et al., 1989).

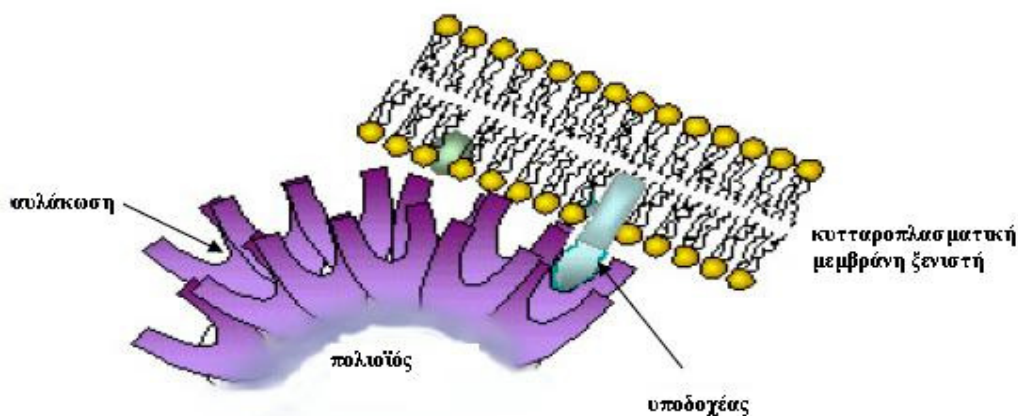
Η κατανόηση της δομής των πρωτεϊνών του καψιδίου καθώς και του ρόλου, τον οποίο διαδραματίζουν κατά τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών βελτιώθηκε σημαντικά μετά από τον καθορισμό της τρισδιάστατης οργάνωσης του πολιοϊού τύπου 1 (PV1) και του ρινοϊού 14 (HRV14) (Arnold and Rossmann, 1990, Rossmann et al., 1985). Φαίνεται, λοιπόν, ότι μεταξύ των εντεροϊών, και γενικότερα των Picorna ιών, οι πρωτεΐνες του καψιδίου μοιράζονται δομικές ομοιότητες. Συγκεκριμένα, οι VP1, VP2 και VP3, είναι δομικά όμοιες και διαθέτουν οκτάκλινη οργάνωση β-βαρελίου. Ο πυρήνας αυτής της δομής συγκροτείται από αντιπαράλληλα β-φύλλα, τα οποία συνδέονται μεταξύ τους μέσω θηλειών. Η δομική διαφοροποίηση μεταξύ των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου έγκειται κυρίως στο μέγεθος των θηλειών και σε σχηματισμούς, που ενώνονται ή προεκτείνονται από τα β-φύλλα, τα οποία σχηματίζουν την δομή του πυρήνα. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν ότι το αμινοτελικό άκρο των VP1 και VP3 δεν έχει καθορισμένη δομή, ενώ η VP4 φαίνεται να αποτελεί προέκταση του αμινοτερματικού άκρου της VP2.



Εικόνα 6. Τρισδιάστατη απεικόνιση των πρωτεϊνών του καψιδίου VP1, VP2, VP3 και VP4. Διακρίνεται η μεγάλη συμμετοχή των β- φύλλων στη διαμόρφωση της δευτεροταγούς οργάνωσης και των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών καθώς και η παρουσία μικρού ποσοστού α-ελίκων. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.swbic.org/.../envirusat/module6/module6.html

Μία επιπρόσθετη δομική ομοιότητα, που προέκυψε από την πρώτη τρισδιάστατη δομή που μελετήθηκε, αυτή του HRV-14, ήταν η παρουσία μιας βαθιάς αυλάκωσης (canyon), η οποία σχηματίζεται από γειτνιάζοντα κατάλοιπα των VP1 και VP3 πρωτεϊνών και εντοπίζεται σε σταθερή ακτίνα, περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας (Rossmann et al., 1985) των εντεροϊών. Έχει προταθεί, ότι αυτός ο σχηματισμός σχετίζεται με την πρόσδεση των Picorna ιών στους κυτταρικούς υποδοχείς αλλά και με την αποφυγή της ανοσοαπόκρισης μέσω αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, στο εσωτερικό της αυλάκωσης βρίσκονται πρωτεϊνικά τμήματα, τα οποία διαθέτουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με συμπληρωματικές προεξέχουσες περιοχές των υποδοχέων των ξενιστικών κυττάρων. Δεδομένου ότι, μία τέτοιου τύπου αλληλεπίδραση προϋποθέτει συντηρημένη, εξελικτικά, πρωτοταγή και δευτεροταγή οργάνωση των τμημάτων αυτών, οι ιοί θα καθίσταντο ευάλωτοι στην ανοσο-απάντηση. Η τοποθέτηση όμως αυτών των καταλοίπων σε μία περιοχή, η οποία, λόγω μεγέθους (πλάτος 1,5 nm και

βάθος 1,2 nm), δεν είναι προσιτή στα ογκώδη αντισώματα του ανοσοποιητικού συστήματος, εξασφαλίζει την προστασία των ιών από τον ξενιστή αλλά και την προσκόλληση στους υποδοχείς του. Επιπρόσθετα, κάτω από την αυλάκωση εντοπίζεται μία εσοχή (hydrophobic pocket), ευθυγραμμισμένη με τα υδρόφοβα κατάλοιπα των πρωτεϊνών της επιφάνειας. Στους εντεροϊούς και ρινοϊούς, αυτή η κοιλότητα (cavity or pocket) περιέχεται στη VP1 πρωτεΐνη (Hendry et al., 1999, Rossmann et al., 1985) και σχετίζεται με την προσκόλληση στον υποδοχέα (Smith et al., 1986), ενώ ταυτόχρονα άλλες μελέτες (Filman et al., 1989) προτείνουν την συμμετοχή της στη ρύθμιση των δομικών αλλαγών του καψιδίου κατά την ελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο κύτταρο ξενιστή.



Εικόνα 7. Η χαρακτηριστική δομή αύλακας των εντεροϊών. Ανατύπωση από την ιστοσελίδα www.ratsteachmicro.com/Picornavirus/HCOE_CAI...

Η χαρακτηριστική οργάνωση αύλακας έχει παρατηρηθεί σε ιούς, όπως οι πολιοϊοί τύπου 1 και 3 και οι Mengo ιοί και πιστεύεται, ότι είναι λειτουργικά ενεργή σε πολλούς εντεροϊούς (Rossmann and Palmenbeg, 1988). Άλλοι πάλι ιοί, όπως ο FMDV, δεν τη διαθέτουν, προτείνοντας, ότι σε κάποιες περιπτώσεις ο μηχανισμός πρόσδεσης στον υποδοχέα μπορεί να είναι διαφορετικός. Επιπλέον, πιο πρόσφατες μελέτες προτείνουν, ότι ακόμη και σε ιούς, όπου έχει παρατηρηθεί η παρουσία αυλάκωσης, η κατάσταση μπορεί να είναι πιο πολύπλοκη και ότι στην προσκόλληση των εντεροϊών στην επιφάνεια των κυττάρων ξενιστών μπορεί να συμμετέχουν και τμήματα των καψιδικών πρωτεϊνών, που βρίσκονται εκτός αύλακας, ακόμη και πολλαπλά τμήματα, επιτρέποντας την σύνδεση σε περισσότερους του ενός κυτταρικούς υποδοχείς (Stanway, 1990).

Γύρω από την αυλάκωση, τα τμήματα της ιϊκής επιφάνειας, τα οποία προεξέχουν και τα οποία δεν έχουν κάποια προφανή λειτουργική σημασία, φαίνεται να παρουσιάζουν αξιοσημείωτη μεταβλητότητα ως προς την πρωτοταγή και συνεπώς ως προς την τριτοταγή τους οργάνωση (Stanway, 1990). Τα τμήματα αυτά συγκεντρώνονται σε πολυποικιλόμοφα τμήματα των θηλειών των καψιδικών πρωτεϊνών, προσδίδουν τον αντιγονικό χαρακτήρα των διαφόρων στελεχών εντεροϊών και παρέχουν έναν επιπρόσθετο προστατευτικό ρόλο στους εντεροϊούς, αυτόν της αντιγονικής ποικιλίας, που είναι απαραίτητη για την αποφυγή της πρόσδεσης των αντισωμάτων του ανοσοποιητικού συστήματος και για την προστασία των υψηλά συντηρημένων τμημάτων του καψιδίου, τα οποία είναι αναγκαία για την κυτταρική προσκόλληση.

Κάποιες από τις αντιγονικές θέσεις των εντεροϊών είχαν ήδη μελετηθεί πριν από τη διαλεύκανση της τρισδιάστατης οργάνωσης των εντεροϊών, μιας και ήταν ήδη γνωστό, ότι οι δομικές πρωτεΐνες παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ διαφορετικών οροτύπων, με διαφοροποιήσεις, οι οποίες συγκεντρώνονται σε συγκεκριμένες θέσεις, ως επί το πλείστον σε υδρόφιλες περιοχές των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Πειράματα διαφυγής μονοκλωνικών αντισωμάτων με χρήση μεταλλαγμένων στελεχών επέτρεψαν την χρήση κάποιων από αυτά τα τμήματα (DiMarchi et al., 1986, Ferguson et al., 1985, Minor et al., 1983, Sherry et al., 1986) για την παραγωγή συνθετικών πεπτιδίων, ως πιθανά μελλοντικά εμβόλια αλλά και ως ανιχνευτές (probes) για τον εντοπισμό επιπρόσθετων αντιγονικών περιοχών σε περισσότερους οροτύπους. Μια επίσης ποικιλόμορφη περιοχή, με υδρόφοβο, ωστόσο, χαρακτήρα είχε εντοπισθεί στο αμινοτερματικό άκρο της VP1. Περαιτέρω αναλύσεις έδειξαν, ότι αυτή η περιοχή μπορεί να αλληλεπιδρά με ενδοσωμικές μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή, διευκολύνοντας έτσι την είσοδο του ιού (Fricks and Hogle, 1990). Σήμερα, η δομική ποικιλομορφία και η λειτουργική σημασία πολλών από τις αντιγονικές θέσεις των εντεροϊών έχει ήδη διαλευκανθεί (Stanway, 1990), ενώ ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποκαλύπτονται γι' αυτές, μέσω των τεχνικών του προσδιορισμού της πρωτοταγούς διάταξης και της πρόβλεψης της δευτεροταγούς δομής.

Ειδικά για τους Coxsackie A ιούς, η μελέτη των VP1 αλληλουχιών διαφορετικών μελών έχει δείξει, ότι στις προβλεπόμενες αντιγονικές περιοχές υπάρχει αξιοσημείωτη ποικιλία. Η στοίχιση, μάλιστα, των VP1 αλληλουχιών όλων των Coxsackie A προτύπων στελεχών υποδεικνύει, ότι δεν υπάρχουν χαρακτηριστικά που να επιτρέπουν την ταξινόμηση όλων των Coxsackie A σε μία κοινή αντιγονική ομάδα. Αυτό πιθανώς συμβαίνει εξαιτίας του ότι υπάρχει αξιοσημείωτη μοριακή απόκλιση μεταξύ των τριών

τύπων Coxsackie A ιών (εκείνων των ειδών HEV-A, HEV-B και HEV-C), με αποτέλεσμα αυτή η ολική ετερογένεια πιθανώς να υπερκαλύπτει την ομοιότητα, που υπάρχει σε έναν μικρό αριθμό καταλοίπων υψίστης σημασίας. Αυτή η ποικιλία δεν παρατηρείται ούτε στην ομάδα των πολιοϊών ούτε στους εντεροϊούς του είδους B, τα οποία αποτελούνται από μέλη με μεγάλη συγγένεια (Hygyria and Stanway, 1993).

Ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά της στοίχισης των VP1 αλληλουχιών των Coxsackie A ιών εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης αυτής, και στην οποία οι ιοί CAV9 παρουσιάζουν μία εμφανή προέκταση σε σχέση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς. Μέσα σε αυτή την προέκταση, εντοπίζεται ένα μοτίβο RGD (τριπεπτίδιο αργινίνης-γλυκίνης-ασπαρτικού οξέος), το οποίο πιστεύεται, ότι εμπλέκεται σε πρωτεϊνικές αλληλεπιδράσεις σε μία μεγάλη ποικιλία συστημάτων (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Το συγκεκριμένο τμήμα είναι υδρόφιλο, βρίσκεται στην επιφάνεια του καψιδίου των CAV9 ιών και η λειτουργική του σημασία αφορά στην προσκόλληση στους κυτταρικούς υποδοχείς (Hygyria and Stanway, 1993).

Παρότι οι ακριβείς θέσεις αντιγονικών επιτόπων στους CAV ιούς δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πλήρως, οι πολιοϊοί έχουν μελετηθεί εκτεταμένα ως προς αυτές και έχουν προκύψει αρκετά ενδιαφέροντα στοιχεία μέσω της χρήσης νουκλεοτιδικών στοιχίσεων. Όπως και στους πολιοϊούς, η VP1 των Coxsackie ιών αναμένεται να συμμετέχει σε μεγάλο ποσοστό στη διαμόρφωση της καψιδικής επιφάνειας των ιών περιέχοντας σημαντικούς επιτόπους οροεξουδετέρωσης (neutralizing epitopes). Σε κάθε περίπτωση, οι προβλεπόμενοι επίτοποι βρίσκονται σε υδρόφιλες περιοχές, οι οποίες είναι υψηλά διαφοροποιημένες στους διαφορετικούς οροτύπους, από άποψη νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και μήκους, και πιθανώς εμπλέκονται στον καθορισμό των αντιγονικών ιδιοτήτων των Coxsackie ιών.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν λίγες πληροφορίες σχετικά με τις δομές, που παίζουν ρόλο στη διαμεσολαβούμενη, από τα κύτταρα, ανοσία απέναντι στις μολύνσεις των Coxsackie ιών. Ωστόσο, έχει ανιχνευθεί ένας επίτοπος (cross-reactive epitope) μεταξύ των εντεροϊών, ο οποίος προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση (Beck and Tracy, 1989, Beck and Tracy, 1990). Έχει λοιπόν δειχθεί, ότι κύτταρα σπλήνας από ποντίκια, τα οποία έχουν μολυνθεί με ιικό στέλεχος CBV3, αναπτύσσουν, *in vitro*, μία πολλαπλασιαστική αντίδραση, έναντι του ιού. Αυτή η αντίδραση δεν κατευθύνεται αποκλειστικά έναντι του CBV3 οροτύπου, αλλά και έναντι άλλων εντεροϊών, συμπεριλαμβανομένου του Coxsackie A16. Οι ίδιες μελέτες έδειξαν ότι κύριος υπεύθυνος αυτής της αντίδρασης είναι η πρωτεΐνη CD4⁺. Γενικότερα, υπάρχουν πολλές περιοχές στις καψιδικές πρωτεΐνες

των εντεροϊών, οι οποίες είναι καλά συντηρημένες και μπορεί να εμπλέκονται σε αυτήν τη διασταυρούμενη αντίδραση.

Συμπερασματικά, ο πρωταρχικός ρόλος των καψιδικών πρωτεϊνών έγκειται στο να προσδίδουν στους εντεροϊούς τις αντιγονικές αλλά και άλλες ιδιότητές τους, όπως π.χ. ιδιότητες, που αφορούν στον τρόπο προσκόλλησης στους υποδοχείς των κυττάρων ξενιστών (Stanway, 1990). Επιπρόσθετα, πιστεύεται, ότι η VP4, μέσω λειτουργικής τροποποίησης, που περιλαμβάνει σύνδεση με μυριστικό οξύ στο αμινοτελικό της άκρο (Chow et al., 1987) και δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κινάσες (Ratka et al., 1989), συμβάλλει στην προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην απελευθέρωση του ιού στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή. Επίσης πιστεύεται, ότι η VP4 παίζει λειτουργικό ρόλο και κατά τη συγκρότηση του καψιδίου των νεοσχηματισθέντων ιών (Chow et al., 1987). Τέλος, στην αποδιάταξη του καψιδίου για την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, πιστεύεται ότι συμμετέχει και η VP2, η οποία επίσης παρουσιάζει δυνατότητα φωσφορυλίωσης από κυτταρικές κινάσες (Ratka et al., 1989).

A1.2.3. Λειτουργικές Πρωτεΐνες

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες των Picorna ιών κωδικοποιούνται από το 3' μισό του γονιδιώματός τους. Το αρχικό αποτέλεσμα της μετάφρασης παράγει μία πολυπρωτεΐνη, η οποία μέσω μιας αρχικής πρωτεολυτικής διάσπασης, που πραγματοποιείται μέσω της δράσης της 2A, χωρίζεται σε δύο τμήματα, εκείνα των δομικών και λειτουργικών πρωτεϊνών. Η υπόλοιπη επεξεργασία της αρχικής πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται από την 3C.

Διακρίνονται συνολικά επτά λειτουργικές πρωτεΐνες, οι 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, αν και σε μερικές περιπτώσεις, φαίνεται ότι και κάποια πρόδρομα μόρια αυτών είναι λειτουργικά. Έτσι, έχει δειχθεί ότι στους πολιοϊούς η πρόδρομος πρωτεΐνη 3 CD^{pro} συμμετέχει στην επεξεργασία των πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών του καψιδίου (Ypma-Wong et al., 1988a).

Η σύγκριση των λειτουργικών πρωτεϊνών διαφόρων εντεροϊών υποδεικνύει, ότι είναι πιο συντηρημένες σε σχέση με τις δομικές πρωτεΐνες, γεγονός που εκφράζει, πιθανότατα, έλλειψη ανοσολογικής πίεσης και ανάγκη διατήρησης αμετάβλητων ορισμένων τμημάτων με σημαντική λειτουργία, όπως είναι τα ενεργά κέντρα των ενζύμων. Ειδικότερα για τους Coxsackie A ιούς, όπως συμβαίνει και με τις δομικές τους πρωτεΐνες, η στοίχιση των αλληλουχιών των λειτουργικών περιοχών του γονιδιώματος

δεν μπορεί να υποδείξει την μοριακή βάση του φαινοτύπου «CAV» κι αυτό συμβαίνει, επειδή υπάρχει τόση ετερογένεια μέσα στην ίδια την ομάδα των Coxsackie A ιών, όση και μεταξύ των Coxsackie A ιών με άλλες ομάδες εντεροϊών. Αντίθετα, στους Coxsackie B ιούς, η ομολογία των νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών του γονιδιώματος, που κωδικοποιεί για τις λειτουργικές πρωτεΐνες, είναι υψηλή (Stanway, 1990).

Οι λειτουργικές πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA. Επιπρόσθετα, σχετίζονται με διάφορες μεταβολές στον μεταβολικό κύκλο και στην μορφολογία του κυττάρου ξενιστή (Porter, 1993). Σε αυτές περιλαμβάνονται η αναστολή της μεταγραφής και της μετάφρασης, που εξαρτάται από το σύμπλοκο cap (cap-dependent translation), η διαταραχή της επικοινωνίας μεταξύ πυρήνα και κυτταροπλάσματος και η αναστολή - αναδιαμόρφωση του κυστιδιακού συστήματος μεταφοράς (vesicular transport system). Οι παραπάνω αλλαγές εξυπηρετούν την δημιουργία κατάλληλων συνθηκών για την πραγματοποίηση του ιϊκού πολλαπλασιασμού (μέσω αύξησης της διαθεσιμότητας των κυτταρικών συστατικών, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τους ιούς) και / ή την αποφυγή της αντι-ιϊκής αντίδρασης του κυττάρου ξενιστή (μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης και μεταφοράς ενδιάμεσων μορίων του ανοσοποιητικού συστήματος).

A1.2.3.1 Η πολυμεράση 3D

Η 3D πολυμεράση των εντεροϊών είναι μία RNA-εξαρτώμενη (RNA-dependent) πολυμεράση, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο το γονιδίωμα του ιού και η οποία δρα ταυτόχρονα με κυτταρικές πρωτεΐνες στην αντιγραφή του ιϊκού RNA, μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA (-) αρνητικής πολικότητας (Rueckert, 1985). Η πρωτεΐνη αυτή είναι η πιο καλά συντηρημένη από τις μη-δομικές πρωτεΐνες, παρουσιάζοντας νουκλεοτιδική ομολογία μεγαλύτερη του 95% μεταξύ διαφόρων οροτύπων εντεροϊών και εκτεταμένη αμινοξική συγγένεια ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών των Picornaviridae (Stanway et al., 1984). Η λειτουργική περιοχή της πολυμεράσης φαίνεται να περιλαμβάνει ένα μοτίβο γλυκίνης - ασπαρτικού οξέος – ασπαρτικού οξέος (GDD-Gly-Asp-Asp motif), το οποίο είναι συντηρημένο σε όλους τους Picorna ιούς. Το μοτίβο αυτό είναι παρόμοιο με το μοτίβο YXDD (Tyr-Xxx-Asp-Asp), το οποίο συναντάται στις πολυμεράσες πολλών RNA ιών, συμπεριλαμβανομένης της αντίστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών (Kamer and Argos, 1984).

Η ενεργή RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση, παράγεται μέσω πρωτεόλυσης μιας πρόδρομης πρωτεΐνης 3CD^{pro}. Πρόκειται για μία πρωτεάση, η οποία δεν έχει δραστικότητα πολυμεράσης, παρότι περιέχει ολόκληρη την δομική περιοχή πολυμερισμού (polymerase domain). Πρόσφατες μελέτες, μέσω κρυσταλλοποίησης και ανάλυσης της δομής της πρωτεΐνης με διακριτικότητα 2.0 Å (Thompson and Peersen, 2004) έχουν δείξει, ότι το αμινοτερματικό άκρο της ώριμης 3Dpol βρίσκεται εγκλωπωμένο στο εσωτερικό μιας επιφανειακής αύλακας (surface pocket), όπου σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, οι οποίοι ενεργούν στην θέση Asp238, ένα κατάλοιπο ιδιαίτερης σημασίας, της ενεργής περιοχής της πρωτεΐνης. Διάφορα γενετικά, βιοχημικά και δομικά δεδομένα υποδεικνύουν, επιπλέον, ότι η δραστικότητα της 3Dpol είναι εξαιρετικά ευαίσθητη σε μεταλλάξεις του αμινοτερματικού της άκρου. Αυτή η ευαισθησία είναι αποτέλεσμα αλλοστερικών επιδράσεων, κατά τις οποίες η δομή, που περιβάλλει το καλυμμένο N-τερματικό άκρο, επηρεάζει άμεσα την τοπολογία του Asp238 στην ενεργή περιοχή.

A1.2.3.2. Η λειτουργική πρωτεΐνη 2C

Η 2C, αν και δεν έχει ακόμη χαρακτηριστεί πλήρως, επιδεικνύει, επίσης, μία από τις πιο υψηλά συντηρημένες δομές των εντεροϊών. Η πρωτεΐνη αυτή, πιθανώς εμπλέκεται στην αντιγραφή του RNA (Dever et al., 1987, Hodgman T.C., 1988) μιας και έχει δειχθεί, ότι περιέχει μία παλίνδρομη αλληλουχία (GXXXXGK) με ικανότητα πρόσδεσης νουκλεοτιδίων. Περαιτέρω μελέτες συστήνουν, ότι η 2C, όμοια με αντίστοιχες πρωτεΐνες άλλων RNA ιών, διαθέτει μερικά από τα μοτίβα, που εντοπίζονται στην υπεροικογένεια των ελικασών (Gorbalenya et al., 1989a, Gorbalenya et al., 1989b). Οι ελικάσες είναι πρωτεΐνες που προωθούν το ξεδίπλωμα δίκλωνων DNA, δίκλωνων RNA και RNA-DNA δομών, διευκολύνοντας την αντιγραφή τους. Είναι πιθανό, ότι η δραστικότητα ελικάσης της 2C είναι σημαντική κατά τον πολλαπλασιασμό των εντεροϊών. Υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις για την εμπλοκή της 2C στον ιικό πολλαπλασιασμό, αλλά η δραστικότητα ελικάσης της 2C δεν έχει ακόμη αποδειχθεί (Li and Baltimore, 1988). Τέλος, υπάρχουν πειραματικές μελέτες, που εμπλέκουν την 2C στον καθορισμό της δομής των εντεροϊών (Li and Baltimore, 1988).

A1.2.3.3. Οι Πρωτεάσες 3C και 2A

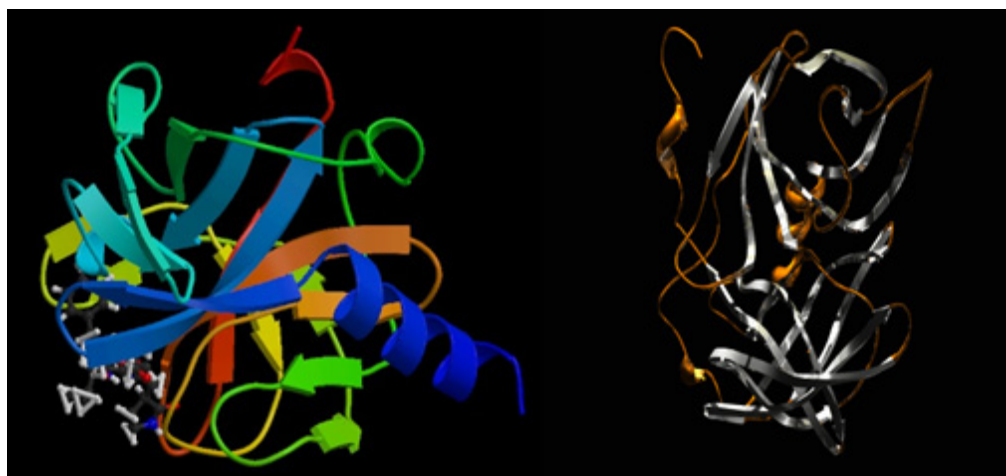
Δεδομένου, ότι το γονιδίωμα των Picorna ιών μεταφράζεται πρωταρχικά σε μία πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, είναι απαραίτητη η πρωτεολυτική διάσπαση αυτής προς τα τελικά δομικά ή λειτουργικά πρωτεϊνικά μόρια των ιών. Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται μέσω τουλάχιστον τριών διασπάσεων, για την πραγματοποίηση των οποίων, η γενετική πληροφορία περιέχεται στο ίδιο το γονιδίωμα των ιών (Krausslich and Wimmer, 1988).

Οι πρωτεΐνάσες των εντεροϊών χαρακτηρίζονται από τον μηχανισμό κατάλυσής τους, την ειδικότητα ως προς το υπόστρωμα και από την τριτοταγή οργάνωσή τους. Οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με τα παραπάνω χαρακτηριστικά προέκυψαν από μελέτες με ανασταλτικούς παράγοντες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν, ως πηγή πρωτεΐνασών, καθαρισμένες πρωτεΐνάσες ή προϊόντα εκχύλισης μολυσμένων κυττάρων, είτε προϊόντα *in vitro* πρωτεϊνοσύνθεσης. Έτσι, πειράματα αναστολής των 2A^{pro} και 3C^{pro} με την χρήση αντιδραστηρίων, ειδικών για τις σουλφυδρλικές ομάδες, οδήγησαν στην παρατήρηση, ότι το ενεργό κέντρο των ενζύμων είναι μία κυστεΐνη (Gorbalenya and Svitkin, 1983, Koenig and Rosenwirth, 1988, Pelham, 1978). Ωστόσο, άλλες μελέτες, έδειξαν, ότι ο E-64, ένας διαγνωστικός αναστολέας των κυστεϊνικών πρωτεΐνασών, που μοιάζουν με παπαΐνη (papain-like), δεν ήταν δραστικός έναντι των 2A^{pro} και 3C^{pro} με αποτέλεσμα να προταθεί ένας δεύτερος μηχανισμός (Koenig and Rosenwirth, 1988, Nicklin et al., 1988).

Τελικά, η μελέτη της πρωτοταγούς διάταξης των 3C και 2A αλληλουχιών των μελών της οικογένειας Picornaviridae υπέδειξε, ότι οι πρωτεΐνες αυτές ανήκουν σε μία υπεροικογένεια πρωτεασών κυστεΐνης, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζουν ομολογία με την παπαΐνη (papain). Επίσης, ειδικά για την 3C, φαίνεται να υπάρχει στενή δομική ομολογία με πρωτεάσες σερίνης, οι οποίες ομοιάζουν με τρυψίνη (trypsin-like serine proteases), γεγονός, που επιτρέπει την πρόβλεψη, ότι το ενεργό κέντρο κατάλυσης περιλαμβάνει μία κυστεΐνη (στην θέση 147 στους πολιοϊούς), μία ιστιδίνη (στην θέση 40) και ένα ασπαρτικό οξύ (στην θέση 85). Αυτή η καταλυτική τριάδα είναι υψηλά συντηρημένη σε όλους τους Picorna ιούς και έχει σαν χαρακτηριστικό γνώρισμα το κατάλοιπο κυστεΐνης, το οποίο, στο ενεργό κέντρο κατάλυσης (καταλυτική τριάδα) αντικαθιστά την σερίνη, η οποία συνήθως συναντάται σε ομόλογη θέση σε άλλες πρωτεάσες, που μοιάζουν με τρυψίνη.

(A)

(B)



Εικόνα 8. Η τρισδιάστατη οργάνωση της 3C πρωτεάσης στους ρινοϊούς (A) και στους ιούς της Ηπατίτιδας A (B). Ανατύπωση από τις ιστοσελίδες http://www.whozoo.org/mac/Music/Sars_Protease.htm και <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/~trent/right.htm> αντίστοιχα.

Η 2A των εντεροϊών (και ρινοϊών), ανήκει επίσης, όπως και η 3C, στις πρωτεάσες κυστεΐνης που μοιάζουν με τρυψίνη αλλά ανήκει σε διαφορετική υποομάδα από την 3C. Και στην περίπτωση της 2A, η κυστεΐνη αντικαθιστά τη σερίνη σε μία καταλυτική τριάδα αμινοξέων, που συμπεριλαμβάνει κατάλοιπα ιστιδίνης και ασπαρτικού οξέος (Bazan and Fletterick, 1988). Ωστόσο, τα παραπάνω χαρακτηριστικά δεν συναντώνται στους καρδιο- και αφθοϊούς.

Από άποψη λειτουργίας, η 3C είναι υπεύθυνη για την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων και φαίνεται να προτιμά, στην πλειοψηφία των Picorna ιών, την πέψη μεταξύ καταλοίπων γλουταμίνης - γλυκίνης (Gln-Gly). Αυτή η προτίμηση ισχύει απόλυτα στην περίπτωση των πολιοϊών και των περισσοτέρων Coxsackie A ιών (Hyuria and Stanway, 1993), ενώ στους υπόλοιπους εντεροϊούς φαίνεται ότι τα διπεπτίδια QS, QA, QM και QN μπορεί να υποκαθιστούν το QG, ως θέση πρωτεόλυσης, ειδικά σε μερικές οριακές θέσεις των πρωτεϊνών, όπου το διπεπτίδιο γλουταμίνη-γλυκίνη απουσιάζει.

Δεδομένου, βέβαια, ότι όλες οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των εντεροϊών φέρουν τέτοια διπεπτίδια, επιπρόσθετα αυτών που πρωτεολύονται, θα πρέπει να υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, που καθορίζουν τις θέσεις επιλογής πέψης από την 3C. Αυτοί οι παράγοντες δεν έχουν ακόμη καθοριστεί πλήρως, αν και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις: σε

ορισμένους Picorna ιούς, και ιδιαίτερα στους Αφθοϊούς και τους Καρδιοϊούς, φαίνεται ότι μεταξύ των καταλοίπων των θέσεων πρωτεόλυσης βρίσκεται συχνά ένα κατάλοιπο προλίνης (Palmenberg et al., 1984). Επιπρόσθετα, στους εντεροϊούς, και ειδικότερα στους Coxsackie A, η θέση 4 του γονιδιώματός τους (3 αμινοξικά κατάλοιπα ανοδικά της γλουταμίνης της θέσης πρωτεόλυσης) φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο, λόγω της συχνής εμφάνισης μίας αλανίνης (Aln) στη θέση αυτή, στην πλειοψηφία των περιοχών πρωτεόλυσης (Yrma-Wong et al., 1988b). Τέλος, στο ρινοϊό 14, μελέτες με συνθετικά πεπτίδια έχουν αποδείξει, ότι μία αλανίνη στην θέση +2 της περιοχής πρωτεόλυσης και μία θρεονίνη ή βαλίνη στην θέση -4, σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της πρωτεόλυσης (Cordingley et al., 1989).

Πέρα από την πρωτεολυτική της δράση, η 3C, έχει προταθεί ότι συμμετέχει και σε άλλες βιολογικές διαδικασίες. Πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις κοντά στο 5' άκρο του RNA των πολιοϊών, που οδηγούν σε ελαττωματική σύνθεση RNA, μπορούν να αντιστραφούν μέσω μεταλλάξεων στην πρωτεΐνη 3C (Andino et al., 1990). Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι υπάρχει, πιθανά, άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ της 3C και του ιϊκού RNA και ότι η πρωτεΐνη 3C μπορεί να διαδραματίζει και άλλους ρόλους, επιπρόσθετα εκείνου της επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης.

Μία άλλη πρωτεΐνη, η οποία κωδικοποιείται από το ίδιο το γονιδίωμα των εντεροϊών και η οποία διαθέτει πρωτεολυτική δραστηριότητα, είναι η πρωτεάση 2A (2A^{pro}), που αναγνωρίστηκε στους πολιοϊούς, για πρώτη φορά το 1986 από τους Toyoda et al., 1986). Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, η πρωτεάση 2A των εντεροϊών και των ρινοϊών πραγματοποιεί την αρχική πρωτεόλυση μεταξύ των καψιδικών (δομικών) και των μη-δομικών πρωτεϊνικών προδρόμων μορίων. Η πρωτεόλυση πραγματοποιείται στην ένωση (junction) του καρβοξυτερματικού άκρου της VP1 με το αμινοτερματικό άκρο της ίδιας της πρωτεΐνης (2A). Επιπρόσθετα, έχει υποστηριχθεί, ότι η 2A^{pro} των πολιοϊών αναγνωρίζει μία δεύτερη θέση πρωτεόλυσης, στην πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD^{pro}, με αποτέλεσμα να οδηγεί στην παραγωγή των προϊόντων 3C και 3D (Toyoda et al., 1986). Ωστόσο, πειράματα μεταλλάξεων στην αλληλουχία αναγνώρισης της 2A πάνω στην 3CD^{pro} για την παραγωγή των 3C και 3D, έδειξαν ότι ο ιϊκός πολλαπλασιασμός δεν επηρεάζεται (Lee and Wimmer, 1988). Συνεπώς, το εάν και κατά πόσο επηρεάζει αυτή η δεύτερη θέση πρωτεόλυσης τον κύκλο ζωής των εντεροϊών, δεν είναι σαφές.

Επιπλέον, η 2A των εντεροϊών και των ρινοϊών είναι υπεύθυνη για την ειδική πρωτεόλυση μιας πρωτεΐνης του ξενιστικού κυττάρου, του ευκαρυωτικού παράγοντα έναρξης της μεταγραφής (eIF) 4G (Devaney et al., 1988, Lloyd et al., 1988). Αυτή η

πρωτεΐνη είναι απαραίτητη για την στρατολόγηση του κυτταρικού mRNA προς το ριβόσωμα, κατά τη μετάφραση. Η πρωτεόλυση του eIF4G διακόπτει αυτή τη διαδικασία, οδηγώντας σε αδυναμία πρωτεϊνικής σύνθεσης του ξενιστικού κυττάρου. Επιπρόσθετα, είναι πιθανό, ότι η 2A εμπλέκεται στην πρωτεόλυση της ενδοκυτταρικής πρωτεΐνης p220, η οποία αποτελεί τμήμα του συμπλόκου Cap και είναι αναγκαία για τη μετάφραση (Stanway, 1990). Με τους παραπάνω τρόπους φαίνεται, ότι η 2A διαμεσολαβεί στην αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του ξενιστικού κυττάρου κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από εντεροϊούς (Krausslich et al., 1987). Αντίθετα, η μετάφραση του ιϊκού mRNA μένει ανεπηρέαστη, λόγω του ότι τα ριβοσώματα ξεκινούν την μετάφραση, σε αυτή την περίπτωση, πιο εσωτερικά, πάνω σε μία υψηλά-οργανωμένη RNA δομή που εντοπίζεται στην 5' UTR των εντεροϊών και η οποία ονομάζεται IRES (internal ribosome entry site – εσωτερική ριβοσωμική πλευρά εισόδου).

A1.2.3.4. Γενικά περί πρωτεόλυσης

Υπάρχουν ενδείξεις, ότι η αποτελεσματικότητα της πρωτεόλυσης της αρχικής πρόδρομης πολυπρωτεΐνης επηρεάζεται από την σταθερή αλληλουχία μιας περιοχής πρωτεόλυσης (Cordingley et al., 1989). Η αυτοκατάλυση, π.χ. από την 2A, φαίνεται να εμπλέκει την αναγνώριση μίας γλυκίνης στο καρβοξυτερματικό άκρο της VP1. Επίσης, η πρωτεόλυση και παραγωγή των VP4 και VP2 από την πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 πραγματοποιείται από άγνωστη πρωτεάση, ενώ έχει προταθεί, με βάση δομικές μελέτες, και η πιθανότητα αυτοκατάλυσης (Arnold et al., 1987). Και σε αυτήν την περίπτωση, πιστεύεται ότι η πρωτεόλυση καθορίζεται, πρωταρχικά στους εντεροϊούς, από ένα κατάλοιπο σερίνης (S) (στην θέση 10 της VP2 σε πολλούς Picorna ιούς), παρόλο που υπάρχουν ενδείξεις, ότι το ίδιο το ιϊκό RNA πιθανώς εμπλέκεται στην διαδικασία.

Συνεπώς, παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι μερικές περιοχές πρωτεόλυσης φαίνεται να είναι επιτηδευμένα ακατάλληλες. Για παράδειγμα, το όριο μεταξύ των 2B και 2C γονιδίων χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός διπεπτιδίου γλουταμίνης – γλυκίνης, μόνο στον πολιοϊό τύπου 1 και στον CAV-21. Επιπρόσθετα, και στις δύο αυτές περιπτώσεις, το κατάλοιπο αλανίνης στην θέση -3 της γλουταμίνης λείπει. Έχει δειχθεί ότι αυτό το γεγονός υφίσταται, διότι σε ορισμένα από τα βήματα του πολλαπλασιασμού των Picorna ιών, επιπρόσθετα των ώριμων πρωτεϊνών, απαιτείται η ύπαρξη κάποιου δραστικού προδρόμου μορίου. Επομένως, η καθυστερημένη πρωτεόλυση, μέσω της παρουσίας μιας μη - άριστης θέσης πρωτεόλυσης, θα μπορούσε να αποτελεί έναν πιθανό

μηχανισμό για την διατήρηση τέτοιων προδρόμων μορίων σε κάποιο επίπεδο. Ένδειξη για τα παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι στους πολιοϊούς, η πρωτεόλυση του προδρόμου μορίου των καψιδικών πρωτεϊνών απαιτεί το πρόδρομο μόριο 3CD^{pro} κι επομένως, η μη κατάλληλη αλληλουχία μεταξύ των 3C και 3D μπορεί να εξυπηρετεί την διατήρηση του προδρόμου 3CD^{pro} σε υψηλά επίπεδα (Yrma-Wong et al., 1988a, Yrma-Wong et al., 1988b).

A1.2.3.5. Η πρωτεΐνη VPg

Η VPg είναι μία πρωτεΐνη μικρού μεγέθους (περίπου 23 κατάλοιπα), η οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη στο 5' άκρο του νεοσυντιθέμενου RNA των Picorna ιών. Η σημασία της πρωτεΐνης, όπως προκύπτει από συγκριτικές μελέτες διαφόρων εντεροϊών, είναι μικρή, με εξαίρεση την παρουσία ενός συντηρημένου καταλοίπου τυροσίνης (στην θέση 3), το οποίο σχετίζεται με την ομοιοπολική σύνδεση στο ιϊκό RNA. Επιπρόσθετα, η VPg έχει κατά καιρούς συσχετισθεί, χωρίς να υπάρχουν άμεσες αποδείξεις, με τον πολλαπλασιασμό του RNA των Picorna ιών, ενώ διάφορες μελέτες υποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη μπορεί, υπό την απουσία άλλων παραγόντων, να προσκολλάται ομοιοπολικά στο RNA (Tobin et al., 1989). Σύμφωνα με την τελευταία αυτή παρατήρηση προτείνεται ότι είτε η VPg, είτε το ίδιο το γενετικό υλικό των Picorna ιών (RNA), είτε ένας συνδυασμός αυτών, αντιπροσωπεύουν το ενεργό κέντρο αυτής της ενζυμικής αντίδρασης, χωρίς να θεωρείται απαραίτητη η δράση επιπρόσθετων βιολογικών μορίων.

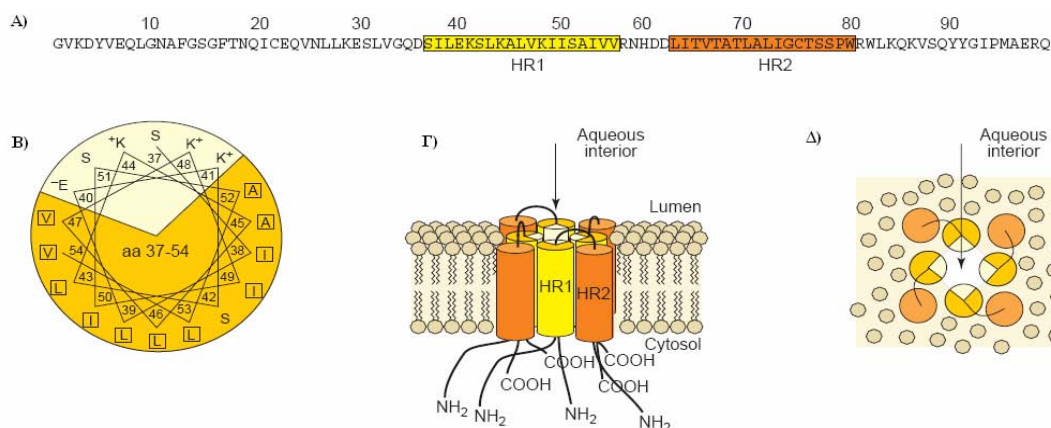
A1.2.3.6 Οι λειτουργικές πρωτεΐνες 2B και 3A

Υπάρχουν ελάχιστα δεδομένα σχετικά με την λειτουργικότητα των μη δομικών πρωτεϊνών 2B και 3A. Ωστόσο, κάποια βιβλιογραφικά δεδομένα εμπλέκουν την 2B σε πιθανό μηχανισμό καθορισμού του εύρους των ξενιστών κάποιων Picorna ιών, και ειδικότερα των Ρινοϊών (Lomax and Yin, 1989). Επίσης, η 2B έχει πρόσφατα συσχετισθεί με τις κυτταροπλασματικές μεταβολές, που επάγονται στο κύτταρο ξενιστή λόγω της ιϊκής μόλυνσης καθώς επίσης και με την επαγωγή ενός αντι-αποπτωτικού μηχανισμού στα μολυσμένα κύτταρα, ο οποίος προφυλάσσει τους εντεροϊούς από πιθανή πρόωρη διακοπή του βιολογικού τους κύκλου (Van Kuppeveld et al., 1997).

Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η μόλυνση ενός ξενιστικού κυττάρου από ιό Cocksackie προκαλεί μία ταχεία μείωση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων σε ιόντα Ca²⁺ (Van Kuppeveld et al., 1997). Μάλιστα, αυτή η μείωση μπορεί πειραματικά να

προκληθεί σε κύτταρα RD και CHO, μέσω αποκλειστικής έκφρασης της πρωτεΐνης 2B, η οποία εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο μεμβρανικό σύστημα του συμπλέγματος Golgi. Επίσης, η έκφραση της 2B φαίνεται να επιδρά στην αύξηση των επιπέδων Ca^{2+} στο κυτοσόλιο (Aldabe et al., 1997, Campanella et al., 2004, Van Kuppeveld et al., 1997), πιθανώς ως αποτέλεσμα μιας δυναμικής εισόδου ιόντων Ca^{2+} μέσω ενός μηχανισμού, που αντιλαμβάνεται την κατάσταση των ενδοκυτταρικών αποθεμάτων Ca^{2+} και επάγει το άνοιγμα ειδικών αντλιών ασβεστίου στην πλασματική μεμβράνη.

Οι 2B πρωτεΐνες των εντεροϊών έχουν μήκος περίπου 100 αμινοξέων και περιέχουν δύο υδρόφοβες περιοχές, η πρώτη από τις οποίες έχει προβλεφθεί ότι σχηματίζει μία κατιονική αμφιπαθητική α -έλικα, με χαρακτηριστικά, όμοια με εκείνα των μεμβrano-λυτικών πολυπεπτιδίων (Van Kuppeveld et al., 1996). Αυτά τα πολυπεπτίδια αυξάνουν την διαπερατότητα των μεμβρανών, πιθανώς μέσω κάλυψης της κυτταρικής επιφάνειας και επακόλουθης διαταραχής στη δομή διπλοστιβάδας (carpet model) της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ή μέσω δόμησης διαμεμβρανικών πόρων, οι οποίοι σχηματίζονται από πολυμερή, που εκθέτουν την υδροφοβική τους περιοχή στην λιπιδική διπλοστιβάδα και την υδροφυλική τους, τη μία απέναντι από την άλλη, σχηματίζοντας ένα υδάτινο κάλυμμα (barrel-stave model). Υπάρχουν διάφορες παρατηρήσεις (Agirre et al., 2002, Cuconati et al., 1998, De Jong et al., 2003, De Jong et al., 2004, Van Kuppeveld et al., 2002), οι οποίες υποστηρίζουν το δεύτερο μοντέλο (barrel-stave model) έναντι του πρώτου (carpet model) με αποτέλεσμα να πιστεύεται σήμερα, ότι η 2B πρωτεΐνη σχηματίζει πόρους στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi, αυξάνοντας έτσι, τη διαπερατότητά τους για τα ιόντα Ca^{2+} και πιθανώς και για άλλα ιόντα.



Εικόνα 9. Σχηματισμός πόρων από ομοδιμερή 2B πρωτεϊνών. Α) Η Αμινοξική αλληλουχία της 2B πρωτεΐνης των Coxsackie ιών. Οι υδρόφοβες περιοχές HR1 και HR2 απεικονίζονται μέσα σε πλαίσιο. Β) Κυκλικό διάγραμμα της αμφιπαθητικής α-έλικας, που διαμορφώνεται από την περιοχή HR1. Τα υδρόφοβα κατάλοιπα (μέσα σε πλαίσιο) βρίσκονται τοποθετημένα στη μία πλευρά της α-έλικας ενώ τα φορτισμένα και πολικά κατάλοιπα βρίσκονται συγκεντρωμένα στην άλλη πλευρά. Γ) Μπροστινή απεικόνιση και Δ) απεικόνιση της πάνω όψης της τοπολογίας των πόρων, που σχηματίζονται από τα 2B-ομοδιμερή σύμφωνα με το μοντέλο «βαρελοσανίδας». Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, η 2B αποκτά έναν σχηματισμό μορφής «έλικα – θηλιά – έλικα», στον οποίο τόσο η HR1 όσο και η HR2 διαπερνούν τη μεμβράνη. Ανατύπωση από Van Kuppeveld et al., 2005

Η παρατηρημένη ικανότητα της 2B να μεταβάλλει τη συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου, έχει περαιτέρω συσχετισθεί, τόσο με τις δομικές μεταβολές που πραγματοποιούνται σε ένα μολυσμένο, από εντεροϊό, κύτταρο προκειμένου να επιτευχθεί ο ιϊκός πολλαπλασιασμός, όσο και με την καθυστέρηση της επαγόμενης από το κύτταρο απόπτωσης. Όσον αφορά στην πρώτη περίπτωση, έχει δειχθεί, ότι μία από τις σημαντικότερες μορφολογικές αλλαγές, που παρατηρούνται σε κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί από κάποιον εντεροϊό, είναι η μαζική συσσώρευση στο κυτοσόλιο, μεμβρανικών κυστιδίων, προερχόμενων από το ενδοπλασματικό δίκτυο (ER) και το σύμπλεγμα Golgi (Bienz et al., 1994). Αυτά τα κυστίδια αποτελούν την περιοχή, όπου πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός των ιϊκών RNA. Η 2BC πρόδρομος πρωτεΐνη, έχει αναγνωρισθεί ως ο κύριος υπεύθυνος αυτής της συσσώρευσης (Bienz et al., 1994) αλλά ο υποκείμενος μηχανισμός παραμένει άγνωστος. Έχει, ωστόσο, δειχθεί, ότι μεταλλαγές που επηρεάζουν την ικανότητα της 2B να δημιουργεί πόρους, έχουν σαν συνέπεια πρόωρη διακοπή του πολλαπλασιασμού των εντεροϊών, πιθανώς εξαιτίας του ότι επηρεάζεται η λειτουργία της 2B στο σύμπλοκο 2BC. Επίσης, άλλες μελέτες υποστηρίζουν, ότι η έκφραση της 2B παρεμποδίζει την κυστιδιακή πρωτεϊνική μεταφορά (Doedens and Kingegaard., 1995). Τέλος, έχει υποστηριχθεί ότι η μείωση των επιπέδων

Ca^{2+} των οργανιδίων του ξενιστικού κυττάρου εμπλέκεται σε γεγονότα Ca^{2+} -εξαρτώμενης μεμβρανικής σύντηξης, τα οποία απαιτούν τοπική απελευθέρωση Ca^{2+} (Merz and Wickner, 2004). Μπορεί επομένως να υποθεθεί, ότι η 2B, μέσω της ικανότητάς της να μειώνει το περιεχόμενο του ενδοπλασματικού δικτύου και του συμπλέγματος Golgi σε Ca^{2+} , σχετίζεται με Ca^{2+} -εξαρτώμενα γεγονότα σύντηξης, και ότι, κατά συνέπεια, αυτή η λειτουργία συνεισφέρει στην συσσώρευση των μεμβρανικών κυστιδίων, που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA από της 2BC.

Όσον αφορά στη συμμετοχή της 2B στους αποπτωτικούς μηχανισμούς του ξενιστικού κυττάρου, υπάρχουν ολόένα και περισσότερες αποδείξεις που την υποστηρίζουν. Προγενέστερες μελέτες είχαν δείξει, ότι οι εντεροϊοί, μέσω αυτής της καταστολής της απόπτωσης, ελέγχουν ενεργά τον κυτταρικό θάνατο, που επάγεται στο κύτταρο ξενιστή, λόγω των μεταβολικών και δομικών μεταβολών, που συνοδεύουν την ιϊκή μόλυνση (Agol et al., 2000, Tolskaya et al., 1995). Συγκεκριμένα, οι Agol et al. (Agol et al., 2000) και οι Campanella et al. (Campanella et al., 2004) έχουν αποδείξει, ότι κατά την διάρκεια της μόλυνσης κυττάρων HeLa από πολιοϊούς ή Coxsackie ιούς, εκφράζονται κάποιες ιϊκές λειτουργίες, οι οποίες οδηγούν τα κύτταρα αυτά σε απόπτωση. Η αποπτωτική αντίδραση των κυττάρων πιθανώς επάγεται μέσω των επιδράσεων των ιϊκών πρωτεϊνών $3C^{pro}$ και $2A^{pro}$, οι οποίες καταστέλλουν την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση, αντίστοιχα. Ωστόσο, φαίνεται, ότι οι πλήρεις αποπτωτικές διαδικασίες των κυττάρων προωθούνται κάτω από συνθήκες, οι οποίες είναι μη παραγωγικές (π.χ όταν ο ιϊκός πολλαπλασιασμός αναστέλλεται), γεγονός που υποδεικνύει, ότι κάτω από συνθήκες ευνοϊκές για την ιϊκή ανάπτυξη, η απόπτωση καταστέλλεται από κάποια αντι-αποπτωτική λειτουργία (Tolskaya et al., 1995). Φαίνεται, μάλιστα, ότι αυτή η αντι-αποπτωτική κατάσταση, που παρατηρείται σε κύτταρα HeLa μολυσμένα με πολιοϊούς και ιούς Coxsackie παρέχει προστασία στα κύτταρα έναντι μη ιϊκών αντι-αποπτωτικών παραγόντων, όπως είναι το κυκλοεξαμίδιο και η ακτινομυκίνη D (Campanella et al., 2004). Μετά την ολοκλήρωση, βέβαια, του ιϊκού πολλαπλασιασμού, εμφανίζονται στα κύτταρα αυτά σημάδια απόπτωσης (ελευθέρωση κυτοχρώματος C και ενεργοποίηση κασπασών), υποδεικνύοντας, ότι η αντι-αποπτωτική λειτουργία μάλλον καθυστερεί παρά μπλοκάρει το αποπτωτικό πρόγραμμα των ξενιστικών κυττάρων.

Η πρώτη απόδειξη για την συμμετοχή της 2B στον παραπάνω αντι-αποπτωτικό μηχανισμό των εντεροϊών προέκυψε μέσω έκφρασης της πρωτεΐνης σε κύτταρα HeLa, τα οποία είχαν επαχθεί προς απόπτωση με την χρήση κυκλοεξαμιδίου και ακτινομυκίνης D (Campanella et al., 2004). Τα πειράματα αυτά έδειξαν, ότι η έκφραση της πρωτεΐνης

καθιστά τα κύτταρα ανθεκτικά στην απόπτωση. Πιστεύεται, δε, ότι η ικανότητα της 2B να διαταράσσει την ομοιόσταση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, σχετίζεται άμεσα με την αντι-αποπτωτική της δράση, μιας και μεταλλαγμένα 2B παράγωγα, τα οποία έχουν χάσει την ικανότητα επίδρασης στις αντλίες Ca^{2+} , χάνουν ταυτόχρονα την ικανότητα να προστατεύουν κύτταρα τα οποία, μέσω γενοτοξικών ουσιών, υποβάλλονται σε συνθήκες απόπτωσης (Campanella et al., 2004). Τέλος, η συσχέτιση της 2B με καταστολή της απόπτωσης μέσω μηχανισμού, που εμπλέκει την ενδοκυτταρική συγκέντρωση ιόντων Ca^{2+} , αποδεικνύεται από το γεγονός, ότι σε πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκε ως αποπτωτικός παράγοντας η ετοποσίδη (etoposide), η έκφραση της 2B δεν παρείχε θετικό αποτέλεσμα έναντι της ενεργοποίησης μηχανισμών απόπτωσης από την συγκεκριμένη ουσία. Το γεγονός αυτό, εξηγείται από τον διαπιστωμένο μηχανισμό δράσης της ετοποσίδης, η οποία ενεργοποιεί αποπτωτικές διαδικασίες στα κύτταρα μέσω μιας οδού διαφορετικής από εκείνη, που σχετίζεται με την συγκέντρωση του Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου, και ο οποίος πραγματοποιείται μέσω απελευθέρωσης κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια.

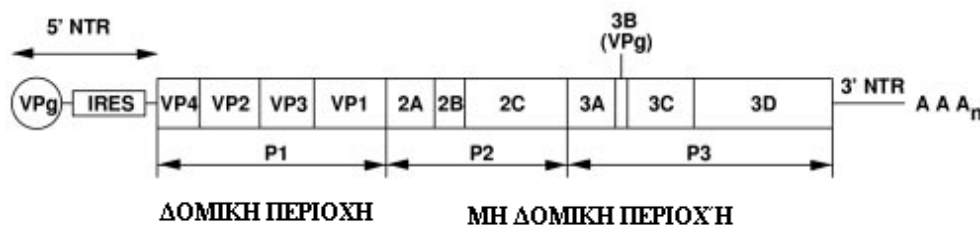
A1.2.4. Οργάνωση Γονιδιώματος

Οι Picorna ιοί ανήκουν στους μικρότερους RNA ιούς θηλαστικών, που είναι μέχρι σήμερα γνωστοί. Παρότι τα μέλη διαφορετικών γενών παρουσιάζουν ένα αρκετά χαμηλό ποσοστό ομοιότητας σε επίπεδο νουκλεοτιδίων, είναι ουσιαστικά ομόλογα με παρόμοια γενωμική δομή και οργάνωση γονιδίων.

Το γονιδίωμα όλων των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7200 – 8500 νουκλεοτίδια, είναι μεταγραφικά ενεργό και κωδικοποιεί για όλες τις πρωτεΐνες των ιών. Στους εντεροϊούς, διακρίνονται, από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), στην οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF), μήκους περίπου 2100 κωδικονίων, από το οποίο κωδικοποιούνται όλες οι (δομικές και λειτουργικές) πρωτεΐνες των ιών και, τέλος, μία 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), η οποία καταλήγει σε μία πολυαδενυλιωμένη ουρά - περιοχή (poly-A tract). Το ORF διαχωρίζεται επιπλέον στα γονιδιακά τμήματα 1A, 1B, 1C και 1D, τα οποία κωδικοποιούν για τις δομικές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1 αντίστοιχα, ενώ ακολουθούν τα 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C και 3D, που κωδικοποιούν για τις ομώνυμες λειτουργικές πρωτεΐνες (Stanway, 1990).

Μεταξύ των διαφόρων μελών τις οικογένειας Picornaviridae διακρίνονται κάποιες σημαντικές διαφοροποιήσεις στην γονιδιακή τους οργάνωση (Palmenberg, 1987). Για παράδειγμα, στους καρδιοϊούς και αφθοϊούς, η 5' UTR διαθέτει μία πολυκαρβοξυλιωμένη επέκταση (poly-C tract), η οποία δεν συναντάται στους εντεροϊούς και ρινοϊούς. Τα ίδια γένη (καρδιοϊοί και αφθοϊοί) χαρακτηρίζονται περαιτέρω από την ύπαρξη ενός γονιδιακού τμήματος, που προηγείται της 1A γονιδιακής περιοχής και το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη «οδηγό» (leader protein). Τέλος, οι αφθοϊοί διαθέτουν τρεις τύπους αλληλουχιών, οι οποίες είναι παρόμοιες αλλά όχι πανομοιότυπες, και οι οποίες κωδικοποιούν για την ίδια πρωτεΐνη, την VPg. Οι ίδιοι ιοί έχουν μία εξαιρετικά μικρή 2A γονιδιακή περιοχή.

Οι περισσότερες πληροφορίες, σχετικά με την οργάνωση και πιθανή λειτουργία του γονιδιώματος των εντεροϊών προέρχονται από μελέτες, οι οποίες έγιναν εφικτές μετά τον καθορισμό της πρωτοδιάταξης κάποιων μελών, με πρώτο το στέλεχος Mahoney του πολιοϊού τύπου 1 (Kitamura et al., 1981). Σήμερα, ολόκληρο το γονιδίωμα όλων των προτύπων ιών Εντεροϊών έχει προσδιοριστεί και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο, μέσω των διεθνών τραπεζών δεδομένων, ενώ επιπρόσθετα, διατίθεται η πλήρης ή μερική αλληλουχία πολλών κλινικών στελεχών.



Εικόνα 10. Το γονιδίωμα των εντεροϊών. Διακρίνονται από το 5' προς το 3' άκρο η 5'αμετάφραστη περιοχή (5' UTR), το δομικό (P1) και το λειτουργικό (P2) γονιδίωμα και η 3'αμετάφραστη περιοχή (3' UTR), με την πολυ -A απόληξη.

A1.2.4.1. Η 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR)

Η 5' αμετάφραστη περιοχή των Picorna ιών είναι ασυνήθιστα μεγάλη σε σχέση με αντίστοιχες περιοχές πολλών κυτταρικών ή άλλων ιικών RNA γονιδιωμάτων, συνιστώντας το 8% – 12% της ολικής γενετικής πληροφορίας που περιέχουν. Μεταξύ στενά συγγενικών ιών, η 5' UTR αποτελεί, γενικά, το πιο ομόλογο τμήμα του γονιδιώματός τους και περιέχει ορισμένες ομάδες νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι μερικώς

ή ακόμη και πλήρως συντηρημένα (Stanway et al., 1984) από είδος σε είδος. Οι συγκεκριμένες ομάδες νουκλεοτιδίων διαθέτουν, πιθανότατα, συγκεκριμένο και σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή των ιών. Μάλιστα συντηρημένες αλληλουχίες αυτού του τύπου χρησιμοποιούνται σήμερα ως θέσεις υβριδοποίησης μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) για την επίτευξη στόχων ανίχνευσης μεγάλου εύρους ιών αυτής της οικογένειας (Hyypria et al., 1989, Siafakas et al., 2000, Torgersen et al., 1989).

Στους στενά συγγενικούς εντεροϊούς και ρινοϊούς, η στοίχιση των 5' UTR αλληλουχιών τους δείχνει ένα ποσοστό ομολογίας της τάξης του 60% στα πρώτα 600 νουκλεοτίδια, ενώ, στη συνέχεια, παρατηρείται μία εισαγωγή 100 – 140 νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα των εντεροϊών. Αυτό αποτελεί και ένα από τα λίγα χαρακτηριστικά, που διαφοροποιούν τους εντεροϊούς από τους ρινοϊούς σε μοριακό επίπεδο, όμως η λειτουργική του σημασία παραμένει αδιευκρίνιστη (Stanway, 1990). Η πιθανότητα το επιπλέον νουκλεοτιδικό τμήμα να παίζει κάποιο ρόλο – κλειδί - στην αντιγραφή των ιών είναι μάλλον μικρή μιας και στους εντεροϊούς το συγκεκριμένο τμήμα αποτελεί ταυτόχρονα και το πιο ετερογενές κομμάτι της 5' αμετάφραστης περιοχής τους (Toyoda et al., 1984). Ωστόσο υπάρχει μία αρκετά μεγάλη πιθανότητα, ότι το μήκος και η γενικότερη φύση αυτής της περιοχής είναι κατά κάποιο τρόπο σημαντικά για τον καθορισμό των ιδιοτήτων των εντεροϊών στο ξενιστικό περιβάλλον. Αυτή η πιθανότητα υποδεικνύεται και από παλαιότερες εργασίες (Iizuka et al., 1989) στις οποίες έχει δειχθεί, ότι μεταλλαγμένα στελέχη εντεροϊών, τα οποία στερούνται της συγκεκριμένης γενετικής περιοχής, παρουσιάζουν μειωμένη νευρομολυσματικότητα (neurovirulence).

Εξαιρετικής της ποικιλομορφίας, που παρουσιάζεται μεταξύ των εντεροϊών και των ρινοϊών λίγο πριν από το σημείο του ORF (ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης), δεν υπάρχουν άλλες σημαντικές διαφορές μεταξύ των 5' αμετάφραστων τμημάτων αυτών των ιών εκτός, ίσως, από ένα βαθμό ετερογένειας, που παρατηρείται ως προς το μήκος και τη νουκλεοτιδική σύνθεση γύρω από τη νουκλεοτιδική θέση 100. Αυτή η διαφοροποίηση είναι πιο εμφανής στους εντεροϊούς των βοοειδών (BVE- Bovine Enterovirus), όπου παρατηρείται μία μεγάλη προσθήκη (insertion) στην περιοχή αυτή, για την οποία δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί το εάν και κατά πόσο σχετίζεται με τη διακριτή παθογένεια ή την ποικιλία ξενιστών, που παρουσιάζουν οι συγκεκριμένοι ιοί (Earle et al., 1988). Αυτή η συντηρημένη εικόνα που παρουσιάζεται στις 5' UTR αλληλουχίες στενά συγγενικών ειδών υποδεικνύει την σημαντική τους λειτουργία ενώ πειράματα μεταλλαξογένεσης συστήνουν, ότι οι τροποποιήσεις, που μπορούν να

πραγματοποιηθούν στις 5' UTR θέσεις χωρίς να επηρεαστούν, σε κάποιο βαθμό, τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των ιών, είναι λίγες (Kuge and Nomoto, 1987, Trono et al., 1988).

Σε όλους τους Picorna ιούς, η 5' UTR παρουσιάζει κάπως διαφορετική νουκλεοτιδική σύνθεση από το υπόλοιπο γένωμα (Stanway et al., 1984, Palmenberg, 1987). Συγκεκριμένα, παρατηρείται μία μειωμένη περιεκτικότητα σε κατάλοιπα αδενίνης (A) και αντιστοίχως μία αυξημένη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη (C). Το αυξημένο ποσοστό βάσεων G και C μπορεί να αντανάκλα το γεγονός, ότι η δευτεροταγής οργάνωση παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργικότητα της 5' UTR. Στην περίπτωση των εντεροϊών και ρινοϊών, διάφορες εργασίες πρόβλεψης δευτεροταγούς δομής με συστήματα ηλεκτρονικών υπολογιστών, έχουν παράγει ένα μοντέλο δευτεροταγούς διαμόρφωσης, το οποίο είναι εφαρμόσιμο σε όλα τα στελέχη που έχουν μελετηθεί, αλλά διαφέρει από το προβλεπόμενο μοντέλο αναδίπλωσης των καρδιοϊών και αφθοϊών (Pilipenko et al., 1989, Rivera et al., 1988, Skinner et al., 1989). Σύμφωνα με το προαναφερόμενο μοντέλο, υπάρχουν τρεις κύριες προβλεπόμενες δευτεροταγείς δομικές περιοχές, οι οποίες εντοπίζονται στις θέσεις 236 – 443, 451 – 559 και 581 – 620 (αρίθμηση με βάση τον πολιοϊό τύπου 3). Η πρώτη από αυτές τις περιοχές περιλαμβάνει τη θέση πρόσδεσης μιας πρωτεΐνης, η οποία σηματοδοτεί την έναρξη της σύνθεσης του ιϊκού mRNA (Andino, 1990), ενώ η δεύτερη, η περιοχή IRES (Internal Ribosome Entry Sight) αποτελεί περιοχή πρόσδεσης των ριβοσωμάτων για την έναρξη της μετάφρασης, ενώ ταυτόχρονα συνιστά καθοριστικό παράγοντα του τροπισμού και της παθογένειας των ιών (Kauder and Racaniello, 2004). Η τελευταία περιοχή, αν και η ακριβής λειτουργία της δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί πλήρως, περιέχει πολλές τριπλέτες AUG πριν από το σημείο έναρξης της μετάφρασης καθώς και το ίδιο το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (Witwer et al., 2001). Η ύπαρξη των προαναφερόμενων περιοχών υποστηρίζεται από το φαινόμενο της «συμμεταβλητότητας» (covariance) δηλαδή της διατήρησης παρόμοιων προβλεπόμενων δευτεροταγών δομικών χαρακτηριστικών μεταξύ διαφορετικών ιών, ανεξαρτήτως της παρατηρούμενης ποικιλίας στη νουκλεοτιδική τους σύσταση. Οι δομές διατηρούνται μέσω μεταλλαγών, οι οποίες δεν επηρεάζουν τη δυνατότητα ζευγαρώματος μεταξύ γειτονικών βάσεων του μίσχου (stem) της δευτεροταγούς διακλάδωσης (π.χ. μεταλλαγή από C-G σε U-G) ή μέσω διπλών, αντισταθμιστικών μεταλλαγών (π.χ. μεταλλαγή από C-G σε A-U). Η συντηρημένη παρουσία αυτών των χαρακτηριστικών συστήνει, ότι έχουν συγκεκριμένη λειτουργική σημασία.

Οι λειτουργίες της 5' UTR δεν έχουν πλήρως καθοριστεί μέχρι σήμερα αν και πραγματοποιούνται συνεχώς εκτενείς έρευνες γύρω από τον συγκεκριμένο τομέα. Είναι πιθανό, ότι η 5' UTR περιέχει αλληλουχίες, οι οποίες εμπλέκονται στο «πακετάρισμα» και στην αντιγραφή του ιϊκού RNA, ενώ οι δευτεροταγείς δομές, που περικλείει, είναι πιθανότατα σημαντικές για την σταθερότητα του RNA. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με τη λειτουργικότητα της 5' UTR έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από τον τομέα της μετάφρασης της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Pelletier et al., 1988a, Bienkowska-Szewczyk and Ehrenfeld, 1988). Έχειδειχθεί, ότι η σύνθεση της πολυπρωτεΐνης των Picorna ιών ακολουθεί της πρόσδεσης των ριβοσωμάτων σε συγκεκριμένες αλληλουχίες εντός της 5' UTR, οι οποίες συνιστούν την επονομαζόμενη «εσωτερική θέση εισόδου των ριβοσωμάτων» (IRES-Internal Ribosome Entry Site). Αυτή η διαδικασία έρχεται σε αντίθεση με το μοντέλο «σάρωσης» το οποίο πιστεύεται, ότι τηρείται στην πλειοψηφία των κυτταρικών mRNA. Σύμφωνα με το τελευταίο μοντέλο η αρχική αλληλεπίδραση πραγματοποιείται μεταξύ των ριβοσωμάτων και του 5' άκρου του mRNA (Kozak, 1989). Στη συνέχεια τα ριβοσώματα ολισθαίνουν κατά μήκος του κυτταρικού mRNA και σηματοδοτούν την έναρξη της μετάφρασης στο πρώτο AUG κωδικόνιο που θα συναντήσουν ή, σε μερικές περιπτώσεις, σε ένα επόμενο AUG, το οποίο βρίσκεται σε πιο ευνοϊκή, από άποψη νουκλεϊδικής συστοιχίας, θέση. Η ανάλυση αρκετών εκατοντάδων mRNA μορίων έχει δείξει, ότι η συνήθης αλληλουχία έναρξης της μετάφρασης είναι η 5'...GCC(A/G)CCAUGG...3', στην οποία τα υπογραμμισμένα κατάλοιπα (-3 και +4) είναι ιδιαίτερα σημαντικά. Παρά τις διαφοροποιήσεις μεταξύ των ιϊκών RNA και των κυτταρικών mRNA, όσον αφορά στο σημείο εισόδου των ριβοσωμάτων, έχειδειχθεί, ότι μία αλληλουχία παρόμοια με το προαναφερόμενο μοτίβο εντοπίζεται συχνά γύρω από την θέση έναρξης του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) και στους περισσότερους Picorna ιούς.

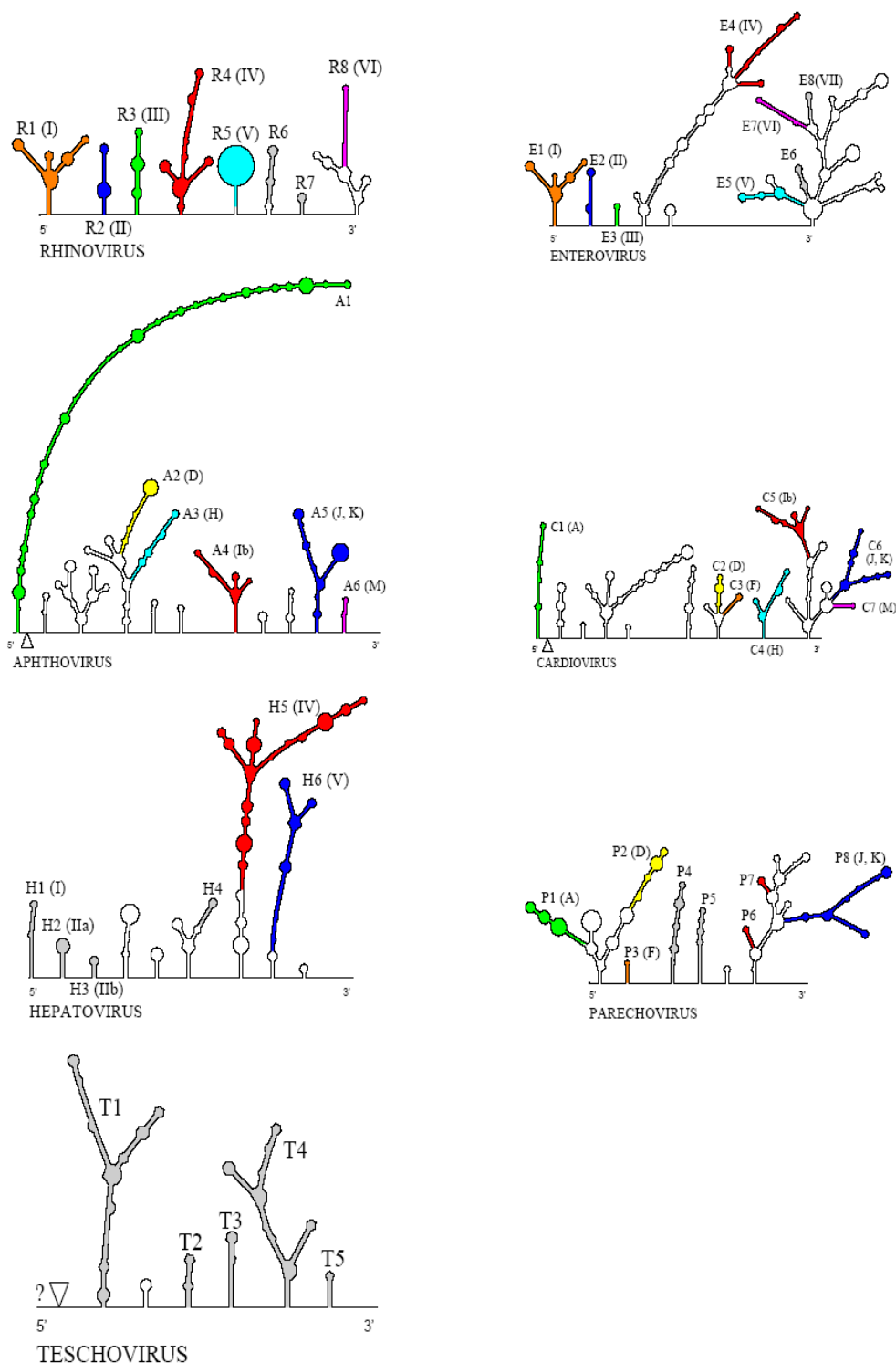
Η εσωτερική πρόσδεση των ριβοσωμάτων και η έναρξη της μετάφρασης κατά τον τρόπο που περιγράφηκε, πιστεύεται ότι παρέχει στους Picorna ιούς το πλεονέκτημα της ανεξάρτητης - από το σύμπλεγμα Cap - μετάφρασης καθώς και της δυνατότητας να μεταφράζονται επιλεκτικά, όταν το σύμπλεγμα πρόσδεσης Cap απενεργοποιείται και η σύνθεση των πρωτεϊνών του ξενιστικού κυττάρου αναστέλλεται, φαινόμενα, τα οποία υφίστανται συχνά κατά τη διάρκεια λοιμώξεων από Picorna ιούς.

Επιπρόσθετα της εσωτερικής πρόσδεσης των ριβοσωμάτων στην 5' UTR, πειραματικές εργασίες έχουν δείξει την ύπαρξη δομικών στοιχείων (elements), τα οποία παρουσιάζουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την μετάφραση *in vitro*. Στον ανθρώπινο

ρινοϊό 14 (HRV-14) ένα τέτοιο ανασταλτικό στοιχείο φαίνεται να εντοπίζεται στη θέση 490-550, ενώ στον πολιοϊό τύπου 1, έχει χαρτογραφηθεί ένα παρόμοιο στοιχείο μεταξύ των νουκλεοτιδίων 70 και 381 (Alssaadi et al., 1989, Pelletier et al., 1988b). Δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί το εάν αυτές οι παρατηρήσεις έχουν κάποια σημασία *in vivo*, αλλά στην περίπτωση που κάτι τέτοιο ισχύει, τότε ένα τέτοιο στοιχείο, το οποίο μπορεί να βασίζεται στην δευτεροταγή διαμόρφωση των νουκλεοτιδίων στις προκείμενες θέσεις, θα μπορούσε να εμπλέκεται σε κάποιας μορφής μεταφραστικό έλεγχο. Ο έλεγχος θα μπορούσε να διαμεσολαβείται από κυτταρικές και / ή ιϊκές πρωτεΐνες μιας και υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις για την αλληλεπίδραση μεταξύ κυτταρικών πρωτεϊνών και τμημάτων του 5' UTR γονιδιώματος στους πολιοϊούς και στους καρδιοϊούς (Boronyagin et al., 1990, Del Angel et al., 1989, Sonenberg and Pelletier, 1989). Μάλιστα, έχει προταθεί, ότι η παρουσία, στα κύτταρα, διαφορετικών επιπέδων αυτών των πρωτεϊνών μπορεί να καθορίσει, μέχρι ενός σημείου, τον ιστικό τροπισμό των πολιοϊών και πιθανότατα άλλων Picorna ιών.

Η 5' UTR περιοχή του γονιδιώματος των Picorna ιών βρίσκεται, τα τελευταία χρόνια, στο επίκεντρο πολλών πειραματικών ερευνών για την κατανόηση της νευρομολυσματικότητας και συνεπώς της εξασθένησης των πολιοϊών. Μελέτες συγκριτικής ανάλυσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας τριών πολιοϊών τύπου 3, οι οποίοι διέφεραν ως προς την νευρομολυσματικότητά τους, αποκάλυψαν, ότι ένα μοναδικό νουκλεοτίδιο στην 5' UTR (θέση 472) σχετίζεται με τον μολυσματικό φαινότυπο (Stanway et al., 1983, Stanway et al., 1984, Cann et al., 1984). Επέκταση των ερευνών σε περισσότερα στελέχη, μέσω μερικού προσδιορισμού της πρωτοταγούς διάταξης (sequencing) και στη συνέχεια, μέσω *in vitro* χειρισμού των ιών, έδειξε, ότι η μετάλλαξη στην θέση 472 μίας βάσης (από C σε U) μεταξύ μολυσματικών και εξασθενημένων στελεχών αποτελεί κύριο καθοριστή της εξασθένησης των στελεχών (Evans et al., 1985, Westrop et al., 1989). Η αιτία για την οποία συμβαίνει κάτι τέτοιο δεν έχει εξακριβωθεί, όμως έχουν αναφερθεί αλλαγές στην προβλεπόμενη δευτεροταγή οργάνωση της 5' UTR (Skinner et al., 1989), οι οποίες πιθανώς σχετίζονται με την προαναφερόμενη μετάλλαξη και οι οποίες πιθανώς επιδρούν, στη συνέχεια, σε μεταφραστικό επίπεδο (Svitkin et al., 1985). Επίσης, σημειακές μεταλλάξεις κοντά στη θέση 472 φαίνεται να είναι σημαντικές για την εξασθένηση εμβολιακών στελεχών πολιοϊών τύπου 1 και 2 (Kawamura et al., 1989, Pollard et al., 1989). Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω ενδείξεις γίνεται σαφές, ότι η 5' UTR διαδραματίζει κυρίαρχο ρόλο στον καθορισμό των βιολογικών ιδιοτήτων των Picorna ιών, ενώ πιο πρόσφατες μελέτες

καθορισμού πρωτοδιάταξης και άλλες μορφές μοριακής ανάλυσης έχουν ήδη ξεκινήσει να παρέχουν μία πιο αναλυτική εικόνα της φύσης αυτού του ρόλου (Stanway G., 1990).



Εικόνα 11. Σχηματική αναπαράσταση των 5' μη κωδικών περιοχών των μελών της οικογένειας Picornaviridae. Απεικονίζεται η δομή ελαχίστης ενέργειας κάθε ιικού γένους. Οι έγχρωμες περιοχές αναπαριστούν θέσεις, οι οποίες είναι συντηρημένες μεταξύ όλων των μελών του αντίστοιχου γένους. Ανατύπωση από Witwer et al., 2001.

A1.2.4.2. Η 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR)

Η 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR) του γονιδιώματος των Picorna ιών έχει μήκος, που ποικίλλει μεταξύ διαφορετικών μελών της οικογένειας (από 40 νουκλεοτίδια στους ρινοϊούς έως 126 νουκλεοτίδια στους καρδιοϊούς). Στους ρινοϊούς, η συγκεκριμένη περιοχή είναι πλούσια σε κατάλοιπα αδενίνης (A) και ουρακίλης (U), ενώ τα κατάλοιπα κυτοσίνης σπανίζουν, με αποτέλεσμα (λόγω του ότι η αδενίνη με την ουρακίλη σχηματίζουν διπλό δεσμό υδρογόνου) να μην προβλέπεται κάποια σταθερή δευτεροταγής δομή στην 3' UTR των ιών αυτών. Όσον αφορά στα λοιπά μέλη της οικογένειας των Picorna ιών, παρόμοιες, σταθερές δευτεροταγείς δομές είναι δυνατό να προβλεφθούν, ενώ η συντηρημένη παρουσία και η συμμεταβλητότητα, που παρουσιάζουν, συστήνει, ότι ίσως, αυτές οι περιοχές, διαθέτουν και κάποια λειτουργική σημασία (Auvinen et al., 1989, Inoue et al., 1989).

Με βάση την οργάνωση της 3' UTR οι εντεροϊοί μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες, εκείνη των πολιοϊών (η οποία περιλαμβάνει επιπρόσθετα τον εντεροϊό Coxsackie A21 και τους εντεροϊούς των βοοειδών) και εκείνη των Coxsackie B ιών (η οποία περιλαμβάνει επίσης τους εντεροϊούς των χοιροειδών, τον Coxsackie A9 και τους Echo ιούς 6 και 11). Η διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων έγκειται στο γεγονός, ότι η ομάδα των Coxsackie B ιών παρουσιάζει, στην 3' UTR, μία πλήρη διάταξη θηλειάς (Stem Loop), η οποία απουσιάζει από την ομάδα των πολιοϊών (Auvinen et al., 1989). Αντίθετα, στους πολιοϊούς, παρουσιάζονται, στην περιοχή αυτή του γονιδιώματος, δύο θηλιές (X και Ψ), οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής.

Η 3' UTR δεν περιέχει κάποιο σήμα πολυαδενυλίωσης, μιας και η πολυαδενυλιωμένη επέκτασή της φαίνεται να κωδικοποιείται γενετικά από τους ίδιους τους ιούς (Rueckert, 1985). Μπορεί, ωστόσο, να υφίσταται κάποιας μορφής μετα – μεταφραστική προσθήκη. Οι πολυ – A «ουρές» των μελών της οικογένεια Picornaviridae ποικίλλουν σε μήκος μεταξύ 35 (στους καρδιοϊούς) και 100 καταλοίπων (στους αφθοϊούς).

Σχετικά με την λειτουργικότητα της 3' UTR λίγα είναι γνωστά αν και αναμένεται, ότι το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδιώματος των εντεροϊών πιθανότατα περιέχει δομικά «σήματα», που σχετίζονται με την σύνδεση της πολυμεράσης. Η υπόθεση αυτή προέρχεται από μελέτες, οι οποίες έχουν πραγματοποιηθεί στους πολιοϊούς και οι οποίες συστήνουν, ότι η 3' UTR παίζει κάποιο ρόλο στην αντιγραφή τους (Rohll et al., 1995). Υπάρχουν πειραματικές αποδείξεις, ότι οι ιϊκές πρωτεΐνες 3AB και 3CD καθώς και μια

πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή μεγέθους 34-36 Kd δεσμεύονται στην 3' UTR. Μάλιστα, πειράματα μεταλλαξογένεσης, που αναστέλλουν την πρόσδεση της 3' UTR με τον προαναφερόμενο κυτταρικό παράγοντα φαίνεται, ότι παρεμβαίνουν στον πολλαπλασιασμό των ιών, πιθανότατα στο επίπεδο της σύνθεσης της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας RNA, προτείνοντας, ότι η αλληλεπίδραση αυτή είναι απαραίτητη για την αντιγραφή των πολιοϊών (Herold and Andino, 2001).

A1.3. ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Προκειμένου ένας ιός να μολύνει έναν ιστό, πρέπει πρώτα να προσδεθεί στην επιφάνεια των κυττάρων του ιστού. Σε αυτή τη διαδικασία πρόσδεσης που είναι συνήθως πολύ ειδική, εμπλέκονται διάφορες πρωτεΐνες της επιφάνειας του ιού και του κυττάρου-στόχου (Πίνακας 1).

Ιός	Υποδοχέας	Τύπος υποδοχέα	Συνυποδοχέας
Foot-and-mouth disease virus	Heparan sulfate	Glycosaminoglycan	
Foot-and-mouth disease virus	$\alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Encephalomyocarditis virus	Vcam-1	Ig-like	
Polioviruses 1-3	Pvr	Ig-like	
Coxsackievirus A13, A18, A21	Icam-1	Ig-like	
Coxsackievirus A21	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	Icam-1
Coxsackievirus B1-B6	Car	Ig-like	
Coxsackievirus B1, B3, B5	CD55	SCR-like (complement cascade)	$\alpha_v\beta_6$ -Integrin
Echoviruses 1, 8	$\alpha_2\beta_1$ -Integrin(Vla-2)	Integrin	β_2 -Microglobulin
Echoviruses 3, 6, 7, 11-13, 20, 21, 24, 29, 33	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	β_2 -Microglobulin
Parechovirus 1	$\alpha_v\beta_1, \alpha_v\beta_3$ (Vitronectin receptor)	Integrin	
Enterovirus 70	Decay-accelerating factor (CD55)	SCR-like (complement cascade)	
Bovine enterovirus	Sialic acid	Carbohydrate	
Hepatitis A virus	HAVcr-1		
Major group rhinoviruses (91 serotypes)	Icam-1	Ig-like	
Minor group rhinoviruses (10 serotypes)	Low density lipoprotein receptor protein family	Signaling receptor	
Rhinovirus 87	Sialic acid	Carbohydrate	

Ig, immunoglobulin; SCR, short consensus repeat

Πίνακας 1. Οι κυτταρικοί υποδοχείς των picorna-ιών. Ανατύπωση από Melnick, 1996.

Η φύση των υποδοχέων των picorna-ιών, παρέμενε αδιασάφητη έως το 1989, όταν οι υποδοχείς για τους πολιοϊούς και τους ρινοϊούς ταυτοποιήθηκαν (Greve et al., 1989, Mendelsohn et al., 1989, Staunton et al., 1989). Χρησιμοποιώντας βιοχημικά εργαλεία, βρέθηκε ότι οι υποδοχείς των πολιοϊών είναι πρωτεϊνικά μόρια. Η επεξεργασία κυττάρων καλλιέργειας με θρυψίνη εμπόδισε την είσοδο των πολιοϊών όχι όμως των Cocksackie B ιών. Η επίδραση χυμοθρυψίνης είχε το αντίθετο αποτέλεσμα, προτείνοντας ότι τα λειτουργικά τμήματα του υποδοχέα των πολιοϊών απαιτούν αργινίνη ή λυσίνη, ενώ ο υποδοχέας των Cocksackie B περιέχει τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη, λευκίνη, μεθειονίνη, ασπαραγίνη ή γλουταμίνη (Crowell et al., 1983). Επιπλέον βιοχημικές μελέτες πρότειναν ότι οι υποδοχείς ήταν γλυκοπρωτεΐνες ενώ η γενετική ανάλυση προσδιόρισε τη θέση του υποδοχέα των πολιοϊών στο χρωμόσωμα 19. Σε διαφορετικούς γενετικούς τόπους του ίδιου χρωμοσώματος εντοπίστηκε η πληροφορία για τον υποδοχέα των ιών Cocksackie B3 και echovirus 11 (Rotbart and Kirkegaard 1992).

Ο υποδοχέας PVR (Poliovirus Receptor) χρησιμοποιείται από όλους τους τύπους των πολιοϊών. Περιγράφηκε για πρώτη φορά με τη χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων τα οποία εμπόδιζαν ειδικά την προσκόλληση και των τριών οροτύπων πολιοϊών, αλλά όχι αυτή των άλλων Picorna-ιών (Minor et al., 1984, Nobis et al., 1985). Με την επίτευξη της κλωνοποίησης του γονιδίου για τον PVR, η εύρεση της αλληλουχίας του γονιδίου, έδειξε ότι η πρωτεΐνη αυτή είναι μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (Mendelsohn et al., 1989). Ο PVR αποτελείται από ένα εξωτερικό τμήμα που περιέχει τρεις περιοχές που μοιάζουν με ανοσοσφαιρίνες, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μια κυτταροπλασματική απόληξη. Η κυτταρική λειτουργία του PVR πιθανόν να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση και τη συγκόλληση κυττάρων μεταξύ τους, όπως συμβαίνει και με άλλα μέλη της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών.

Ο υποδοχέας της κυτταρικής επιφάνειας για τη μείζονα ομάδα των ανθρώπινων ρινοϊών (περίπου 91 ορότυποι), ταυτοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μονοκλωνικά αντισώματα και η αμινοξική αλληλουχία αποκάλυψε μια δομική πρωτεΐνη 95kDa, μέλος επίσης της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών που ονομάζεται ICAM-1 (Greve et al., 1989). Το μόριο ICAM-1 συμμετέχει σε κυτταρικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφόρων τύπων ιστών καθώς και σε ανοσολογικές λειτουργίες (Springer, 1990, White and Littman 1989). Οι μελέτες με ηλεκτρονική μικροσκοπία έδειξαν ότι ο ICAM-1 έχει μήκος περίπου 19 nm (Staunton et al., 1990) και αποτελείται από πέντε εξωκυττάρια τμήματα

τύπου ανοσοσφαιρίνης (Greve et al., 1989, Staunton et al., 1990, Tomassini et al., 1989). Εκτός από τους ρινοϊούς αποτελεί υποδοχέα και για τους ιούς Coxsackie A13, A18 και A21 (Colonna et al., 1989).

Τα πειράματα για την ταυτοποίηση του κυτταρικού υποδοχέα της ομάδας των ιών Coxsackie B είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση και το χαρακτηρισμό μιας πρωτεΐνης περίπου 46kDa από κύτταρα HeLa (Bergelson et al., 1997, Carson et al., 1997, Tomko et al., 1997) που είναι γνωστή ως CAR (Coxsackievirus and Adenovirus Receptor) και αποτελείται από 365 αμινοξέα. Πρόκειται για μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών και περιέχει στο εξωκυττάριο τμήμα της μια αμινοτελική V-like και μια C2-like υπομονάδα. Το κυτταροπλασματικό τμήμα της πρωτεΐνης διαχωρίζεται από τη C2-like υπομονάδα με μια απλή διαμεμβρανική αλληλουχία. Έχει αναφερθεί ότι όταν το κυτταροπλασματικό και διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης απομακρύνθηκε (Wang and Bergelson 1999) η είσοδος των CBV σε κύτταρα Rd εξακολουθούσε να είναι εφικτή.

Επιπλέον οι ιοί Coxsackie B αλληλεπιδρούν με τον DAF/CD55 (Shafren et al., 1995). Οι αλληλεπιδράσεις των ιών Coxsackie B με τους CAR και DAF είναι αρκετά ετερογενείς ακόμα και μεταξύ στελεχών του ίδιου οροτύπου (Selinka et al., 2004). Στο παρελθόν είχε περιγραφεί άλλη μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας (nucleolin) στενά σχετιζόμενη με την ακτίνη του κυτταροσκελετού (Hovanessian et al., 2000) ως μέσο πρόσδεσης του ιού στο κύτταρο. Το πρωτεϊνικό αυτό μόριο της κυτταρικής επιφάνειας παρουσιάζει υψηλότερη συνάφεια με το 125S Coxsackie B προ-ιόσωμα παρά με το μολυσματικό 160S ιόσωμα γεγονός που αποτελεί ένδειξη για τη μη συμμετοχή του στην έναρξη ενός παραγωγικού για τον ιό μολυσματικού κύκλου.

Οι υποδοχείς CAR και DAF εκφράζονται αμφοτέρωθεν στην ανθρώπινη καρδιά. Υψηλά επίπεδα της πρωτεΐνης CAR απαντούν στους παρεμβαλλόμενους δίσκους (intercalated discs), περιοχές μέγιστης σημασίας για τη λειτουργική ακεραιότητα της καρδιάς. Σε αντίθεση με την αλληλεπίδραση των ιών Coxsackie B με τις πρωτεΐνες CAR όπου αρχίζει το «ξεδίπλωμα» του ιοσώματος, η πρόσδεση στις πρωτεΐνες DAF δεν οδηγεί σε δομικές αλλαγές στο ιικό καψίδιο (Pasch et al., 1999, Shafren et al., 1995). Έτσι ο ρόλος του DAF φαίνεται να περιορίζεται σε αυτόν του συν-υποδοχέα, καθώς διευκολύνει την παρουσίαση των ιοσωμάτων στις πρωτεΐνες CAR.

Μονοκλωνικά αντισώματα που εμποδίζουν τη μολυσματικότητα HeLa κυττάρων από echo ιό τύπου 1, χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοκατακρήμνιση πρωτεϊνών

υποδοχέων από τα HeLa κύτταρα. Οι δύο υπομονάδες της ιντεγκρίνης VLA-2 (Very Late Antigen-2), $\beta 1$ (130kDa) και $\alpha 2$ (125kDa), βρέθηκε να είναι τα μόρια που συνδέονται με τα μονοκλωνικά αντισώματα και εμποδίζουν την είσοδο του ιού στο κύτταρο (Bergelson et al., 1992). Η κυτταρική λειτουργία αυτής της ιντεγκρίνης είναι η προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία ενώ ταυτόχρονα συμβάλλει στην ενδοκυτταρική επικοινωνία με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Hynes, 1987). Οι κανονικοί εξωκυττάριοι συνδέτες του VLA-2 είναι το κολλαγόνο και η λαμινίνη ενώ οι ενδοκυττάριοι συνδέτες είναι η ταλίνη, η βινκουλίνη και η α -ακτίνη (Elices et al., 1989). Μελέτες έχουν δείξει ότι ο echo ιός τύπου 1 προσκολλάται στο τμήμα I (Inserted) εντός της υπομονάδας $\alpha 2$ (King et al., 1995) ενώ ο μηχανισμός πρόσδεσης του ιού στον υποδοχέα είναι διαφορετικός από αυτόν που χρησιμοποιεί ο υποδοχέας για την αλληλεπίδρασή του με μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας.

Πολλοί εντεροϊοί προσδένονται στον παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης (decay-accelerating factor) (DAF, CD55), που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ενεργότητας του συμπληρώματος (Bergelson et al., 1994, Karnachow et al., 1996, Shafren et al., 1997, Ward et al., 1998) Ο DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφοϊνοσιτόλης, που απαντά στη επιφάνεια της πλειοψηφίας των ορο-εκτιθέμενων κυττάρων και τα προστατεύει από τη λύση που προκαλεί το συμπλήρωμα, καθώς επιταχύνει την αποικοδόμηση των μετατροπασών του κλασσικού C3 και C5 μονοπατιού (Lublin and Atkinson 1989). Ο DAF αποτελείται από 4 μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Short Consensus Repeats-SCR) και από ένα τμήμα πλούσιο σε σερίνη και θρεονίνη, το οποίο συνδέεται με φωσφοϊνοσιτόλη (Lublin and Atkinson 1989). Διαφορετικές αλληλεπιδράσεις έχουν καταγραφεί κατά την πρόσδεση των εντεροϊών στον DAF. Έτσι ο Coxsackie A21 (CAV-21) και ο Enterovirus 70 (ENV-70) προσδένονται στην απομακρυσμένη από τη μεμβράνη αλληλουχία SCR1 (Karnachow et al., 1996, Shafren et al., 1997), ενώ όλοι οι Echo ιοί που αλληλεπιδρούν με τον DAF προσδένονται στο SCR3 με κάποιους από αυτούς να αλληλεπιδρούν επιπρόσθετα με την SCR2 και/ή την SCR4. Παρόλα αυτά, από μόνη της η πρόσδεση των εντεροϊών στον DAF δεν είναι αρκετή για την έναρξη ενός παραγωγικού για τον ιό μολυσματικού κύκλου (Shafren et al., 1997). Αν και έχουν ενοχοποιηθεί και άλλα μόρια για την κυτταρική πρόσδεση των εντεροϊών και είσοδό τους μέσω του DAF, αυτά που προκαλούν αμετάκλητες δομικές αλλαγές στο ιόσωμα, δεν έχουν ακόμα ταυτοποιηθεί (Goodfellow

et al., 2000b, Goodfellow et al., 2001, Spiller et al., 2002). Πρόσφατη ανάλυση με κρυομικροσκοπία της αλληλεπίδρασης του ιού Echo 7 με τον DAF, έδειξε ότι ο DAF δεν προσδένεται στην αύλακα, αλλά στην υπερμεταβλητή περιοχή της VP2 ακριβώς έξω από τη «νότια» άκρη της αύλακας καθώς επίσης και σε υπερμεταβλητή περιοχή της VP3 (He et al., 2002). Επίσης πειράματα κρυομικροσκοπίας έδειξαν ότι ο DAF προσδένεται στον ιό Echo 12 κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων της αλληλουχίας SCR3 με τη VP2 (Bhella et al., 2004).

Η αλληλεπίδραση ενός εντεροϊού με έναν υποδοχέα μπορεί να μην είναι επαρκής για την είσοδό του στο κύτταρο. Έτσι για τον Coxsackie A21 απαραίτητη είναι η παρουσία τόσο του DAF όσο και του ICAM-1 ως συνυποδοχέων προκειμένου να αρχίσει ένας παραγωγικός για τον ιό μολυσματικός κύκλος (Shafren et al., 1997). Επίσης κάποιοι Coxsackie B ιοί που προσδένονται στον DAF απαιτούν ως συνυποδοχείς $\alpha_6\beta_6$ -ιντεγκρίνες (Agrez et al., 1997), ενώ κάποιοι echo-ιοί που χρησιμοποιούν τις $\alpha_2\beta_1$ -ιντεγκρίνες ή τον DAF ως υποδοχέα, πιστεύεται ότι απαιτούν ως συνυποδοχέα τη β_2 -μικροσφαιρίνη (Ward et al., 1998).

A1.4. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

A1.4.1. Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, είσοδος στα κύτταρα και ξεδίπλωμα των ιών

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το καψίδιο των picorna-ιών είναι συγκροτημένο από αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών σχηματίζοντας εικοσαεδρική συμμετρία. Μεταξύ των μελών της οικογένειας, οι καψιδικές πρωτεΐνες είναι τοποθετημένες με παρόμοιο τρόπο, η αρχιτεκτονική της επιφάνειας όμως διαφέρει. Αυτή η διαφορά δεν σχετίζεται μόνο με τον ορότυπο, αλλά και με τον διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης με τους υποδοχείς. Έχειδειχθεί ότι οι αύλακες είναι οι θέσεις αλληλεπίδρασης του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς (Belnap et al., 2000, He et al., 2001, He et al., 2003, Kolatkar et al., 1999, Xiao et al., 2001). Μεταλλαγές σε αμινοξέα της αύλακας των πολιοϊών και των ρινοϊών μπορεί να επηρεάσουν τη συγγένεια πρόσδεσης με τους υποδοχείς (Colston et al., 1994, Colston et al., 1995, Harber et al., 1995, Liao et al., 1997). Αρχικά υπήρχε η θεώρηση ότι οι αύλακες είναι στενές και βαθιές προκειμένου να αποφεύγεται η προσκόλληση ογκωδών αντισωμάτων στο εσωτερικό της (Rossmann et al., 1989). Με αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστευόταν ότι αμινοξέα βασικά για την πρόσδεση με τον υποδοχέα προφυλάσσονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Δομικές μελέτες ενός συμπλέγματος ρινοϊού-αντισώματος, έδειξαν ότι το αντίσωμα μπορεί να διεισδύσει στην αύλακα όπως ακριβώς και ο υποδοχέας ICAM-1 (Smith et al., 1996) προτείνοντας έτσι ότι οι αύλακες δεν παίζουν ρόλο στην αποφυγή της ανοσολογικής αντίδρασης εναντίον του ιού.

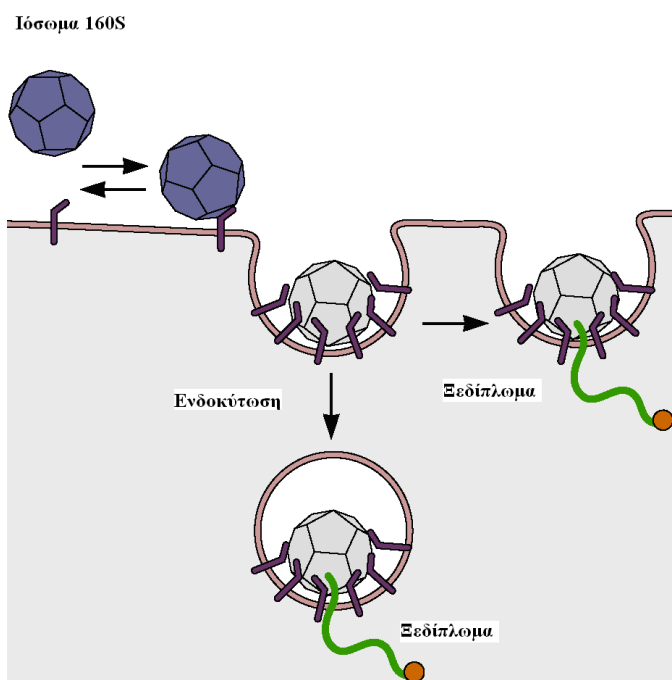
Η πρόσδεση των ιών σε διαλυτό μονομερή πρωτεϊνικό υποδοχέα *in vitro* προκαλεί μια αμετάκλητη δομική αλλαγή στο ιικό σωματίο η οποία εκδηλώνεται ως αλλαγή στα χαρακτηριστικά καθίζησης του ιού (από 160 S στο ώριμο ιόσωμα σε 135 S στο A-σωμάτιο) (Hoover-Litty and Greve, 1993). Παρόμοιες αλλαγές στο συντελεστή καθίζησης, έχουν παρατηρηθεί όταν ο ιός αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα στην κυτταρική επιφάνεια, και τέτοιοι μετασχηματισμοί θεωρείται ότι είναι βασικοί για την επιτυχή είσοδο του ιού και τη μόλυνση (Fenwick and Cooper, 1962, Guttman and Baltimore, 1977). Οι δομικές ανακατατάξεις που οδηγούν σε αλλαγές στην καθίζηση περιλαμβάνουν απώλεια της VP4 και εξωτερίκευση του N άκρου της VP1, που υπό κανονικές συνθήκες εδράζει εσωτερικά στο καψίδιο περιβάλλοντας τις πενταμερείς κορυφές του ώριμου ιοσώματος. Το προεξέχον άκρο της VP1, το οποίο είναι υδρόφοβο,

ενώνεται με τη μεμβράνη και σχηματίζει μια δίοδο μέσω της οποίας το γένωμα του ιού εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (Guttman and Baltimore, 1990).

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το καψίδιο των Coxsackie A9 και των αφθοϊών καθώς πιστεύεται ότι προσδένονται στους κυτταρικούς υποδοχείς μέσω ενός τριπεπτιδίου Αργινίνης-Γλυκίνης-Ασπαρτικού οξέος (RGD motif) το οποίο αναγνωρίζεται από τις ιντεγκρίνες των κυττάρων και εμφανίζεται σαν μια επιπρόσθετη, σε σύγκριση με τους υπόλοιπους εντεροϊούς, αλληλουχία 17 αμινοξέων στο υδρόφιλο και προς την επιφάνεια του καψιδίου καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης VP1 (Roivainen et al., 1991).

Μετά την πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, το ιικό καψίδιο πρέπει να αποδομηθεί προκειμένου να απελευθερώσει το RNA το οποίο στη συνέχεια θα εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, όπου θα ακολουθήσει ο πολλαπλασιασμός του ιού. Για κάποιους picorna-ιούς, η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συνυποδοχέα. Για άλλους picorna-ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών προκειμένου να απελευθερωθεί το γένωμα του ιού.

Η αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον υποδοχέα τους, PVR, οδηγεί το καψίδιο σε δομικές αλλαγές. Σχηματίζονται τα *A σωμάτια* τα οποία περιέχουν το ιικό RNA, έχουν όμως χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, το N-τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, έρχεται στην επιφάνεια του *A σωματίου* (Fricks et al., 1990). Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και έτσι τα *A σωμάτια* έχουν αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιικό σωματίο. Έτσι σύμφωνα με μια υπόθεση εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο, η πρόσδεση στον υποδοχέα οδηγεί στις παραπάνω δομικές αλλαγές: το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο διαμέσου του οποίου το RNA ταξιδεύει προς το κυτταρόπλασμα (Εικόνα 12). Τα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία *A σωμάτια* όταν προστεθούν σε λιπιδική διπλοστιβάδα, επάγουν τη δημιουργία ιοντικών καναλιών, ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση (Tosteson et al., 1997). Αν και πιστεύεται ότι το RNA των πολιοϊών διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, δεν είναι γνωστό αν αυτό συμβαίνει μέσω της πλασματικής ή της ενδοσωματικής μεμβράνης. Φάρμακα όπως το bafilomycin A1, που εμποδίζουν την οξίνιση των ενδοσωμάτων μέσω αναστολής της μεταφοράς πρωτονίων στα κυστίδια, δεν ανέστειλαν τη μόλυνση με πολιοϊούς (Perez and Carrasco 1993).



Εικόνα 12. Το ιόσωμα προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα και υφίσταται τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούν την παραγωγή των A σωματίων τα οποία είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει τη VP4 καψιδική πρωτεΐνη. Το N-τελικό άκρο της VP1 έχει μεταφερθεί στην επιφάνεια και το ιικό RNA (καμπυλοειδής γραμμή), εξέρχεται από το σωματίο είτε από την πλασματική μεμβράνη, είτε διαμέσου των ενδοσωμάτων. Ανατύπωση από Belnap et al. 2000.

Οι Picorna-ιοί, απαιτούν τη διαδικασία της ενδοκύτωσης προκειμένου να εισέλθουν στο κύτταρο γεγονός το οποίο έχει δείχθει τόσο μορφολογικά όσο και βιοχημικά. Το ερέθισμα για το ξεδίπλωμα του ιού δίνεται από την πτώση του pH στο ενδόσωμα. Όταν το pH είναι περίπου 6.5, το ιικό καψίδιο διαχωρίζεται στα πενταμερή, απελευθερώνοντας το ιικό RNA (van Vlijmen et al., 1998). Η διερεύνηση της ατομικής δομής του ιού αποκάλυψε ότι υψηλή πυκνότητα καταλοίπων ιστιδίνης επενδύουν εσωτερικά την κοινή επιφάνεια του πενταμερούς (Acharya et al., 1989). Τα αμινοξικά αυτά κατάλοιπα προσφέρουν σταθερότητα στο καψίδιο. Καθώς το pKa της ιστιδίνης είναι 6.8, κοντά στο pH όπου ο ιός αποδομείται η προσθήκη πρωτονίων στις πλευρικές αλυσίδες της ιστιδίνης πιθανόν να προκαλεί ηλεκτροστατική απώθηση που οδηγεί σε αποδιοργάνωση του ιοσώματος (Curry et al., 1995). Πειράματα μεταλλαγμένης κατά τα οποία ένα κατάλοιπο ιστιδίνης στη θέση 142 της πρωτεΐνης VP3 αλλάχθηκε σε αργινίνη οδήγησαν σε καψίδια περισσότερο σταθερά σε χαμηλά pH ενισχύοντας τον πιθανό ρόλο της ιστιδίνης στην αποδιοργάνωση του ιικού καψιδίου (Ellard et al., 1999).

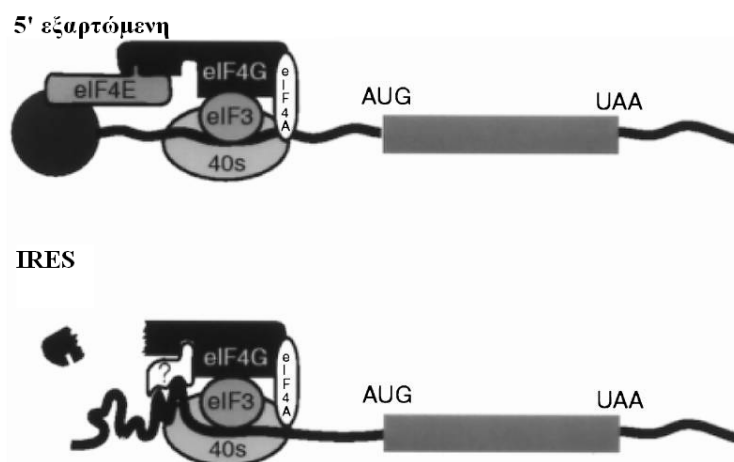
Η υδρόφοβη κοιλότητα (hydrophobic pocket) που βρίσκεται κάτω από την επιφάνεια κάθε πρωτομερούς, φαίνεται πως είναι βασικός ρυθμιστής των δομικών μεταβολών που επάγονται από τον υποδοχέα του ιού. Η εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου επιτρέπει στην κοιλότητα αυτή να περιέχει έως 60 λιπιδικά μόρια. Για τους πολιοϊούς τύπου 1 έχει καταγραφεί η ύπαρξη σφιγγοσίνης (Filman et al., 1989), ενώ για τους ιούς Coxsackie B3 έχει αναφερθεί το C16 λιπαρό οξύ (Muckelbauer et al., 1995). Τα λιπίδια πιστεύεται ότι συμβάλλουν στη σταθερότητα του ιού, και ελέγχουν την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές αλλαγές κατά την προσκόλληση του σε κυτταρικούς υποδοχείς για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρικό περιβάλλον. Την παραπάνω υπόθεση ενισχύουν μελέτες κατά τις οποίες αντικά φάρμακα όπως το παρασκεύασμα WIN, εκτοπίζουν τα λιπίδια, προσδένονται σταθερά στην υδρόφοβη κοιλότητα, και έτσι εμποδίζουν τη μολυσματικότητα του ιού, καθώς η αλλοίωση της χωροδιάταξης του κατώτερου τμήματος της αύλακας, δεν επιτρέπει την προσκόλληση του ιού στους κυτταρικούς υποδοχείς (Lewis et al., 1998).

A1.4.2. Μετάφραση του ιικού RNA

Μετά την είσοδο του γενωμικού RNA στο κυτταρόπλασμα, αυτό πρέπει να μεταφραστεί αφού δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυταρική RNA πολυμεράση και κανένα ιικό ένζυμο δεν μεταφέρεται στο κύτταρο. Πολλά πειραματικά δεδομένα οδήγησαν στην άποψη ότι η μετάφραση του γενώματος των picorna-ιών ακολουθεί έναν ασυνήθιστο μηχανισμό. Στο θετικής πολικότητας RNA γένωμα, απουσιάζει το 5' κάλυμμα (cap), το οποίο περιέχει μια μεθυλιωμένη γουανοσίνη και απαντά στα ευκαρυωτικά mRNA· το RNA του ιοσώματος είναι συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη VPg, η οποία απομακρύνεται από το κυτταρικό ένζυμο, την VPg-Unlinkase κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο προκειμένου να αρχίσει η πρωτεϊνοσύνθεση (Ambros et al., 1980, Gulevich et al., 2001). Ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γενώματος των πολιοϊών, αποκάλυψε μια μη-μεταφραζόμενη περιοχή 741 νουλεοτιδίων που περιέχει επτά AUG κωδικόνια (Kitamura et al., 1981, Racaniello and Baltimore, 1981) και τις αλληλουχίες IRES, που υποβοηθούν την έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος με την προσκόλληση των ριβοσωμάτων σε αυτές.

Η έναρξη της μετάφρασης απαιτεί μια ομάδα εναρκτήριων κυτταρικών πρωτεϊνών που θα την ενεργοποιήσουν. Σύμφωνα με ένα μοντέλο για το μηχανισμό

πρόσδεσης στο ριβόσωμα, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα προσδένεται στο IRES μέσω της αλληλεπίδρασης αυτής με τον eIF3 ο οποίος έχει σχηματίσει σύμπλοκο με το C-τελικό τμήμα του eIF4G (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Στην 5' εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα αλληλεπιδρά με το mRNA μέσω του eIF3, ο οποίος σχηματίζει σύμπλοκο με τους eIF4G, eIF4A (ελικάση απαραίτητη για το ξεδίπλωμα δευτεροταγών δομών του RNA) και eIF4E (πρόσδεση στη δομή cap). Στην IRES εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, το σύμπλοκο eIF3-40S προσδένεται στο RNA μέσω της αλληλεπίδρασης του eIF4G με κυτταρικές πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με το IRES. Ανατύπωση από **Melnick, 1996**

Μια άλλη πρωτεΐνη που συμμετέχει στην έναρξη της μετάφρασης και δημιουργεί σύμπλοκο με το IRES είναι αυτή που προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein) και ρυθμίζει το splicing του πρόδρομου m-RNA (Hellen et al., 1993). Άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή απαραίτητες για την έναρξη της μετάφρασης είναι η Unr (Upstream of N-Ras) (Boussadia et al., 2003, Costa-Mattioli et al., 2004, Murray et al., 2001,) και η poly r (C) πρωτεΐνη PCBP (Poly r (C) Binding Protein). Η τελευταία έχει βρεθεί ότι προσδένεται στο stem-loop IV του IRES τύπου I καθώς και στη δομή cloverleaf (Blyn et al., 1996, Parsley et al., 1997). Η αλληλεπίδραση της poly r (C)BP με τη δομή cloverleaf έχει προταθεί ότι ρυθμίζει αν ένα θετικής πολικότητας RNA θα μεταφραστεί ή θα αντιγραφεί.

A1.4.3. Επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

Οι πρωτεΐνες των picorna-ιών συντίθενται από τη μετάφραση ενός επιμήκους ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του θετικής πολικότητας μονόκλωνου RNA, η οποία ακολουθείται από την πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης από τις ιικές πρωτεάσες (Εικόνα 14). Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη υπόκειται σε ενδομοριακές αντιδράσεις διάσπασης (*cis*)

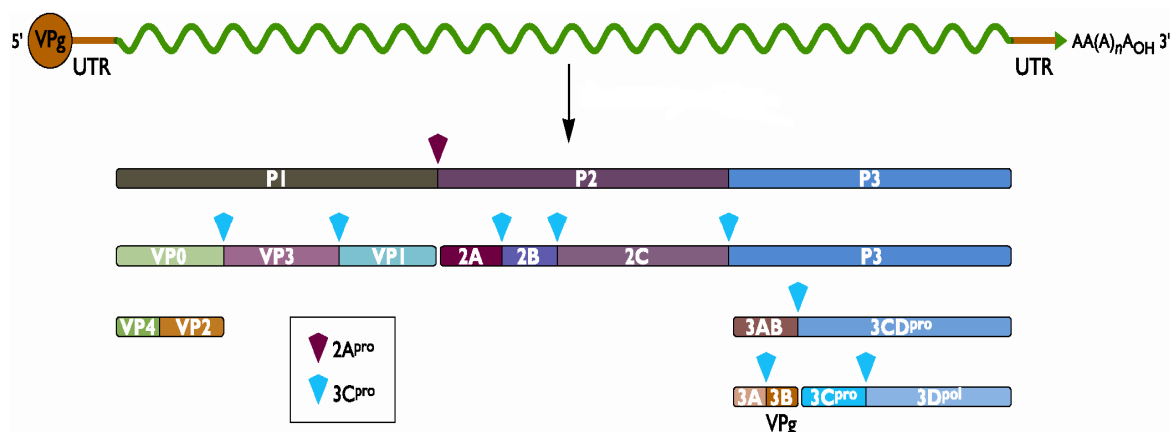
που ακολουθούνται από δευτερογενείς διαμοριακές (*cis* και *trans*). Το γένωμα των picorna-ιών κωδικοποιεί τις πρωτεάσες L^{PRO} (καρδιοϊοί και αφθοϊοί), 2A^{PRO} (εντεροϊοί και ρινοϊοί) και 3C^{PRO} (όλοι οι picorna-ιοί), που επιτελούν τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης.

Σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί με εντεροϊούς και ρινοϊούς το αρχικό γεγονός της διάσπασης της πολυπρωτεΐνης είναι αυτό της αποκοπής του πρόδρομου μορίου P1 από την αναπτυσσόμενη P2-P3 πολυπρωτεΐνη με τη δράση της 2A^{PRO} διαχωρίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις πρόδρομες πρωτεΐνες των καψομερών από αυτές των μη δομικών πρωτεϊνών. Οι θέσεις διάσπασης στην πρόδρομη πρωτεΐνη βρίσκονται μεταξύ θρεονίνης-γλυκίνης και φαινυλαλανίνης-γλυκίνης σε κάποιους coxsackie και echo ιούς και μεταξύ τυροσίνης-γλυκίνης σε άλλους εντεροϊούς. Έχει προταθεί ότι η δομή της 2A^{PRO} είναι παρόμοια με εκείνη των πρωτεασών που μοιάζουν με χυμοθρυψίνη, με τη διαφορά ότι το N-τελικό τμήμα δεν έχει τη δομή β-βαρελίου, αλλά β-ελάσματος. Ένα άλλο ασυνήθιστο χαρακτηριστικό της 2A^{PRO} είναι τα στενά προσδεδεμένα ιόντα ψευδαργύρου στην αρχή του C-τελικού άκρου τα οποία είναι ουσιώδη για τη δομή του ενζύμου (Petersen et al., 1999, Sommergruber et al., 1994, Voss et al., 1995).

Όπως και η 2A^{PRO} έτσι και η 3CD^{PRO} αυτο-αποκόπτεται από την πολυπρωτεΐνη και αρχίζουν τη διάσπασή της. Στη συνέχεια το πρόδρομο μόριο 3CD^{PRO} και η ώριμη πρωτεΐνη 3C^{PRO} απελευθερώνονται από την P3 με αυτοκαταλυτική διάσπαση και καταλύουν τη δημιουργία των μη-δομικών πρωτεϊνών από τις P2 και P3.

Όλοι οι picorna-ιοί κωδικοποιούν την 3C^{PRO} η οποία είναι υπεύθυνη για τη διάσπαση της 2C από την 3A πρωτεΐνη. Η 3C^{PRO} των πολιοϊών αναγνωρίζει μόνο θέσεις όπου απαντά το διπεπτίδιο Gln-Gly ενώ η 3C^{PRO} των υπόλοιπων picorna-ιών είναι δραστική σε άλλες θέσεις που περιλαμβάνουν Gln-Ser, Gln-Ile, Gln-Asn, Gln-Ala, Gln-Thr, και Gln-Val. (Melnick, 1996).

Το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα που συντελείται είναι η δημιουργία των πρωτεϊνών VP2 και VP4 από την VP0, το οποίο είναι και το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του καψιδίου. Πιθανότατα το στάδιο αυτό να συντελείται εντός του καψιδίου και έχει προταθεί ότι πρόκειται για αυτοκατάλυση (Agol et al., 1999).



Εικόνα 14. Πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης. Ανατύπωση από Agol et al., 1999.

A1.4.4. Αντιγραφή του γενώματος και σύνθεση του νέου ιϊκού mRNA

Στους εντεροϊούς το θετικής πολικότητας RNA γένωμα πολλαπλασιάζεται μέσω ενός ενδιάμεσου αρνητικής πολικότητας μορίου. Στη φάση του πολλαπλασιασμού τρεις μορφές RNA απαντούν στο κύτταρο: μονόκλιωνα RNA, replicative intermediate (RI) και replicative form (RF). Το μονόκλιωνα RNA απαντά ως η πιο άφθονη μορφή και είναι αποκλειστικά θετικής πολικότητας. Στην RI μορφή απαντούν συνδεδεμένες στο αντιγραφόμενο μόριο 6-8 αναπτυσσόμενες αλυσίδες αρνητικής πολικότητας. Η RF μορφή είναι μια δίκλιωνα δομή που απαρτίζεται από ολόκληρο το ιϊκό RNA συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του αντίγραφο. Η αναπαραγωγή του ιϊκού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση του +RNA είναι 25 έως 65 φορές μεγαλύτερη από αυτή των -RNA (Giachetti and Semler, 1991, Novak et al., 1991).

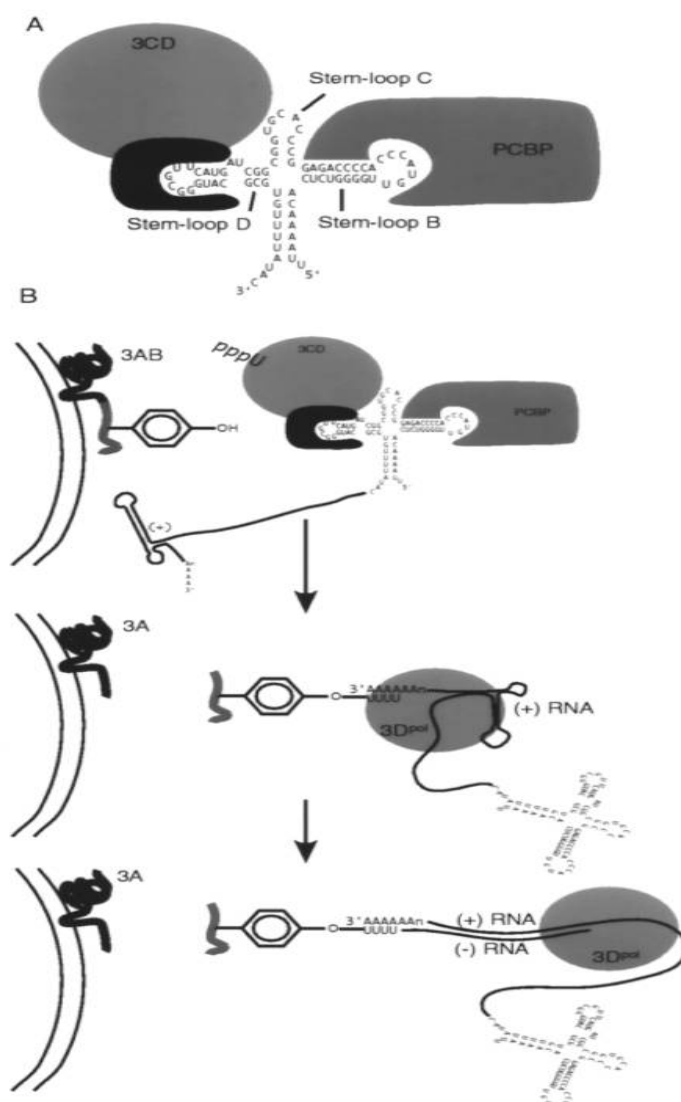
Προκειμένου να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής του RNA, απαραίτητος είναι ο σχηματισμός ενός συμπλόκου αντιγραφής αποτελούμενου από ιϊκές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B και οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB, κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2 καθώς και από ιϊκό RNA, το οποίο περιέχει cis-acting στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση του - RNA (Egger et al., 2000).

Η δομή cloverleaf της 5'UTR παίζει σημαντικό ρόλο καθώς στο stem-loop D αυτής σχηματίζεται το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που απαρτίζεται από την ιϊκή πρωτεΐνη 3CD^{pro} καθώς και την κυτταρική πρωτεΐνη PCBP και απαιτείται για τη σύνθεση

+ και - αλυσίδων RNA. Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 3AB, η οποία περιέχει υδροφοβές περιοχές μέσω των οποίων έρχεται σε επαφή με κυτταροπλασματικές μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή (Towner et al., 1996). Η πρωτεΐνη 3AB στη συνέχεια ουριδιλιώνεται παρουσία UTPs, ιικού RNA, και Mg^{2+} και διαχωρίζεται με τη βοήθεια της 3CD προκειμένου να απελευθερώσει τη VPg-pUpU (Paul et al., 1998). Η πρόδρομη 3CD διαχωρίζεται στις $3C^{pro}$ και $3D^{pol}$, εκ των οποίων η τελευταία χρησιμοποιεί τη VPg-pUpU ως εκκινητικό μόριο που φαίνεται να προσδένεται στην poly(A) ουρά του 3'UTR του γενώματος του ιού στο 3' άκρο του για τη σύνθεση του -RNA και +RNA (Herold and Andino, 2000, Paul et al., 1998). Ιοί οι οποίοι περιέχουν μεταλλαγή στην 3AB που προκαλεί μείωση της υδροφοβικότητάς της, είναι ελαττωματικοί στην έναρξη της σύνθεσης του RNA, στην *in vitro* ουριδιλίωση της VPg και στην *in vivo* σύνθεση θετικής πολικότητας κλώνων RNA (Giachetti et al., 1990, Giachetti et al., 1992) (Εικόνα 15).

Εκτός από την δομή cloverleaf και την poly(A) ουρά, μια άλλη δομή του RNA του ιού συμβάλλει στην έναρξη της αντιγραφής και την δημιουργία του εκκινητικού μορίου. Η δομή αυτή βρίσκεται στην περιοχή της 2C του γενώματος, έχει μορφή θηλιάς και είναι γνωστή ως CRE στοιχείο (Goodfellow et al., 2000a). Προτείνεται όμως, ότι τα μόρια της VPg - pUpU προερχόμενα από το CRE χρησιμοποιούνται ως εκκινητικά μόρια μόνο για την σύνθεση του +RNA, χρησιμοποιώντας την AA αλληλουχία στο 3' άκρο του -RNA. Εξασφαλίζεται έτσι ένας ικανός μηχανισμός για την έναρξη της σύνθεσης πολλών +RNA μορίων (Morasco et al., 2003).

Το γενωμικό RNA των picorna-ιών δεν είναι μόνο mRNA αλλά και υπόστρωμα για την σύνθεση αρνητικής πολικότητας RNA. Πώς όμως η ιική πολυμεράση μετακινούμενη σε μια 3'-5' κατεύθυνση στη θετική αλυσίδα αποφεύγει τη σύγκρουση με τα ριβοσώματα που μεταφράζουν σε αντίθετη κατεύθυνση. *In vitro* πειράματα (Barton et al., 1999), έδειξαν ότι υπάρχει μηχανισμός που εμποδίζει τις δύο αυτές διαδικασίες να συμβαίνουν ταυτόχρονα για το ίδιο μόριο RNA-υπόστρωμα και με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η προαναφερθείσα πιθανή σύγκρουση.



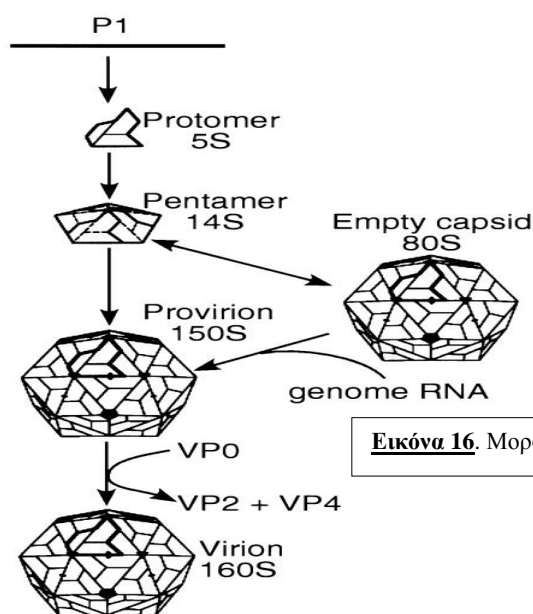
Εικόνα 15. Μοντέλο για τη σύνθεση του -RNA των εντεροϊών. Α. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο απαραίτητο για τη σύνθεση των - και + αλυσίδων, σχηματίζεται στη δομή cloverleaf, στα πρώτα 108 nt του ιικού RNA. Η πρόσδεση της poly r(C) στο stem-loop B απαιτείται για την αλληλεπίδραση της ιικής 3CD στο stem-loop D. Β. Μοντέλο για την έναρξη της σύνθεσης της - αλυσίδας. Το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο αλληλεπιδρά με την προσδεμένη στη μεμβράνη 3AB. Η 3AB ουριδύλωνεται και διασπάται για να απελευθερώσει την VPg-pUpU, ενώ η 3CD διασπάται στις 3C^{pro} και 3D^{pol}. Η 3D^{pol} χρησιμοποιεί την VPg-pUpU ως εκκινητή στο 3' άκρο της + αλυσίδας για την έναρξη της σύνθεσης του -RNA. Ανατύπωση από Melnick, 1996.

A1.4.5. Σχηματισμός του καψιδίου

Η μορφογένεση των picorna-ιών έχει μελετηθεί εκτενώς καθώς το καψίδιο είναι σχετικά απλό και τα ενδιάμεσα μόρια είναι εύκολα ανιχνεύσιμα στα μολυσμένα κύτταρα (Εικόνα 16). Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της P1 πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι δομές του β-βαρελιού και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των παραπάνω δομών, οδηγούν στη δημιουργία των δομικών μονάδων. Κατά την

απελευθέρωση της P1 από την πολυπρωτεΐνη οι δεσμοί μεταξύ VP0-VP3 και VP3-VP1 τέμνονται με τη δράση της 3CD^{PRO}. Η διαδικασία αυτή παράγει το πρώτο μορφογενετικό ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, μια άωρη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή συναρμολογούνται για να δημιουργήσουν το πενταμερές 14S (Palmenberg, 1982). Τα πενταμερή είναι σημαντικά ενδιάμεσα στη μορφογένεση όλων των picorna-ιών (Boege et al., 1986, Rombaut et al., 1990). Μπορούν να αυτο-συναρμολογηθούν *in vitro* ή *in vivo* σε 80S άδεια καψίδια. Σύμφωνα με ένα μοντέλο μορφογένεσης, το νεοσυντιθέμενο ιικό RNA, εισάγεται στα καψίδια αυτά μέσω ενός πόρου για να σχηματίσει το 150S προ-ιόσωμα, στο οποίο η καψιδική πρωτεΐνη δεν έχει αποκοπεί (Jacobson and Baltimore, 1968). Σύμφωνα με άλλο μοντέλο, τα 4S πενταμερή συναρμολογούνται γύρω από το RNA γένωμα προκειμένου να σχηματίσουν το προ-ιόσωμα (Nugent and Kirkegaard, 1995).

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει το πρωτεολυτικό ρήγμα της VP0 σε VP2 και VP4. Η πρωτεάση που επιτελεί αυτό το ρήγμα παραμένει άγνωστη. Πρόκειται για μια αυτοκαταλυτική διαδικασία, για την οποία έχει προταθεί ότι ένα συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης στη VP2 εμπλέκεται στην κατάλυση της αντίδρασης (Curry et al., 1997), ο μηχανισμός όμως παραμένει άγνωστος.

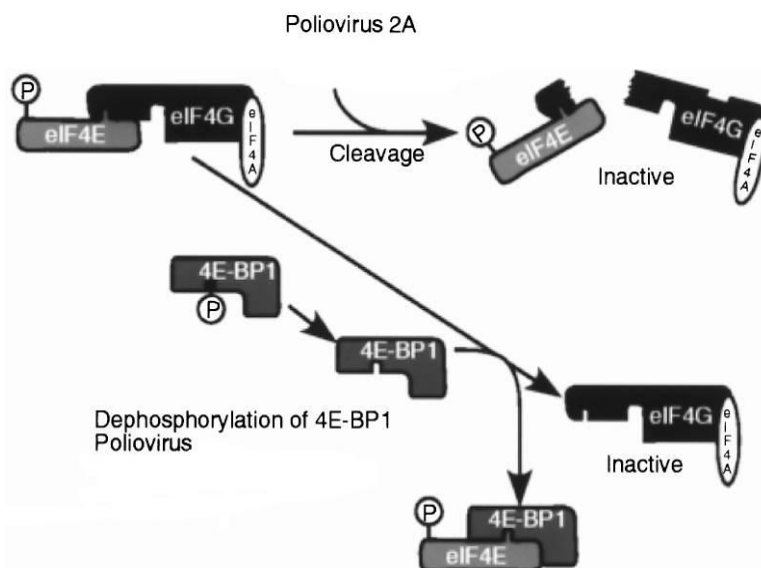


Εικόνα 16. Μορφογένεση των picorna-ιών. Ανατύπωση από Melnick, 1996

A1.4.6. Αποτελέσματα του ιικού πολλαπλασιασμού στο κύτταρο ξενιστής

Σε καλλιέργεια κυττάρων θηλαστικών η μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνικής σύνθεσης. Μετά από 2 ώρες, τα πολυριβωσώματα διαλύονται και η μετάφραση σχεδόν όλων των κυτταρικών mRNA σταματά και

αντικαθίσταται από τη μετάφραση του ιικού mRNA. Ο παράγοντας έναρξης της μετάφρασης eIF4G απενεργοποιείται με τη διάσπασή του από την ιική πρωτεάση 2A^{pro} στα σημεία που αυτός προσδένεται στη δομή cap του mRNA και στο ριβόσωμα (Lamphear et al., 1995) και δίνει το ερέθισμα για την IRES εξαρτώμενη μετάφραση (Εικόνα 17).

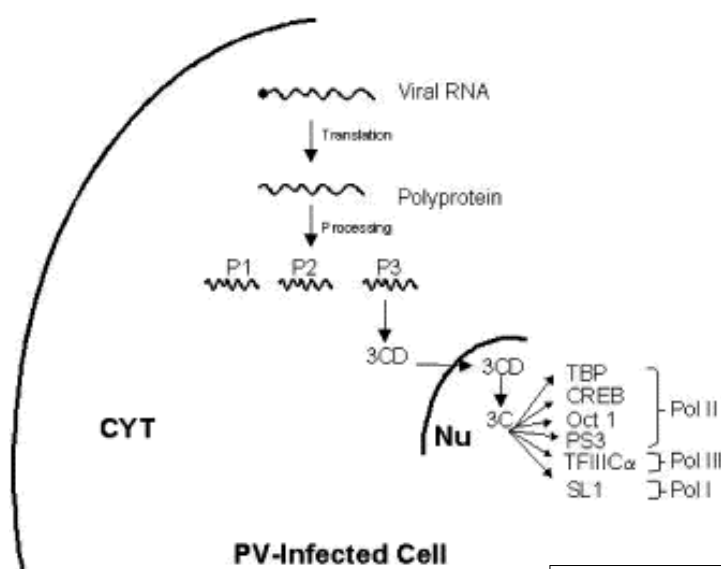


Εικόνα 17. Οι δύο μηχανισμοί για τη ρύθμιση της ενεργότητας του eIF4F σε κύτταρα μολυσμένα με picorna-ιούς. Ανατύπωση από Melnick, 1996

Δύο σχετιζόμενες χαμηλού μοριακού βάρους κυτταρικές πρωτεΐνες, οι 4E-BP1 και 4E-BP2, προσδένονται στον κυτταρικό παράγοντα eIF4E και αναστέλλουν την εξαρτώμενη από το 5' άκρο μετάφραση (Pause et al., 1994). Η 4E-BP1 είναι πανομοιότυπη με την πρωτεΐνη PHAS-I η οποία έχει δείχθει ότι αποτελεί σημαντικό υπόστρωμα φωσφορυλίωσης σε κύτταρα που έχουν κατεργαστεί με ινσουλίνη και αυξητικούς παράγοντες (Lin et al., 1994). Σε κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί με εντεροϊό η 4E-BP1 ή η 4E-BP2 αποφωσφορυλιώνονται και προσδένονται στον eIF4E με τρόπο που δεν εμποδίζει την αλληλεπίδραση με τις 5' cap δομές, αναστέλλει όμως την πρόσδεση στον eIF4G και έτσι δεν σχηματίζεται ο ενεργός παράγοντας eIF4F (Εικόνα 17).

Εκτός από την μετάφραση, οι ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro} και 3C^{pro} απενεργοποιούν και τα τρία συστήματα μεταγραφής του κυττάρου (Dasgupta et al., 2002), γεγονός που δείχνει την αλληλεπίδραση του ιού με τον πυρήνα (Weidman et al., 2003) (Εικόνα 18). Το σύστημα μεταγραφής της RNA Polymerase I είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του

ριβωσωμικού RNA (rRNA) και η απενεργοποίησή του, η οποία γίνεται πολύ νωρίς (1,5-2h μετά την μόλυνση) συνοδεύεται από πολλαπλά κοψίματα του παράγοντα TAF₁₁₀ (TBP-Associated Factor), από την 3C^{pro} στις θέσεις gln-gly (Dasgupta et al., 2002). Το σύστημα μεταγραφής της pol III είναι υπεύθυνο για την παραγωγή όλων των tRNA και των 5S rRNA. Η απενεργοποίηση του συστήματος γίνεται με την απενεργοποίηση της υπομονάδας του παράγοντα μεταγραφής TFIIIC από την 3C^{pro} (Shen et al., 1996). Η δράση του συστήματος μεταγραφής της RNA pol II εντοπίζεται στην παραγωγή των mRNA. Η απενεργοποίηση του συστήματος συμβαίνει καθώς οι ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro} και 3C^{pro} απενεργοποιούν παράγοντες μεταγραφής όπως η TBP (TATA-binding protein), η CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein), η Oct-1 (Octamer-binding factor) και την πρωτεΐνη του ογκοκατασταλτικού γονιδίου p53 (Das and Dasgupta, 1993, Weidman et al., 2001, Yalamanchili et al., 1996, Yalamanchili et al., 1997a, Yalamanchili et al., 1997b). Ενδεχομένως, η 3C^{pro} να ενεργοποιεί έναν κυτταρικό παράγοντα ο οποίος με την σειρά του να αλλοιώνει την p53. Η καταστροφή της πρωτεΐνης αυτής φαίνεται να είναι ένας μηχανισμός τον οποίο χρησιμοποιεί ο ιός για να καθυστερήσει ο κυτταρικός θάνατος, έτσι ώστε να μπορέσει να ολοκληρώσει την αναπαραγωγή του.



Εικόνα 18. Προτεινόμενο μοντέλο για την αναστολή της μεταγραφής του κυττάρου-ξενιστή. Η πρόδρομος πρωτεΐνη 3CD εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου και με αυτοπρωτεόλυση δημιουργεί την 3C^{pro}. Η ιϊκή πρωτεάση επιδρά σε διάφορους παράγοντες μεταγραφής και των τριών συστημάτων του ξενιστή. Ανατύπωση από Weidman et al., 2003

A2. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

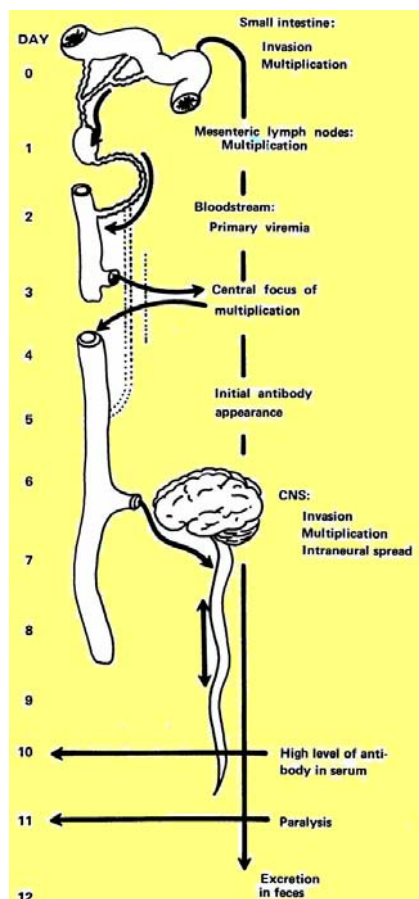
A2.1. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η είσοδος των εντεροϊών στο σώμα γίνεται από το στόμα. Εξαίρεση αποτελούν οι CAV21 που κυρίως ευθύνονται για λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος από εντεροϊούς, και προσβάλλουν τον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού, καθώς επίσης και ο EV70, που χρησιμοποιεί τις οφθαλμικές και αναπνευστικές εκκρίσεις ως μέσο μετάδοσής του. Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών γίνεται στο φάρυγγα και στο λεπτό έντερο (Εικόνα 19). Η περίοδος επώασης είναι συνήθως 7-14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2-35 ημέρες (Melnick, 1996). Τρεις με πέντε ημέρες μετά την έκθεση ο ιός μπορεί να απομονωθεί από το αίμα, τον φάρυγγα και από τα κόπρανα. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό στις αμυγδαλές, στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα, στις πλάκες του Peyser και στο λεπτό έντερο, ο ιός μεταδίδεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε άλλους ευπαθείς ιστούς, δηλαδή σε άλλους λεμφαδένες και περνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Πριν από την έναρξη γενικευμένης ιαιμίας, ο οργανισμός-ξενιστής συνήθως αντιδρά στη λοίμωξη εμφανίζοντας ήπια συμπτώματα. Η ιαιμία εμφανίζεται για λίγες ημέρες πριν την προσβολή του κεντρικού νευρικού συστήματος στα άτομα που αναπτύσσουν την μη παραλυτική (ασυμπτωματική μηνιγγίτιδα) ή την παραλυτική πολιομυελίτιδα. Αντισώματα αναπτύσσονται νωρίς και εξαλείφουν την ιαιμία, συνήθως πριν την εμφάνιση της παράλυσης. Συνήθως ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα μέχρι και 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για μία ή δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση σε άτομα που έχουν κλινικές ή υποκλινικές ενδείξεις. Δύο ή περισσότεροι εντεροϊοί μπορεί να πολλαπλασιασθούν ταυτόχρονα στο πεπτικό σύστημα, αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες ο πολλαπλασιασμός του ενός μπορεί να είναι ανταγωνιστικός των άλλων.

A2.2. ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΟΚΡΙΣΗ

Η λειτουργικότητα του ανοσοποιητικού συστήματος αποτελεί το κλειδί στην έκβαση των λοιμώξεων από εντεροϊούς. Η χυμική ανοσία είναι ιδιαίτερα σημαντική για την προστασία και ανοσία εφόρου ζωής και αποδεικνύεται από την εμφάνιση επίμονων λοιμώξεων στις α-σφαιριναιμίες και στην αυξημένη ευαισθησία σε λοιμώξεις από εντεροϊούς μεταξύ νεογνών και νηπίων. Τα T-κύτταρα βοηθούν τα B-κύτταρα στην

καταστροφή του ιού και είναι δυνατόν να προκαλέσουν απευθείας λύση των κυττάρων που έχουν προσβληθεί από τον ιό με τη βοήθεια κυτοκινών.



Εικόνα 19. Η πορεία του ιού από το λεπτό έντερο μέχρι το ξεκίνημα της παράλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά την πρώτη μόλυνση. Ανατύπωση από Melnick, 1996

A2.3. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Δεν υπάρχει προς το παρόν διαθέσιμη θεραπεία για τις λοιμώξεις από εντεροϊούς σε κλινική χρήση. Παρόλα αυτά, έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα μιας ποικιλίας φαρμάκων *in vitro* καθώς και σε μοντέλα ζώων ενώ διάφορες κλινικές δοκιμές είναι σε εξέλιξη.

Η ιντερφερόνη δρα στα πρώτα στάδια του κύκλου ζωής του ιού και έχει αναφερθεί η αποτελεσματικότητα της α- και β-ιντερφερόνης σε Coxsackie A24 σε *in vitro* λοιμώξεις (Langford et al., 1988). Ανοσοσφαιρίνες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος ανοσοκατεσταλμένων ασθενών από εντεροϊούς. Αντιϊκά φάρμακα έχουν συντεθεί και στοχεύουν τις πρωτεΐνες των εντεροϊών. Τα σκευάσματα WIN, που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά στην αντιμετώπιση των

ρινοϊών, συγκεντρώνουν τη μεγαλύτερη προσοχή. Τα σκευάσματα αυτά προσδένονται στην υδρόφοβη αύλακα, παρεμβαίνοντας στο ξεδίπλωμα του ιού και/ή την προσρόφηση. Η λήψη του WIN 54954 από το στόμα μείωσε σημαντικά τον ιικό τίτλο και τα επακόλουθα συμπτώματα μετά από λοίμωξη του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος, από τον ιό Coxsackie A21 (Schiff et al., 1992). Το Pleconaril ή VP 63843 είναι ένα πιο πρόσφατο τύπου WIN σκεύασμα, το οποίο συσσωματώνεται στην υδρόφοβη αύλακα του ιικού καψιδίου και επηρεάζει την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα. Σημαντική δραστηριότητα έχει παρατηρηθεί κατά τη χρήση του σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα (Rotbart et al., 1998a), σε γαστρεντερική λοίμωξη βρεφών με οξεία υποκλινική ανοσοανεπάρκεια (Nowak-Wegrzyn et al., 2001) έναντι των ιών Echo 11 και Coxsackie A21 (Schiff and Sherwood, 2000). Το Enviroxime είναι ένα άλλο αντιϊκό φάρμακο που στοχεύει στη μη δομική πρωτεΐνη 3A και εμποδίζει τη σύνθεση της θετικής πολικότητας αλυσίδας του ιικού RNA. Το φάρμακο αυτό είναι τοξικό για τον άνθρωπο (Diana and Pevear, 1997).

A2.4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί απομονώνονται σε υψηλό τίτλο από δείγματα κοπράνων, καθώς επίσης και από αναπνευστικές εκκρίσεις (Pallansch, 2003). Έτσι η κοπρο-στοματική μετάδοση καθώς και η επαφή με εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος άτομο-προς-άτομο, μολυσματικά σταγονίδια (fomites) και πιθανώς αιωρούμενα σταγονίδια (aerosol), θεωρούνται οι βασικότεροι τρόποι μετάδοσης. Επιπροσθέτως οι εντεροϊοί που προκαλούν φλυκταινώδες εξάνθημα μπορούν να μεταδοθούν με άμεση επαφή με την αλλοίωση που περιέχει τον μολυσματικό ιό (Pallansch, 2000). Εξαιρέσεις στον κλασικό τρόπο μετάδοσης των εντεροϊών αποτελούν οι ιοί EV70 και CAV24 οι οποίοι προκαλούν την αιμορραγική επιπεφυκίτιδα. Αυτοί οι δύο ιοί, σπάνια έχουν απομονωθεί από τα κόπρανα ή από αναπνευστικές εκκρίσεις και συνήθως μεταδίδονται πρωτογενώς με άμεση ή έμμεση επαφή με εκκρίσεις των οφθαλμών (Pallansch, 2000).

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την παρουσία αντισωμάτων έναντι των εντεροϊών σε συγκεκριμένους πληθυσμούς (Bell and McCartney, 1984, Danes and Jaresova, 1985, Lau, 1983, Manjunath et al., 1982, Morag et al., 1984, Mukundan and John, 1983, Santhanam and Choudhury, 1984). Πολλά σημαντικά συμπεράσματα μπορούν να διεξαχθούν από αυτές τις ανασκοπήσεις. Πρώτον, ο αριθμός των ατόμων

που έχουν αντισώματα έναντι σε οποιοδήποτε ορότυπο εντεροϊού είναι μεγάλος, υποδεικνύοντας την υψηλή συχνότητα παρελθόντων λοιμώξεων. Δεύτερον, οι λοιμώξεις από έναν ορότυπο μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα του τίτλου των αντισωμάτων και έναντι άλλου ορότυπου. Το πρότυπο της ετεροτυπικής απόκρισης μπορεί να ποικίλει από ορότυπο σε ορότυπο μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Τρίτον, το πρότυπο της επικράτησης των αντισωμάτων κάποιου οροτύπου μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την ηλικία και τη χρονική περίοδο. Αυτά τα τρία σημεία θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όταν ερμηνεύονται τα αποτελέσματα από ορολογικές μελέτες για την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ της λοίμωξης από εντεροϊούς και ασθενειών (Palacios and Oberste, 2005).

Βασική αρχή στην κατανόηση της επιδημιολογίας των εντεροϊών είναι η μεταβλητότητα (variation) ως προς τον ορότυπο, τη χρονική περίοδο, τη γεωγραφική θέση και την ασθένεια. Η αρχή αυτή διασαφηνίζεται σε μελέτες παρακολούθησης λοιμώξεων από non-polio εντεροϊούς (Centers for Disease Control and Prevention, 2002, Centers for Disease Control and Prevention, 2004, Moore, 1982, Morens and Palansch, 1995, Morens et al., 1979, Strikas et al., 1986, Trallero et al., 2000, Yamashita et al., 1992). Υπάρχουν δύο πρότυπα επικράτησης των εντεροϊών: το ενδημικό και το επιδημικό (Pallansch and Oberste, 2003). Το επιδημικό πρότυπο όπως αντιπροσωπεύεται από τον ιό echo 9 (E9), χαρακτηρίζεται από απότομες κορυφές στον αριθμό των απομονώσεων που ακολουθούνται από περιόδους περιορισμένης παρουσίας. Από το 1970 έως το 2001 μεγάλες επιδημίες του E9 στις Ηνωμένες Πολιτείες καταγράφηκαν κάθε τρία ή τέσσερα χρόνια, το 1971, 1975, 1978, 1981, 1984, 1988-1989, 1992, 1995 και 1998. Ο ιός echo 30 (E30) επίσης παρουσιάζει επιδημικό πρότυπο μετάδοσης το χρονικό όμως εύρος των απομονώσεών του είναι μεγαλύτερο και αφορά τις περιόδους 1978-1985, 1990-1993 και 1997-1998. Αντίθετα το ενδημικό πρότυπο μετάδοσης του ιού coxsackie B3 (CBV3) χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η απομόνωσή του κυμαινόταν στα ίδια επίπεδα με εξαίρεση το 1980 όπου καταγράφηκε μια απότομη αύξηση. Παρόμοια επιδημικά και ενδημικά πρότυπα έχουν μελετηθεί και για άλλους εντεροϊούς.

Η εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βιολογίας έδωσε νέα ώθηση στη γνώση της επιδημιολογίας των εντεροϊών. Η ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως επιδημιολογικό εργαλείο, για το χαρακτηρισμό της γεωγραφικής κατανομής των άγριων πολιοϊών αλληλουχώντας 150 νουκλεοτιδικές

βάσεις στην περιοχή σύνδεσης του γονιδίου VP1 με το 2A (Rico-Hess et al., 1987). Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι πολιοϊοί που κυκλοφορούσαν σε μια δεδομένη γεωγραφική περιοχή σχετίζονταν στενά σε γενετικό επίπεδο, ενώ έδειχναν γενετικά απομακρυσμένοι από άλλους που κυκλοφορούσαν σε διαφορετικούς γεωγραφικούς τόπους.

Η επιδημιολογική συμπεριφορά του E30 είναι χαρακτηριστική, καθώς επικρατούσες γενετικές γραμμές εκτοπίζουν άλλες λιγότερο εγκαθιδρυμένες (Oberste et al., 1999a, Palacios et al., 2002, Savolainen et al., 2001). Οι E30 γενετικές γραμμές δεν φαίνεται να περιορίζονται γεωγραφικά καθώς ένα συγκεκριμένο στέλεχος είναι δυνατόν να κυκλοφορεί ταυτόχρονα σε διαφορετικές περιοχές ανά τον κόσμο.

Η απότομη εμφάνιση του E13 παγκοσμίως το 2001 (Avellon et al., 2003, Mullins et al., 2004), και η επακόλουθη εξαφάνισή του, περιγράφει τη δυναμική των εντεροϊών να κυκλοφορούν απρόβλεπτα προκαλώντας αξιοσημείωτα κλινικά νοσήματα και υπογραμμίζει την ανάγκη για διαρκή επαγρύπνηση και επιτήρηση. Παγκόσμια κυκλοφορία εντεροϊών έχει καταγραφεί για τους E9, E30, EV70 και EV71 (Brown et al., 2000, Melnick et al., 1997, Oberste et al., 1999b).

Η ενδημική συμπεριφορά άλλων εντεροϊών σε μοριακό επίπεδο, περιγράφεται από την ταυτόχρονη κυκλοφορία CBV4 στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικές γενετικές γραμμές στην ίδια χώρα (Mulders et al., 2000). Ο CBV4 μπορεί να κυκλοφορεί σε μια δεδομένη περιοχή για πολλές δεκαετίες καθώς ιοί που ανήκουν στον ίδιο γονότυπο, βρέθηκαν στην Ολλανδία μεταξύ 1965 και 1990. Σε πολλές περιπτώσεις βρέθηκαν γενετικά παρόμοιοι ιοί να κυκλοφορούν σε περιοχές με γεωγραφική απόσταση, αντανακλώντας είτε προηγούμενη επιδημική εξάπλωση είτε παγκόσμια επικράτηση ενός γονοτύπου.

A3. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η διάγνωση της λοίμωξης από εντεροϊό ή η διαπίστωση ότι η παρουσία ενός εντεροϊού προκάλεσε κάποιο συγκεκριμένο κλινικό σύνδρομο, μπορεί να είναι τόσο πολύπλοκη όσο και ενδιαφέρουσα. Η δυσκολία πηγάζει από το γεγονός ότι το μεγαλύτερο μέρος της ζωής του ιού λαμβάνει χώρα στην αναπνευστική και γαστρεντερική οδό και έτσι πολλές από τις λοιμώξεις είναι ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Η συχνότητα αυτού του είδους των λοιμώξεων μπορεί να διαπιστωθεί ακόμα και μετά από δειγματοληψία μεταξύ υγιών ατόμων όπου η

παρουσία του ιού είναι δυνατόν να περάσει απαρατήρητη με αποτέλεσμα να μην είναι πάντα εύκολος ο συσχετισμός της ανίχνευσης του ιού με την κλινική εικόνα. Η σωστή διάγνωση της ύπαρξης εντεροϊών σε ένα κλινικό δείγμα, είναι βασική προϋπόθεση για την αντιμετώπιση των σοβαρών ασθενειών που μπορεί να προκαλέσουν κάποιοι ορότυποι εξ αυτών και πολλές μέθοδοι εργαστηριακής ανίχνευσης έχουν ήδη εγκαθιδρυθεί.

Οι κλασικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού μέσω κυτταροκαλλιέργειας, και στην εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντιορούς. Τα βιολογικά υλικά που ενδείκνυνται για την απομόνωση του ιού, είναι κόπρανα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Απομόνωση από δείγματα αίματος σε καταστάσεις αιμίας είναι επίσης χρήσιμη σε περιπτώσεις συστημικών μολύνσεων (Dagan et al., 1985). Σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας είναι προτιμότερο να λαμβάνονται εκκρίματα του επιπεφυκότος (Yin-Murphy, 1984) ή και δάκρυα (Yin-Murphy et al., 1985). Η απομόνωση εντεροϊών από λύματα, αποτεχνεύσεις και από άλλα δείγματα περιβάλλοντος είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για επιδημιολογικές μελέτες.

Η απομόνωση των εντεροϊών σε κυτταροκαλλιέργειες ή νεογνά ποντίκια αποτέλεσε στο παρελθόν μια ευρέως διαδεδομένη διαγνωστική μέθοδο (Muir and van Loon, 1997). Δυστυχώς δεν υπάρχει μια μοναδική κυτταρική σειρά στην οποία να είναι δυνατόν να αναπτυχθούν όλοι οι ορότυποι των ανθρώπινων εντεροϊών. Έτσι είναι κοινή πρακτική των εργαστηρίων που ασχολούνται με τη διάγνωση των εντεροϊών να χρησιμοποιούν περισσότερες της μιας κυτταρικές σειρές προκειμένου να αυξηθεί το εύρος των οροτύπων που μπορούν να ανιχνεύσουν (Chonmaitree et al., 1988).

Η ταυτοποίηση των εντεροϊών μπορεί να γίνει με την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντιορούς. Καθώς υπάρχουν τουλάχιστον 66 διαφορετικοί ανθρώπινοι εντεροϊοί, δεν θα ήταν καθόλου πρακτική η οροεξουδετέρωση με κάθε αντιορό αναφοράς ξεχωριστά. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα αυτό, χρησιμοποιούνται μίγματα αντιορών που έχουν παρασκευασθεί σε άλογα και περιέχουν διαφορετικούς συνδυασμούς των ειδικών προς τον κάθε ορότυπο εξουδετερωτικών αντιορών (Melnick, 1996). Η μέθοδος των Lim-Beneyesh-Melnick (LBM) περιλαμβάνει 8 μίγματα εξουδετερωτικών ορών (Α έως Η), τα οποία περιέχουν αντιορούς για 42 διαφορετικούς τύπους εντεροϊών (Melnick et al., 1973). Επιπρόσθετα μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι αντιοροί J έως P οι οποίοι

εξουδετερώνουν επιπλέον 19 Coxsackie A οροτύπους (Melnick et al., 1977). Το Εθνικό Ίδρυμα Υγείας και Περιβάλλοντος της Ολλανδίας (RIVM), έχει αναπτύξει εναλλακτικά μίγματα εξουδετερωτικών αντιορών που επιτρέπουν την ταυτοποίηση των εντεροϊών 68 και 71 (Karsenberg, 1988) και έχουν πλέον αντικαταστήσει πλήρως τα μίγματα LBM και είναι αυτά που χρησιμοποιούνται πλέον στο δίκτυο εργαστηρίων της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) (Muir et al., 1998). Καθώς είναι ευρέως αποδεκτό, η πολυπλοκότητα της παραπάνω μεθόδου και η απαίτηση αρκετού χρόνου για τη διεκπεραίωσή της αποτελούν σοβαρά μειονεκτήματα. Επιπλέον είναι αδιαμφισβήτητη η δυσκολία που υπάρχει όταν προκύπτουν μη-ταυτοποιήσιμοι εντεροϊοί οι οποίοι μπορεί να αντιπροσωπεύουν: μικτές μολύνσεις, συσσωματώματα εντεροϊών τα οποία θα πρέπει να επεξεργασθούν με δεοξυχολικό νάτριο ή χλωροφόρμιο (Karsenberg et al., 1980), νέα ή μη αναγνωρισμένα στο παρελθόν στελέχη.

Η ορολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών, ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Πολλές ορολογικές μελέτες βασίζονται στην ανίχνευση IgM αντισωμάτων ως ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης. Πολλά εργαστήρια ανέπτυξαν τεχνικές ELISA για την ανίχνευση ειδικών IgM αντισωμάτων των εντεροϊών (Bell et al., 1986, Magnius et al., 1988). Οι τεχνικές αυτές έδωσαν θετικό αποτέλεσμα σε ποσοστό 90% σε δείγματα όπου προηγουμένως είχε ταυτοποιηθεί με κυτταροκαλλιέργεια Coxsackie B ιός και έχουν εφαρμοσθεί κατά τη διάρκεια επιδημικών περιόδων (Goldwater, 1995).

Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην κλινική ιολογία έχει αλλάξει σημαντικά τη μεθοδολογία στη διαγνωστική των εντεροϊών. Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών σε κλινικά δείγματα και χρησιμοποιείται επιτυχώς για να ανιχνεύσει και αυτούς τους οροτύπους που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε κυτταρικές σειρές (Rotbart H.A., 1990), όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη. Ένας μεγάλος αριθμός πρωτοκόλλων για τη μοριακή διάγνωση των εντεροϊών βασίζεται στην ενίσχυση συντηρημένων περιοχών του RNA γενώματος (Romero J.R., 1999) που εδράζουν στην 5'μη κωδική περιοχή (5'UTR) και περιλαμβάνουν τις δευτεροταγείς δομές του cloverleaf και του IRES (Chapman et al., 1990, Halonen et al., 1995, Read and Kurtz, 1999, Romero J.R., 1999, Siafakas et al.,

2003, Thoelen et al., 2003, Zoll et al., 1992). Τα αποτελέσματα με την τεχνική αυτή μπορούν να είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 ώρες.

Αν και ο προσδιορισμός του οροτύπου μπορεί να έχει μικρή επίδραση στην κλινική αντιμετώπιση ενός ασθενούς, η ταυτοποίηση του οροτύπου είναι πολύ σημαντική προκειμένου να διαλευκανθεί η επιδημιολογική συσχέτιση κλινικών δειγμάτων και να διαγνωσθούν ασθένειες (π.χ. πολιομυελίτιδα, οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα ή εγκεφαλίτιδα) που συνδέονται με συγκεκριμένους ορότυπους εντεροϊών. Έτσι από την πλευρά της Δημόσιας Υγείας είναι σημαντικό να μπορούν να διακριθούν οι σποραδικές περιπτώσεις από αυτές της επιδημίας προκειμένου να είναι αποδοτική η μεσολάβηση και η πρόληψη. Για το σκοπό αυτό έχουν προταθεί μοριακές μέθοδοι που συμπληρώνουν την RT-PCR και περιλαμβάνουν την ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων της RT-PCR, που παράγονται από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (ανάλυση RFLP/Restriction Fragment Length Polymorphism) (Siafakas et al., 2003), τεχνικές υβριδισμού με ανιχνευτές συγκεκριμένων οροτύπων ή ανάλυση πολυμορφισμού μονόκλωνων προϊόντων της PCR (ανάλυση SSCP).

Όπως όμως έχει αποδειχθεί, η αλληλουχία της 5'UTR δεν σχετίζεται με τον ορότυπο και δεν μπορεί να μας δώσει άμεση πληροφορία γι' αυτόν (Arola et al., 1996, Kopecka et al., 1995, Oberste et al., 1998b, Siafakas et al., 2003). Αν και διάφορα εργαστήρια μελέτησαν την πιθανότητα χρήσης της VP4-VP2 περιοχής ως διαγνωστικό και επιδημιολογικό εργαλείο, κατέληξαν ότι οι αντίστοιχες αλληλουχίες δεν συνδέονται πάντα με τον ορότυπο (Arola et al., 1996, Drebot et al., 1994, Kim et al., 1997, Kopecka et al., 1995, Oberste et al., 1998b). Η σύγχρονη μεθοδολογία για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, έχει στραφεί και χρησιμοποιεί πλέον ευρέως την RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου VP1 και ακολούθως τον προσδιορισμό της πρωτοδιάταξης τμήματος αυτού με αυτόματη αλληλούχιση (sequencing). Η κυρίως εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος καψιδική πρωτεΐνη VP1, η οποία φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε ιού, ενισχύεται χρησιμοποιώντας εκφυλισμένα εκκινητικά μόρια προκειμένου να καθίσταται δυνατός ο πολλαπλασιασμός όλων των διαφορετικών οροτύπων των εντεροϊών (Oberste et al., 2003). Ο προσδιορισμός του οροτύπου μετά από αλληλούχιση του γονιδίου VP1 πρέπει να ακολουθεί τα κριτήρια ομολογίας, σύμφωνα με τα οποία, μια δεδομένη αλληλουχία θεωρείται ότι ανήκει σε έναν συγκεκριμένο ορότυπο, αν η νουκλεοτιδική ομοιότητά της με το ομόλογο στέλεχος αναφοράς είναι πάνω από 75% (Oberste et al., 2000). Επιπροσθέτως η μοριακή

φυλογένεση έχει καταλάβει σημαντική θέση στην τυποποίηση στελεχών των εντεροϊών και ολοένα και περισσότερα εργαστήρια που ασχολούνται με τη μελέτη της εξελικτικής ιστορίας των ιικών γενωμάτων δίνουν έμφαση στη φυλογενετική ανάλυση. Η δημιουργία φυλογενετικών δένδρων από αξιόπιστα πακέτα λογισμικού, με βάση αλληλουχίες που προκύπτουν από την ανάλυση πρωτοδιάταξης του γονιδίου VP1 έχει αποδείξει ότι στελέχη του ίδιου οροτύπου πάντα δημιουργούν διακριτές ομάδες και σχετίζονται στενά με τον πρότυπο στέλεχος αναφοράς (Caro et al., 2001, Norder et al., 2001, Oberste et al., 1999b, Oberste et al., 2000, Bolanaki et al., 2006, Kottaridi et al., 2006), προσφέροντας έτσι έναν σύγχρονο, εναλλακτικό και ακριβή τρόπο μοριακής τυποποίησης των εντεροϊών.

A4. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η εξέλιξη των Coxsackie ιών και γενικότερα των εντεροϊών, ως πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της εμφάνισης νέων μεταδοτικών ασθενειών (Lukashev et al., 2003b, Lukashev et al., 2004) αλλά και της επανεμφάνισης παλαιότερων (Palacios et al., 2002, Thoelen et al., 2003) από τα πρόσφατα κυκλοφορούντα στελέχη, βρίσκεται στο επίκεντρο των σύγχρονων αναλύσεων στο πεδίο των Picorna ιών. Κατά συνέπεια ο μηχανισμός, η έκταση και οι συνέπειες του γρήγορου ρυθμού μεταλλαξογένεσης και ανασυνδυασμού των ιών αυτών αναλύονται συνεχώς οδηγώντας στην γέννηση πολλών θεωριών.

A4.1. Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ

A4.1.1. Οι μεταλλάξεις στους πολιοϊούς

Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των πολιοϊών οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λαθών της ιϊκής RNA πολυμεράσης (3D^{pol}) και στην απουσία μηχανισμού ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιϊκού γενώματος είναι εκείνες, που κωδικοποιούν για τις καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, και κυρίως τα τμήματα αυτών που εκτίθενται στην ιϊκή επιφάνεια. Το γονίδιο, που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1, περιέχει, όπως προαναφέρθηκε, τις κυριότερες αντιγονικές θέσεις και κατά συνέπεια δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή.

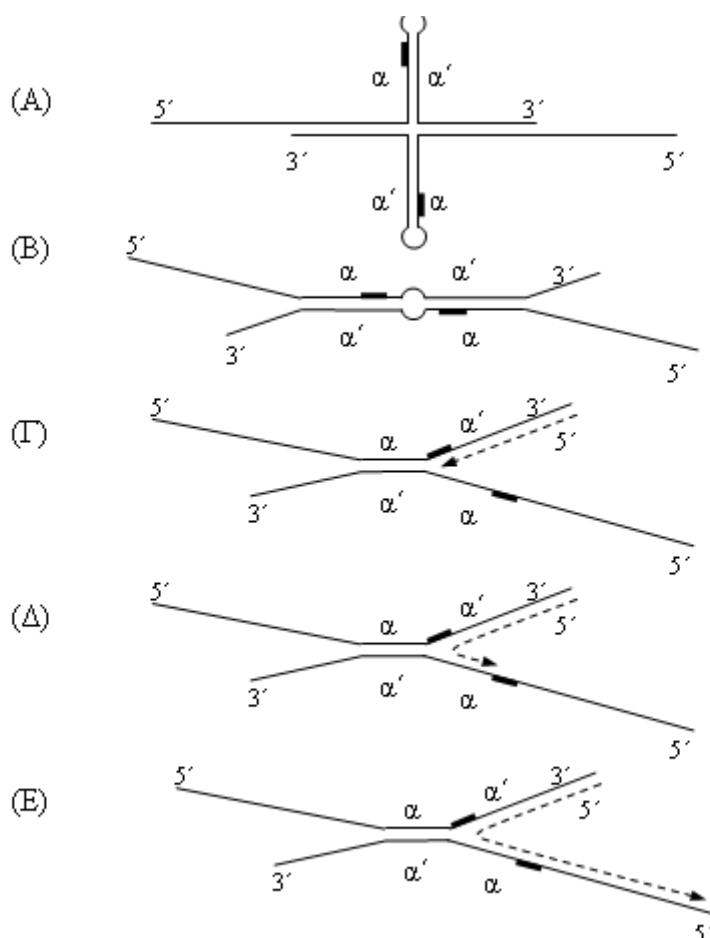
Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των λεγόμενων «quasi-species» (σχεδόν είδος) δηλαδή μεγάλων πληθυσμών ιών που περιλαμβάνουν διαφορετικούς γονοτύπους. Κύριο χαρακτηριστικό ενός «quasi-species» αποτελεί το γεγονός, ότι τα μέλη που το αποτελούν, δεν διαθέτουν μία μοναδική αλλά μία κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Gavrillin et al., 2000).

A4.1.2. Ο ανασυνδυασμός στους πολιοϊούς

Οι πολιοϊοί αποτελούν τους εκτενέστερα μελετημένους εντεροϊούς και ανήκουν στους πρώτους RNA ιούς, στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού (Hirst, 1962). Οι πρώτες αναφορές σχετικά με τη μελέτη του ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς προέρχονται από πειράματα συνεπιμόλυνσης κυττάρων με δύο μεταλλαγμένα στελέχη Polio τύπου I, τα οποία διέθεταν δύο διαφορετικά χαρακτηριστικά (ανθεκτικότητα στην αμικικιλίνη και στον ορό αλόγων) (Hirst, 1962, Ledinko, 1963). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν το 1962-1963 και έδειξαν, ότι η εμφάνιση διπλά ανθεκτικών στελεχών από τα μολυσμένα κύτταρα ήταν κατά 15-20 φορές μεγαλύτερη από αυτή, που θα αναμενόταν, αν η ανθεκτικότητα των στελεχών ήταν αποκλειστικά προϊόν μεταλλαξογένεσης. Λίγο αργότερα προέκυψαν αποδείξεις διατυπικού (intertypic) ανασυνδυασμού μεταξύ πολιοϊών τύπου I και II (Sergiescu et al., 1966), ενώ ταυτόχρονα, πραγματοποιήθηκε μια σειρά ερευνών γύρω από τον ρυθμό ανασυνδυασμού των πολιοϊών με τη χρήση διαφορετικών μαρτύρων επιλογής, προκειμένου να κατασκευαστεί ένας χάρτης ανασυνδυασμών του γονιδιώματος των πολιοϊών (Cooper, 1968, Cooper et al., 1975). Το 1963, η μέθοδος του πρωτεϊνικού αποτυπώματος (protein fingerprinting) χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊών (Romanova et al., 1980, Tolskaya et al., 1983) και για την παροχή βιοχημικών αποδείξεων ανασυνδυασμού, ενώ στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το αποτύπωμα ολιγονουκλεοτιδίων (oligonucleotide fingerprinting) (Romanova et al., 1986, Tolskaya et al., 1987). Στο χώρο της γενετικής, τα ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών υπήρξαν το μοναδικό διαθέσιμο εργαλείο για τη χαρτογράφηση καθοριστικών παραγόντων της νευρομολυσματικότητας (neurovirulence). Επίσης, στην πορεία επιτεύχθηκε ανασυνδυασμός στους πολιοϊούς σε ακυτταρικά συστήματα (Duggal et al., 1997, Tang et al., 1997).

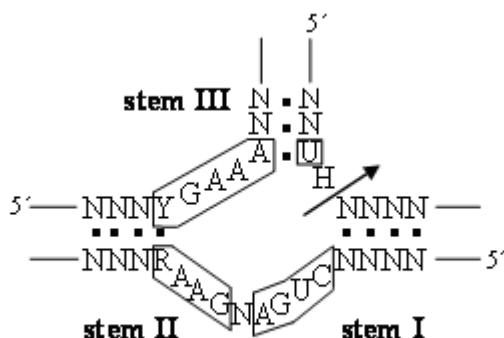
Ο ευρύτερα αποδεκτός μηχανισμός για τον ανασυνδυασμό του RNA των πολιοϊών είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) από την 3D πολυμεράση κατά την διάρκεια της (-) σύνθεσης νέου RNA (Jarvis and Kirkegaard, 1992, Kirkegaard and Baltimore, 1986). Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA (γι' αυτό αναφέρεται και ως ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου). Αναλυτικότερα, σύμφωνα με το μοντέλο των Romanova et al. (Romanova et al., 1986), η 3D πολυμεράση, κατά την σύνθεση του RNA, συναντά κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας, ως μήτρα, ένα εναλλακτικό ιϊκό RNA. Έχει προταθεί, ότι το εμπόδιο, που συναντά η ιϊκή πολυμεράση, μπορεί να είναι μια δευτεροταγής δομή φουρκέτας, η οποία σχηματίζεται από την παρουσία αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα (Romanova et al., 1986). Το αποτέλεσμα είναι να μεταπηδά η 3D πολυμεράση από το ένα μόριο στο άλλο. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από την παρατήρηση, ότι ο ανασυνδυασμός προάγεται στα πλαίσια των μεικτών συμπλόκων αντιγραφής, τα οποία είναι πολύπλοκα συστήματα αντιγραφής με περισσότερα από ένα μόρια RNA (Egger and Bienz, 2002).

Το προαναφερόμενο μοντέλο ανασυνδυασμού υποστηρίζεται περαιτέρω από αναφορές γύρω από δευτεροταγή RNA στοιχεία (Tolskaya et al., 1987) ή αυξημένη νουκλεοτιδική ομολογία κοντά στις θέσεις ανασυνδυασμού (King, 1988). Μάλιστα, φαίνεται, ότι η νουκλεοτιδική ομολογία παίζει έναν παράπλευρο ρόλο στον καθορισμό της πιθανότητας ανασυνδυασμού, μιας και έχει δειχθεί, ότι τα ενδοτυπικά (intratypic) ανασυνδυασμένα στελέχη παράγονται με μεγαλύτερη (εκατονταπλάσια) συχνότητα απ' ότι τα διατυπικά (intertypic) (Kirkegaard and Baltimore, 1986). Ωστόσο, υπάρχουν πρόσφατες αναφορές, που προτείνουν, ότι ένας εναλλακτικός, αν όχι ο επικρατής, μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς είναι η σύνδεση σπασμένων μορίων RNA. Ο μηχανισμός αυτός ονομάζεται μηχανισμός τομής-σύνδεσης (mechanism of the breaking and joining) και σύμφωνα με αυτόν, τα μόρια του ιϊκού RNA κόβονται σε κάποιες θέσεις και τα εκτιθέμενα άκρα τους ενώνονται.



Εικόνα 20. Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που, χρησιμεύουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α', ενώ οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις, όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. Ανατύπωση από Romanova et al., 1986.

Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τον Chetverin (Chetverin, 1999), οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των RNA μορίων προσβάλλονται από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο, με αποτέλεσμα τα εκτιθέμενα άκρα (3' υδροξυλικό και 5' φωσφορικό) να δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης. Στη συνέχεια ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Εναλλακτικά, η ερευνητική μελέτη των Gmyl et al. (Gmyl et al., 1999), προτείνει την προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού από ένα παρακείμενο 2'-υδροξύλιο, το οποίο δρα σαν εσωτερικό νουκλεόφιλο με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός 2', 3'-κυκλο-φωσφορικού και ενός 5' φωσφορικού άκρου, τα οποία μπορούν να ενωθούν με αντίδραση trans-εστεροποίησης.



Εικόνα 21. Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyl et al. Η θέση τομής παρουσιάζεται με ένα βέλος. Ανατύπωση από Gmyl et al., 1999

Έχει υποστηριχθεί, ότι στην πλειοψηφία των μελετημένων περιπτώσεων πολιοϊών, ο ανασυνδυασμός υφίσταται στο μη – δομικό γονιδίωμα και συνήθως στο τμήμα 2A – 2C. Σε κάποιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' NTR και της P1 κωδικής περιοχής (του καψιδίου) (Georgescu et al., 1995), ενώ ο ανασυνδυασμός εντός του γενωμικού τμήματος, που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του καψιδίου, φαίνεται να αποτελεί περισσότερο εξαίρεση παρά κανόνα των περιπτώσεων ανασυνδυασμού (Blomquist et al., 2003).

Έχει δειχθεί, ωστόσο, ότι ο *in vitro* ανασυνδυασμός εντός της P1 κωδικής περιοχής εξαρτάται από τη θερμοκρασία: Σε αντίστοιχα πειράματα αποδείχθηκε, ότι, ενώ τους 37⁰ C ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται, επιλεκτικά, στο μη – δομικό γονιδίωμα, στους 34⁰ C μπορεί να συμβεί στο δομικό τμήμα του γονιδιώματος (Duggal and Wimmer, 1999). Η πιο σημαντική παρατήρηση αυτής της τελευταίας μελέτης ήταν, ότι τα στελέχη, που παρουσιάζουν ανασυνδυασμό στο δομικό γονιδίωμα, δεν είναι λιγότερο μολυσματικά από τα στελέχη, που είναι ανασυνδυασμένα σε άλλα γενωμικά τμήματα, γεγονός, που υποδεικνύει, ότι πιθανότατα ο ανασυνδυασμός στο γενετικό τμήμα P1 περιορίζεται από κάποιον ενδογενή ιικό μηχανισμό και όχι από ασυμβατότητα πρωτεϊνών.

A4.1.3. Ανασυνδυασμοί πολιοϊών *in vivo*

Το τριδύναμο εμβόλιο OPV έναντι της πολιομυελίτιδας περιέχει ζωντανά αλλά εξασθενημένα στελέχη των τριών τύπων πολιοϊών (I, II και III), τα οποία έχουν παραχθεί

μέσω επαναλαμβανόμενης ανάπτυξης σε καλλιέργειες αρχέγονων κυττάρων πιθήκου ή καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. Η χρήση του παρέχει άριστες συνθήκες για την δημιουργία ανασυνδυασμών, μιας και ευνοείται η ταυτόχρονη μόλυνση ενός κυττάρου από διάφορους συνδυασμούς οροτύπων (Furione et al., 1993). Πράγματι, η πρώτη απόδειξη *in vivo* ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς προέκυψε μέσω αναλύσεων στελεχών, τα οποία είχαν απομονωθεί από εμβόλια OPV (Cammack et al., 1988, Minor et al., 1986b). Αργότερα, αποδείχθηκε, ότι είναι δυνατή η απομόνωση ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊών, τόσο από εμβολιασμένα άτομα, τα οποία ήταν υγιή, όσο και από περιπτώσεις παραλυτικής πολιομυελίτιδας σχετιζόμενες με τον εμβολιασμό (vaccine related paralytic poliomyelitis-VAPP) (Furione et al., 1993, Lipskaya et al., 1991). Το ποσοστό των ανασυνδυασμένων στελεχών, που εκκρίνονταν από δέκτες του τριδύναμου εμβολίου, έφτανε το 36 %. Έχει, επίσης, δειχθεί, ότι ο διατυπικός ανασυνδυασμός, που πραγματοποιείται, μπορεί να οδηγήσει στη μεταστροφή του εξασθενημένου φαινοτύπου των εμβολιακών στελεχών σε νευρομολυσματικό (Macadam et al., 1989).

Οι ανασυνδυασμοί μεταξύ των εμβολιακών στελεχών διακρίνονται εύκολα λόγω των καλά προσδιορισμένων αλληλουχιών των στελεχών Sabin (εμβολιακά στελέχη). Υπάρχουν αρκετές έρευνες, οι οποίες αναφέρουν ανασυνδυασμό μεταξύ εμβολιακών στελεχών πολιοϊών και μη ταυτοποιημένων εντεροϊών (Georgescu et al., 1995) ή μεταξύ εμβολιακών στελεχών και στελεχών πολιοϊών αγρίου τύπου (Dahourou et al., 2002, Guillot et al., 2000). Η κυκλοφορία ανασυνδυασμένων στελεχών εμβολίου με άγρια στελέχη μπορεί, στη συνέχεια, να ακολουθείται από πολλαπλά επιπρόσθετα γεγονότα ανασυνδυασμού (Liu et al., 2003). Σε πολλές από τις περιπτώσεις, όπου ο δότης γενετικού υλικού δεν έχει εντοπιστεί, έχει διατυπωθεί η υποψία, ότι μπορεί αυτός να αποτελεί μέλος της ομάδας C των εντεροϊών (HEV-C) (Guillot et al., 2000, Liu et al., 2003). Μία τέτοια υπόθεση δεν έχει μέχρι σήμερα αποδειχθεί, αφού οι αλληλουχίες μεγάλου αριθμού αγρίων στελεχών εντεροϊών δεν έχουν ακόμη καθοριστεί και κατατεθεί, ώστε να μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση μαζί τους. Ωστόσο, πρόσφατες φυλογενετικές έρευνες υποστηρίζουν την παραπάνω υπόθεση (Liu et al., 2003). Έχει, μάλιστα, εντοπισθεί ένα στέλεχος Sabin 1, το οποίο παρουσίασε στη μη δομική περιοχή του γονιδιώματός του, ανασυνδυασμό με κάποιους μη-πόλιο εντεροϊούς της ομάδας C, με πιο πιθανά, τα στελέχη Coxsackie A21 και A24 (Kew et al., 2002).

Η ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών πολιοϊών είναι σχετικά απλή, εξαιτίας της ύπαρξης μόνο τριών διαφορετικών οροτύπων, γεγονός, το οποίο καθιστά δυνατή τη χρήση των τεχνικών της PCR και της RFLP για τη σάρωση του γονιδιώματος ενός μεγάλου αριθμού κλινικών δειγμάτων, με σχετικά χαμηλό κόστος. Αυτή η προσέγγιση, ωστόσο, περιορίζεται από την αδυναμία ανίχνευσης ανασυνδυασμών σε θέσεις, οι οποίες δεν περιλαμβάνονται στην ανάλυση ή από την αδυναμία ανίχνευσης ανασυνδυασμών μωσαϊκού τύπου. Πρόσφατα, η τεχνολογία της ανάλυσης μικροσυτοιχειών (microarrays) έχει προταθεί ως μέσο ταχύτερης ανάλυσης στελεχών πολιοϊών για την ανίχνευση ανασυνδυασμών (Cherkasova et al., 2003). Δεδομένης της ύπαρξης μόνο τριών διαφορετικών οροτύπων, η υβριδοποίηση του απομονωθέντος cDNA με τρία ζευγάρια ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία ανιπροσωπεύουν ολόκληρο το γονιδίωμα, θα μπορούσε να αποκαλύψει ακόμη πιο πολύπλοκες μορφές ανασυνδυασμού.

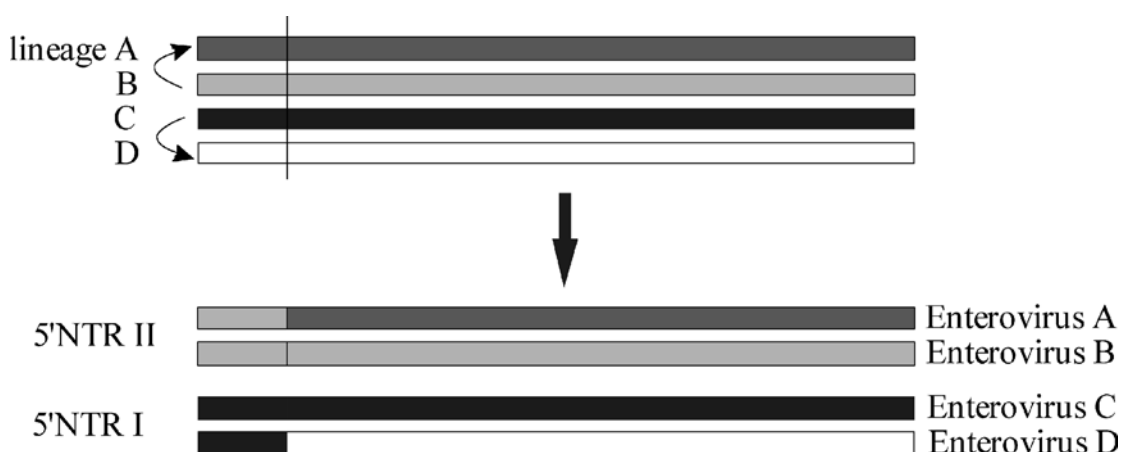
A4.2. Ο ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΗ – ΠΟΛΙΟ – ΕΝΤΕΡΟΪΟΥΣ

Μέχρι πρόσφατα, ο ανασυνδυασμός στους εντεροϊούς παρουσίαζε μικρό ενδιαφέρον, με αποτέλεσμα να έχουν πραγματοποιηθεί ελάχιστες μελέτες γύρω από το αντικείμενο της επιδημιολογίας και της πλήρους ανάλυσης της πρωτοταγούς τους διάταξης. Σήμερα, ωστόσο, εξαιτίας του γεγονότος, ότι η εξάλειψη των πολιοϊών φαίνεται εφικτή, ένα μεγάλο μέρος των επιστημονικών ερευνών έχει στραφεί προς τους εντεροϊούς. Οι πρώτες ενδείξεις ανασυνδυασμού στους ιούς αυτούς προέρχονται από μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν γύρω από την πλήρη αλληλουχία ενός μέλους του είδους HEV-C των εντεροϊών, του στελέχους Coxsackie A21, το οποίο παρουσίαζε, στο μη δομικό γονιδίωμα, μεγάλη ομολογία με τους πολιοϊούς (Hughes et al., 1989). Στη συγκεκριμένη μελέτη η πρωταρχική θέση ανασυνδυασμού εντοπίστηκε μεταξύ των 2C και 3C γενετικών περιοχών, χωρίς, ωστόσο, να ακολουθήσει κάποια φυλογενετική ανάλυση του στελέχους, η οποία θα ήταν ικανή να αποδείξει την υπόθεση αυτή. Κατά όμοιο τρόπο, υποστηρίχθηκε, ότι το πρότυπο στέλεχος Hill (Echo 9) είναι ανασυνδυασμένο στέλεχος των προτύπων στελεχών Metcalf (Echo 18) και Barty (Echo 9) (Andersson et al., 2002).

Μία πρώτη προσπάθεια εκτίμησης του ανασυνδυασμού σε ολόκληρο το εντεροϊικό γονιδίωμα πραγματοποιήθηκε το 1999 (Santti et al., 1999). Η ανάλυση όλων των διαθέσιμων, μέχρι τότε, αλληλουχιών (34 αλληλουχίες, οι οποίες αντιπροσώπευαν

24 οροτύπους εντεροϊών) απέδειξε, ότι έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός κατά την μακροεξελικτική ιστορία του εντεροϊκού γένους. Ως αποτέλεσμα αυτού του ανασυνδυασμού, τα μέλη των ειδών HEV-A και HEV-B των εντεροϊών διαθέτουν 5' μη κωδική περιοχή τύπου II, ενώ τα μέλη των ειδών HEV-C και HEV-D μοιράζονται παρόμοια 5' NTR, τύπου I, η οποία είναι διαφορετική από την προαναφερόμενη (εικόνα 22).

Στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε, επίσης, ένας αριθμός μωσαϊκών γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ των μη δομικών περιοχών διαφορετικών προτύπων στελεχών εντεροϊών. Μάλιστα, η προαναφερόμενη εργασία, πρότεινε για πρώτη, ίσως, φορά τη θεωρία της ανεξάρτητης εξέλιξης διαφορετικών γενετικών τμημάτων του γονιδιώματος των εντεροϊών. Αργότερα, πραγματοποιήθηκαν συστηματικές αναλύσεις των γενετικών αλληλουχιών όλων των προτύπων στελεχών των ειδών HEV-B και HEV-C των εντεροϊών.



Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' NTR και του υπόλοιπου γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των εντεροϊών. Η αναπαράσταση αυτή μπορεί να εξηγήσει την ύπαρξη των γνωστών μέχρι σήμερα υποομάδων εντεροϊών. Ανατύπωση από Santti et al., 1999.

Η σύγκριση ολόκληρου του γονιδιώματος των εντεροϊών του είδους HEV-C απέδειξε, ότι έχει πραγματοποιηθεί ανασυνδυασμός εντός καθώς και μεταξύ των μελών του είδους HEV-C και του είδους των πολιοϊών (Brown et al., 2003). Αυτά τα αποτελέσματα συνιστούν πιθανή απόδειξη της θεωρίας, που υποστηρίζει, ότι ο διαχωρισμός των πολιοϊών σε ένα διαφορετικό είδος από εκείνο των εντεροϊών είναι μάλλον βεβαισμένος. Επιπρόσθετα, στην ίδια εργασία παρατηρήθηκε μία προφανής

απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των στελεχών CAV1, CAV19, CAV22 και άλλων μελών του είδους HEV-C. Οι ιοί αυτοί διαφέρουν από τους υπόλοιπους εντεροϊούς, εξαιτίας της αδυναμίας, που παρουσιάζουν να αναπτύσσονται σε κυτταροκαλλιέργειες, πιθανώς λόγω του ότι χρησιμοποιούν κάποιο διαφορετικό κυτταρικό υποδοχέα. Επομένως, αυτή η παρατήρηση παρέχει ένα παράδειγμα της επίδρασης, που μπορεί να έχουν τα βιολογικά όρια στην πιθανότητα πραγματοποίησης αλλά και επικράτησης ενός γεγονότος ανασυνδυασμού.

Τέλος, η πλήρης γενωμική ανάλυση όλων των προτύπων στελεχών του είδους HEV-B, η οποία παρουσιάστηκε πρόσφατα (Oberste et al., 2004c), παρέχει αρκετές αποδείξεις και παραδείγματα τυχαίου ανασυνδυασμού μεταξύ διαφορετικών μελών ενός συγκεκριμένου είδους εντεροϊών, ενώ ταυτόχρονα, παρουσιάζονται ποικίλα πρότυπα ανασυνδυασμού στα στελέχη που μελετήθηκαν. Έτσι, ενώ πολλά στελέχη περιείχαν πρόσφατα «ίχνη» ανασυνδυασμού στη μη καψιδική περιοχή του γονιδιώματός τους (NSP genome), αποτελώντας άρα, ένα σημαντικό κομμάτι της «παγκόσμιας δεξαμενής ανταλλαγής γονιδίων» στους εντεροϊούς, άλλα έμεναν «απόντα» από την εξέλιξη των εντεροϊών, παρουσιάζοντας σπάνια ανασυνδυασμούς. Το πιο επικρατές παράδειγμα της τελευταίας «μη εξελιγμένης» ομάδας ιών υπήρξε το στέλεχος Bastianni (Echo 30), το οποίο παρουσιαζόταν φυλογενετικά απομακρυσμένο από τα λοιπά πρότυπα στελέχη. Πρόσφατα, ωστόσο, δείχθηκε, ότι η μη καψιδική περιοχή του συγκεκριμένου στελέχους έχει διαδοθεί τμηματικά, μέσω ανασυνδυασμού, σε πολλά άλλα πρότυπα στελέχη, τα οποία έχουν απομονωθεί πιο πρόσφατα (προς το τέλος της δεκαετίας του '90) (Lukashev et al., 2003a). Για το λόγο αυτό, πιστεύεται, ότι το στέλεχος Echo30 (Batianni), μένοντας «στο περιθώριο» της παγκόσμιας εξέλιξης κατά τη δεκαετία του 1950, απέκτησε μία συγκεκριμένη εξελικτική «ανωτερότητα» κατά τη δεκαετία του 1990, δεδομένου, ότι η χυμική ή κυτταρική ανοσία θα έπρεπε να έχει ασκήσει κάποιας μορφής εξελικτική πίεση κατά τη διάρκεια της εξέλιξης όχι μόνο των καψιδικών αλλά και των λειτουργικών γονιδίων του ιού.

A4.3. ΕΝΑ ΝΕΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η παρούσα και άλλες μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν σχεδόν ταυτόχρονα, προτείνουν ένα νέο μοντέλο σχετικά με την γενετική των εντεροϊών. Μέχρι σήμερα θεωρείτο, ότι τα είδη των εντεροϊών (A, B, C, D και polio) αποτελούνται από οροτύπους

– υποείδη, κάθε ένα από τα οποία παρουσιάζει δικό του πρότυπο εξέλιξης. Δεδομένων των πρόσφατων αποδείξεων συχνών, τυχαίων ανασυνδυασμών, τόσο εντός, όσο και μεταξύ των οροτύπων αυτών, η άποψη αυτή οφείλει να τεθεί υπό αμφισβήτηση.

Υπάρχουν πρόσφατες μελέτες, οι οποίες προτείνουν, ότι τα είδη των εντεροϊών υφίστανται ως ένα πεδίο από καψιδικά γονίδια και μία δεξαμενή από λειτουργικά γονίδια και 5' μη κωδικές περιοχές (Lukashev et al., 2003a, Oberste et al., 2004c, Santti et al., 1999). Αυτά τα τμήματα γενετικής πληροφορίας εξελίσσονται ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, ακόμη και σε μικροεξελικτικό επίπεδο, και ανασυνδυάζονται ελεύθερα, παρέχοντας, έτσι, τη δυνατότητα παραγωγής ποικιλιών μιας αρχικής δομής, με μη προβλέψιμες ιδιότητες. Αυτό το πρότυπο μπορεί να θεωρηθεί ως μία εξελικτική απόκριση αυτών των ιών ως προς το πολύπλοκο και υψηλά προσαρμόσιμο εξελικτικό σύστημα των ξενιστών τους. Μάλιστα, συστήνεται, ότι η μηχανή αντιγραφής των ιών δεν είναι απλώς «μη ακριβής», λόγω μιας πρωτόγονης πολυμεράσης αλλά, ότι έχει εξελιχθεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ισορροπεί μεταξύ ενός στενού ορίου μέγιστης ποικιλομορφίας (μέσω μεταλλάξεων και ανασυνδυασμών) και καταστροφής λόγω αντιγραφικών λαθών. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ένα μοντέλο μοριακής επιδημιολογίας των εντεροϊών, το οποίο παρουσιάζει μία προσαρμοστικότητα με χαρακτήρα παγκοσμίου εμβέλειας, μιας και έχει πολλές φορές παρατηρηθεί, ότι υπότυποι ή γενότυποι εντεροϊών προκαλούν επιδημίες, εξαπλώνονται διεθνώς εντός μερικών χρόνων, κυκλοφορούν για κάποια επιπρόσθετα χρόνια και στη συνέχεια εξαφανίζονται, δίνοντας τη θέση τους σε νέες ποικιλίες. Κατά συνέπεια, μπορεί να υποστηριχθεί, ότι το γένος των εντεροϊών υφίσταται ως μία παγκόσμια δεξαμενή γενετικού υλικού, η οποία εξελίσσεται χρησιμοποιώντας ως μέσα τις μεταλλάξεις και τους ανασυνδυασμούς (Lukashev et al., 2005a).

A5. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης υπήρξε, αρχικά, η ανάλυση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος των Echo ιών (προτύπων και κλινικών στελεχών) από άποψη καταλληλότητας για την διάγνωση των εντεροϊών. Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μία συγκριτική εφαρμογή 5 ζευγαριών εκκινητών πάνω σε διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος των Echo ιών (στην 5'UTR, σε δύο διαφορετικά τμήματα της VP1, στις 2A, 2B, 2C και στην 3D περιοχή) με την εφαρμογή διαφορετικών, ήδη δημοσιευμένων πρωτοκόλλων. Ο κύριος στόχος ήταν η σύγκρισή τους και η αξιολόγηση της αξιοπιστίας, ειδικότητας και ευαισθησίας τους για την διάγνωση των εντεροϊών.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης, κάποιες από τις περιοχές των κλινικών στελεχών, που πολλαπλασιάστηκαν με την χρήση ειδικών εκκινητών, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πρωτοταγή τους διάταξη. Οι περιοχές αυτές περιλάμβαναν ένα τμήμα του 5' άκρου (350 βάσεις) και του 3' άκρου (300 βάσεις) της VP1 περιοχής, όλο το γενωμικό τμήμα που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες 2 A και 2B, 300 βάσεις από το 5' άκρο της 2C και τέλος 600 βάσεις του 5' άκρου της 3D. Στην συνέχεια, με την χρήση κατάλληλων προγραμμάτων επιχειρήθηκε η νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη των προαναφερθέντων περιοχών, με στόχο την διερεύνηση των σχέσεων, που επικρατούν τόσο μεταξύ των κλινικών στελεχών όσο και μεταξύ κλινικών και προτύπων στελεχών σε αυτές τις δομικές (VP1) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3D) περιοχές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

B1. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

B1.1. ΠΡΟΤΥΠΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα πρότυπα στελέχη Echo ιών, που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκριτική μελέτη των διαφορετικών πρωτοκόλλων PCR του πρώτου μέρους της διατριβής, ελήφθησαν από το ινστιτούτο Pasteur Παρισίων, από τον οργανισμό ATCC [Rockville, Maryland, USA] και από το Εθνικό Κέντρο Επιδημιολογίας Bela Johan, στη Βουδαπέστη (Division of Virology, 'Bela Johan' National Center of Epidemiology (BJ), Budapest, Hungary). Χρησιμοποιήθηκαν και τα 28 στελέχη αναφοράς των echo ιών των οποίων η ονομασία, η γεωγραφική προέλευση και ο αριθμός καταχώρησής τους (accession number) στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank) αναγράφονται στον πίνακα 2.

Στο υπόλοιπο τμήμα της παρούσας διατριβής πραγματοποιήθηκε συγκριτική γενωμική ανάλυση των κλινικών στελεχών με αντιπροσωπευτικά πρότυπα στελέχη όλων των ειδών των εντεροϊών με ανθρώπινη παθογένεια (HEVA-D) και με αντιπροσωπευτικά στελέχη της ομάδας των πολιοϊών και των ειδών των εντεροϊών χωρίς ανθρώπινη παθογένεια. Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα τμήματα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών αυτών των στελεχών, όπως αυτά έχουν κατατεθεί στην Τράπεζα αλληλουχιών του διαδικτύου (Genbank).

Ορότυπος	Στέλεχος	Γεωγραφική προέλευση	Αριθμός καταχώρησης στο GenBank
1	Farouk	Egypt	X89531
2	Cornellis	Connecticut	X89532
3	Morrissey	Connecticut	X89533
4	Pesacec	Connecticut	X89534
5	Noyce	Maine	AF083069
6	D'Amori	Rhode Island	AF405325
7	Wallace	Ohio	AY036579
9	Hill	Ohio	X84981
11	Gregory	Ohio	X80059
12	Travis	Phillipine Islands	X77708
13	Del Carmen	Phillipine Islands	AF405311
14	Tow	Rhode Island	AF405312
15	CH 96-51	West Virginia	AF405313
16	Harrington	Massachusetts	AF295503
17	CHHE-29	Mexico City	AF081330
18	Metcalf	Ohio	AF405314
19	Burke	Ohio	AF405315
20	JV-1	Washington, DC	AF405316
21	Farina	Massachusetts	AF405317
24	DeCamp	Ohio	AF405318
25	JV-4	Washington, DC	X90722
26	Coronel	Phillipine Islands	AF405319
27	Bacon	Phillipine Islands	AF405320
29	JV-10	Washington, DC	AF405321
30	Bastianni	New York	AF162711
31	Caldwell	Kansas	AF405322
32	PR-10	Puerto Rico	AF405323
33	Toluca-3	Mexico	AF405324

Ο echo ιός τύπου 8 προσδιορίστηκε ως ίδιος ορότυπος με τον echo ιό τύπου 1· ο echo ιός τύπου 10 επαναταξινομήθηκε ως πρότυπο στέλεχος των ρεοϊών, οι echo ιοί τύπου 22 και 23 ως rarecho ιοί τύπου 1 και 2, ο echo ιός τύπου 28 ως rhino ιός τύπου 1A, και ο echo ιός τύπου 34 ως coxsackie ιός τύπου A24.

Πίνακας 2. Στελέχη αναφοράς των Echo ιών

B1.2. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Συνολικά μελετήθηκαν 42 κλινικά στελέχη τα οποία παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 2 και προέρχονται από την συλλογή δειγμάτων του τμήματος Ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur και το National Reference Center for Enteroviruses Cantacuzino Institute, Bucharest, Romania. Οι ορότυποι στους οποίους αντιστοιχούν, ο αριθμός καταχώρησής τους, η περιοχή προέλευσης και οι κλινικές εκδηλώσεις με τις οποίες έχουν συσχετισθεί, παρέχονται στον ίδιο πίνακα (πίνακας 3).

Τα δείγματα που προέρχονταν από την Ελλάδα απομονώθηκαν ως επί το πλείστον από επιδημία άσηπτης μηνιγγίτιδας που καταγράφηκε στη νήσο Κρήτη κατά το έτος 2001 και περιλαμβάνουν τους ορότυπους ECV6, ECV13 και ECV30. Το βιολογικό υλικό προέλευσης ήταν κόπρανα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν, μετά από κατάλληλη επεξεργασία, για ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργειες. Στα ελληνικά δείγματα συμπεριλήφθηκαν και στελέχη echo ιού τύπου 14 τα οποία συλλέχθηκαν από ασθενείς (κυρίως παιδιά) με ψευδο-γριππικά συμπτώματα κατά τη διάρκεια του έτους 1980. Στην προκειμένη περίπτωση το βιολογικό υλικό στο οποίο έγινε επεξεργασία και απομόνωση του ιού, ήταν εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY). Στα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν, προστέθηκαν στη συνέχεια 9 δείγματα (ορότυπου ECV3, ECV 5, ECV6, ECV9, ECV11, ECV13, ECV30) από το National Reference Center for Enteroviruses Cantacuzino Institute, Bucharest, Romania προκειμένου να περιληφθούν και ομάδες δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές και περιόδους απομόνωσης, ώστε να πραγματοποιηθεί, στη συνέχεια, σύγκριση των εξελικτικών τους σχέσεων σε επίπεδο τόπου και χρόνου. Οι κωδικοί πρόσβασης με τους οποίους κατατέθηκαν αυτά στο διαδίκτυο, μετά από τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς διάταξής τους στις επιλεγμένες γενωμικές περιοχές, αναφέρονται στον πίνακα 3.

Κλινικό στέλεχος	Ορότυπος	Γεωγραφική προέλευση	Έτος απομόνωσης	Βιολογικό υλικό	Κλινική εικόνα	Αριθμοί καταχώρησης στο GenBank
^{1,2,3,4} Ver	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY700786, AY697453
^{1,2,3} Foun	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534969, AY697455
^{1,2,3} Pli	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534968, AY697454
^{1,2,3} Kras	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534970, AY697456
^{1,2,3} Foud	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534971, AY697452
^{1,2,3} Tsikan	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534972, AY697451
^{1,2,3} Papadim	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534966, AY697447
^{1,2,3} Bled	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500189, AY697445
^{1,2,3} Par	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500191, AY518358
^{1,2,3} Per	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500192, AY514869
^{1,2,3} Pap	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY612083, AY697444
^{1,2,3} Himon	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY612084, AY697446
^{1,2,3} Panag	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY700785, AY697450
^{1,2,3} Paran	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534967, AY697448
^{1,2,3} Boud	ECV6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY754947, AY697449
^{2,3,4} 276/98/1	ECV6	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Παράλυση προσώπου	AH014806, DQ993234
^{1,2,3} Sour	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500182, AY518359
^{1,2,3} Pan	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500183, AY697437
^{1,2,3} Han	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500185, AY697438
^{1,2,3,4} Kal	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500186, AY518356, AY920434
^{1,2,3,4} Gior	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500187, AY514868, DQ993232
^{1,2,3} Kar	ECV30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY534965, AY697440
^{2,3} 169/97/1	ECV30	Ρουμανία	1979	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY902406, AY961079
^{1,2,3} Das	ECV13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500188, AY697442
^{1,2,3} Tsag	ECV13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500184, AY518355
^{1,2,3,4} Pleur	ECV13	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY612085, AY697441, AY920430
^{2,3,4} 214/98/1	ECV13	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Χωρίς κλινικά συμπτώματα	AH014807, DQ993233
^{1,2,3} 1688	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα	AY534974, AY690628
^{1,2,3} 1482	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα	
^{1,2,3} 1629	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα	AY612086, AY690627
^{1,2,3} 1817	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριπικά συμπτώματα	AY687884, AY690630

^{1,2,3} 1595	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριππικά συμπτώματα	AY612088, AY690631
^{1,2,3} 1617	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριππικά συμπτώματα	AY687885, AY690632
^{1,2,3} 1723	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριππικά συμπτώματα	AY612089, AY690633
^{1,2,3} 1684	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριππικά συμπτώματα	AY687886, AY690634
^{2,3} 1729	ECV14	Ελλάδα	1980	ENY	Ψευδογριππικά συμπτώματα	AY612090, AY690635
^{1,2} 257/98/1	ECV11	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Παράλυση προσώπου	AY500195, AY974230
^{1,2} 243/97/1	ECV3	Ρουμανία	1997	Κόπρανα	Βρογχοπνευμονία	AY500198, AY518353
^{1,2} 138/79/1	ECV3	Ρουμανία	1979	Κόπρανα	Παράλυση προσώπου	AY500197, AY697443
¹ 156/98/1	ECV5	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Χωρίς κλινικά συμπτώματα	AY500193
^{1,2} 121/82/1	ECV9	Ρουμανία	1982	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500196, AY518352
^{1,2} 307/77/1	ECV9	Ρουμανία	1977	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα	AY500194, AY518354

Πίνακας 3. Κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν. Οι αριθμοί σε εκθετική μορφή αριστερά του ονόματος των κλινικών στελεχών δείχνουν τον αριθμό της επιμέρους εργασίας όπου χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα στελέχη καθώς παρουσιάζεται στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων.

B2. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

B2.1. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΚΟΠΡΑΝΩΝ

Όπως προαναφέρθηκε, η πλειοψηφία των δειγμάτων που μελετήθηκαν προερχόταν από κόπρανα. Πριν από τον ενοφθαλμισμό των κοπράνων σε κυτταροκαλλιέργεια προηγήθηκε ειδική διαδικασία επεξεργασίας σύμφωνα με τους κανόνες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ.-World Health Organization).

Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται σε θάλαμο βιολογικής προστασίας (BSC) επιπέδου 2 (BSL-2). Σε αριθμημένους σωλήνες φυγοκέντρησης (πλαστικοί σωλήνες των 15 ml, ανθεκτικοί στο χλωροφόρμιο) προστίθενται 10 ml πλήρους διαλύματος PBS (εμπλουτισμένου με αντιβιοτικά), 1 γρ. αποστειρωμένων γυάλινων σφαιριδίων και 1 ml χλωροφορμίου (World Health Organization, 1996). Από κάθε δείγμα κοπράνων, μία μικρή ποσότητα (2γρ.) προστίθεται σε κάθε σωλήνα και ακολουθεί ομογενοποίηση μέσω ανάμειξης (vortex) για 20 λεπτά. Στην συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση των σωλήνων στις 1500 x g , για 20 λεπτά, στους 20⁰ C. Το υπερκείμενο που προκύπτει μετά την φυγοκέντρηση μοιράζεται σε δύο σωλήνες φύλαξης, ενώ σε περίπτωση που το υπερκείμενο δεν είναι διαυγές, επαναλαμβάνεται η επεξεργασία με χλωροφόρμιο. Τελικά, ο ένας από τους δύο σωλήνες φυλάσσεται στους -20⁰ C μαζί με το αντίστοιχο δείγμα κοπράνων, για μελλοντική χρήση, ενώ ο άλλος στους +4⁰ C για περαιτέρω επεξεργασία (ενοφθαλμισμό σε κυτταροκαλλιέργεια).

Διαλύματα:

-Πλήρες PBS (pH7.4) με αντιβιοτικά: Το PBS περιγράφεται συχνά σε δύο μορφές, μία πλήρη και μία ατελή. Η τελευταία δεν περιέχει ιόντα ασβεστίου ή μαγνησίου, ενώ η πλήρης περιέχει τα παραπάνω ιόντα και χρησιμοποιείται ως αραιωτικό μέσο δειγμάτων κοπράνων και ως διαλυτικό μέσο ιών. Αυτό συμβαίνει γιατί η παρουσία ασβεστίου και μαγνησίου σταθεροποιεί τους ιούς, ιδιαίτερα τους πολιοϊούς και άλλους εντεροϊούς. Για την παρασκευή πλήρους διαλύματος PBS απαιτείται η προπαρασκευή τριών διαλυμάτων:

-Διάλυμα Α (PBS ελεύθερο ασβεστίου ή μαγνησίου): 8.00 γρ. NaCl, 0,2 γρ. KCl, 0,91 γρ. Na₂HPO₄, 0,12 γρ. KH₂PO₄. Τα άλατα διαλύονται σε 600-800 ml απεσταγμένου νερού και ακολουθεί συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1000 ml. Το μείγμα τοποθετείται τελικά σε κλίβανο 10 psi (70 kPa) για 15 λεπτά.

-Διάλυμα Β: 0,10 γρ. MgCl₂·6H₂O αραιώνονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί θέρμανση για 15 λεπτά σε κλίβανο 10 psi (70 kPa).

-Διάλυμα Γ: 0,10 γρ CaCl_2 αραιώνονται σε 100 ml απεσταγμένου νερού. Ακολουθεί θέρμανση για 15 λεπτά σε κλίβανο 10 psi (70 kPa).

-Πλήρες PBS (pH7.4) με αντιβιοτικά: Αναμειγνύονται τα διαλύματα Α, Β και Γ σε αναλογία 8: 1: 1. Το διάλυμα που έχει μόλις παρασκευασθεί αποτελεί πλήρες διάλυμα PBS και έχει περιεκτικότητα 0,11 M σε NaCl. Σε 100 ml του πλήρους διαλύματος PBS προστίθενται, ακολούθως 1×10^6 units πενικιλίνης G σε κρυσταλλική μορφή και 1 γρ. άλατος στρεπτομυκίνης. Ακολουθεί ανάμειξη και χωρισμός του διαλύματος σε μικρές αναλογίες των 5 ml, οι οποίες φυλάσσονται στους -20°C . Κατά την χρήση, ένα από τα σωληνάκια των 5 ml αφήνεται να ξεπαγώσει και στην συνέχεια προστίθεται σε 500 ml πλήρους διαλύματος PBS προκειμένου να προκύψει τελική συγκέντρωση 100 units / ml πενικιλίνης και 100 μg / ml στρεπτομυκίνης. Το διάλυμα φυλάσσεται στους $4-8^{\circ}\text{C}$ για διάστημα 7 ημερών.

B3. ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

Σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (Π.Ο.Υ. - World Health Organization, 1996), χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές κυτταρικές σειρές, εξαιτίας του γεγονότος ότι μέχρι σήμερα δεν έχει εντοπιστεί κάποια κυτταρική σειρά, που να μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη όλων των γνωστών εντεροϊών. Αυτές περιελάμβαναν: RD (rhabdomyosarcoma) κύτταρα, Hep-2 (human epidermoid carcinoma) κύτταρα, L₂₀-B mouse cells και κύτταρα Vero (African Green Monkey kidney cells). Η ανάπτυξη των παραπάνω κυτταρικών σειρών σε υγρό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε με τον τρόπο που περιγράφει η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ. - World Health Organization, 1996).

Όλες οι εργασίες πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε ειδικές καμπίνες βιολογικής ασφαλείας (P2) με κάθετη νηματική ροή αέρα και με την χρήση αποστειρωμένων υλικών (υγρών αντιδραστηρίων και γυάλινων σκευών). Τα κύτταρα κάθε κυτταρικής σειράς παραλαμβάνονται σε ειδικές αμπούλες, φέροντας ετικέτες που προσδιορίζουν τα χαρακτηριστικά της ποιότητάς τους, και φυλάσσονται σε υγρό άζωτο (-196°C). Υπάρχουν δύο τύποι μέσων καλλιέργειας: Το μέσο καλλιέργειας για ανάπτυξη (Growth Media-GM) και το μέσο καλλιέργειας για διατήρηση (Maintenance Media-MM). Το πρώτο διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ορό (συνήθως 10%) και επάγει την γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων, ενώ το δεύτερο έχει περιεκτικότητα σε ορό περίπου 2% και χρησιμοποιείται για την διατήρηση των

κυτταροκαλλιέργειών σε μία στάσιμη κατάσταση αργής κυτταρικής ανάπτυξης κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών.

Διαλύματα:

- Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης 0,4%: Το ερυθρό της φαινόλης αποτελεί δείκτη pH. Για την παρασκευή του προετοιμάζεται «στοκ» διαλύματος 0,4% w/v σε απεσταγμένο νερό, το οποίο μοιράζεται σε σφραγισμένα γυάλινα δοχεία, θερμαίνεται σε κλίβανο στους 10 psi (70 kPa) για 15 λεπτά και τελικά φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την χρήση, προστίθενται 1-2 ml διαλύματος φαινόλης / λίτρο μέσου καλλιέργειας.

- Διάλυμα NaHCO₃ 7,5%: 7,5 γρ. στερεού NaHCO₃ διαλύονται σε 50 ml απεσταγμένου νερού. Προστίθενται 0,2 ml διαλύματος ερυθρού της φαινόλης 0,4% και συμπληρώνεται απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100 ml. Το διάλυμα διαποτίζεται με CO₂ μέχρι να αποκτήσει πορτοκαλί χρώμα και μοιράζεται σε μικρούς σωλήνες των 5ml. Ακολουθεί θέρμανση σε κλίβανο στους 10psi (70kPa) για 15 λεπτά.

- GM (Hank's Growth Medium): 85,3 ml Minimum essential medium (Hank's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-γλουταμίνη (L-glutamine) 200 mM, 10 ml Fetal Calf Serum, 1,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης / πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

- MM (Hank's Meintenance medium): 92,3 ml Minimum essential medium (Hank's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 2 ml Fetal Calf Serum, 2,5 ml διαλύματος NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης / πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

Τα παραπάνω θρεπτικά μέσα καλλιέργειας χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων σε κλειστά συστήματα (σωλήνες και φλάσκες με κουμπώματα που κλείνουν σταθερά) χωρίς την παρουσία CO₂. Ωστόσο, μπορεί εναλλακτικά η ανάπτυξη των κυττάρων να πραγματοποιηθεί και σε ατμόσφαιρα με 95% υγρασία και 5-7% CO₂ με σκοπό τη διατήρηση της σύστασης του θρεπτικού μέσου σε σταθερά επίπεδα. Σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιούνται τα παρακάτω καλλιεργητικά μέσα ανάπτυξης και διατήρησης κυττάρων:

- GM (Eagle's growth medium): 83,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earles's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 10 ml Fetal Calf Serum, 3,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης / πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%

- MM (Eagle's maintenance medium): 90,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earle's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine 200 mM, 2 ml Fetal Calf Serum, 4,5 ml διάλυμα NaHCO_3 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1ml διαλύματος στρεπτομυκίνης / πενικιλίνης, 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4%.

B3. 1. ΑΠΟΨΥΞΗ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μια αμπούλα κυττάρων μεταφέρεται από το υγρό άζωτο (-196°C) σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό στους 36°C , μέχρι τα κύτταρα να ξεπαγώσουν. Ακολουθεί προσεκτικό άνοιγμα κάθε αμπούλας και το περιεχόμενο (κύτταρα και θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) αδειάζεται σε πλαστική φιάλη καλλιέργειας. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα GM (10 ml) για την παραγωγή μίας μονοστιβάδας κυττάρων (αν η αμπούλα περιέχει 4×10^6 κύτταρα / ml τότε 1ml αραιωμένων κυττάρων επαρκεί για την παραγωγή 1-2 δοχείων καλλιέργειας των 75 cm^2). Στην συνέχεια η πλαστική φιάλη καλλιέργειας επωάζεται ολονύχτια (overnight) σε κλίβανο στους 36°C . Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή της πλαστική φιάλη καλλιέργειας των κυττάρων με 20 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού GM (για την απομάκρυνση του DMSO, το οποίο αποτελεί μεθυλιωτικό παράγοντα) και η πλαστική φιάλη καλλιέργειας επανατοποθετείται στους 36°C ώστε να αναπτυχθούν τα κύτταρα.

B3.2. ΑΝΑΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΟΙ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Οι φιάλες των κυττάρων απομακρύνονται από τον κλίβανο και εξετάζονται ως προς την ποιότητά τους σε μικροσκόπιο διέλευσης φωτός (σε μεγέθυνση x 430). Αν η μονοστιβάδα αποτελείται από υγιή κύτταρα και δεν υπάρχουν επιμολύνσεις τότε το θρεπτικό μέσο αποβάλλεται και τα κύτταρα πλένονται δύο φορές με διάλυμα PBS ελεύθερου Mg^{++} και Ca^{++} . Αυτό το στάδιο είναι απαραίτητο για την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου και ειδικά του ορού εμβρύου μόσχου (Fetal Calf Serum-FCS), ο οποίος περιέχει αναστολείς της τρυψίνης. Προστίθεται διάλυμα τρυψίνης-Versene και με ταυτόχρονες κυκλικές κινήσεις τα κύτταρα αποκολλώνται από την βάση της πλαστική φιάλης. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τρυψίνη αποτελεί πρωτεολυτικό ένζυμο και χρησιμεύει για την πέψη κυττάρων. Επίσης χρησιμοποιείται για την αποκόλληση κυττάρων από γυάλινα ή πλαστικά υποστρώματα, ενώ το Versene, το οποίο αποτελεί παράγοντα δέσμευσης ιόντων (chelating agent), χρησιμοποιείται για τον ίδιο σκοπό.

Πραγματοποιούνται συνολικά τρία πλυσίματα και στην συνέχεια η φιάλη τοποθετείται στους 36°C μέχρι την πλήρη αποκόλληση των κυττάρων, η οποία πιστοποιείται με παρατήρηση σε μικροσκόπιο διέλευσης. Ακολούθως, τα κύτταρα αναδιαλύονται σε καλλιεργητικό μέσο GM (4,5 ml σε φλάσκα 25 cm²) με ταυτόχρονη ανάδευση με πιπέτα (10ml) ώστε να διαλυθούν πιθανά συσσωματώματα κυττάρων. Ορισμένη ποσότητα των διαλυμένων σε θρεπτικό υλικό κυττάρων (ανάλογα με την καταμέτρηση των κυττάρων ή την προκαθορισμένη αναλογία διαχωρισμού (συνήθως 1:3) αποβάλλεται και προστίθεται επιπλέον μέσο καλλιέργειας (20ml), το οποίο, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, περιέχει 10% ορού εμβρύου μόσχου, αντιβιοτικό πενικιλίνη - στρεπτομυκίνη και 200 mM L- γλουταμίνη. Η γλουταμίνη είναι απαραίτητη για τη γρήγορη ανάκαμψη των κυττάρων ενώ τα αντιβιοτικά, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη προστίθενται για την αντιμετώπιση πιθανής βακτηριακής μόλυνσης.

Η πλαστική φιάλη με τα κύτταρα μεταφέρεται στο χώρο του επωαστήρα και η ανάπτυξη των κυττάρων πραγματοποιείται στους 36 °C. Η διαδικασία των ανακαλλιιεργειών επαναλαμβάνεται κάθε 2-3 ημέρες, ανάλογα με την κατάσταση των κυττάρων.

Διαλύματα:

- GM (Hank's Growth Medium ή Eagle's growth medium): όπως περιγράφεται παραπάνω
- PBS ελεύθερο ασβεστίου ή μαγνησίου: όπως περιγράφεται παραπάνω
- Διάλυμα Trypsine / Versene: Το διάλυμα τρυψίνης ή / και Versene παρασκευάζεται μέσα σε διάλυμα PBS ελεύθερου Mg⁺⁺ και Ca⁺⁺, γιατί αυτά τα ιόντα αυξάνουν την σταθερότητα των διακυτταρικών αλληλεπιδράσεων, καθιστώντας δύσκολη την αποκόλληση των κυττάρων από το πλαστικό υπόβαθρο στην οποία έχουν αναπτυχθεί.
- Διάλυμα Τρυψίνης: Αραιώνεται 1γρ Difco 1:250 trypsin σε 400 ml ατελούς διαλύματος PBS και ακολουθεί ήπια ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα (stirrer), για 30 λεπτά στους 36° C. Το διάλυμα φιλτράρεται (πέραςμα μέσα από πόρους διαστάσεως 0,22 μm) και μοιράζεται σε γυάλινα δοχεία των 5 ml. Ακολουθεί φύλαξη στους -20° C.
- Διάλυμα Versene: (EDTA= Disodium Salt of Ethylenediaminetetra-acetic acid). Αραιώνεται 0,1 γρ Versene σε 10 ml απεσταγμένου νερού και το διάλυμα μοιράζεται σε ισοδύναμες ποσότητες των 0,5 ml, σε γυάλινα δοχεία. Ακολουθεί

τοποθέτηση σε κλίβανο στους 10 psi (70 kPa) για 15 λεπτά και τελικά φύλαξη σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την χρήση, προστίθενται 0,4 ml αυτού του διαλύματος 1% σε 20 ml PBS ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 0,02 %.

B3.3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΣΕ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD, L₂₀-B, VERO και HEP-2

Μετά από την αποκόλληση των κυττάρων (RD, L₂₀-B, Vero ή Hep-2) από την πλαστική φιάλη και την επαναδιάλυσή τους σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, που περιέχει 10% ορό, μεταφέρονται 2ml αιωρήματος κυττάρων σε δοκιμαστικούς σωλήνες καλλιέργειας (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Οι σωλήνες επωάζονται στον κλίβανο (36 °C) για 24-48 ώρες.

Αφού διαπιστωθεί η ανάπτυξη μονοστιβάδας κυττάρων στους σωλήνες, το μέσο ανάπτυξης αποβάλλεται και αντικαθίσταται με 2ml μέσου καλλιέργειας συντήρησης (MA - με 2% ορό). Οι σωλήνες μεταφέρονται σε άλλο θάλαμο εργασίας (BSL-2) για την σπορά των ιών.

Από το υπερκείμενο επεξεργασμένων κοπράνων, το οποίο έχει ξεπαγώσει από τους +4⁰ C, λαμβάνονται 200μl και μεταφέρονται, κάτω από αποστειρωτική φλόγα, στους σωλήνες κυτταροκαλλιέργειας. Από κάθε υπερκείμενο, η προαναφερθείσα ποσότητα μεταφέρεται ουσιαστικά σε 4 σωλήνες κάθε ένας από τους οποίους αποτελείται από διαφορετική κυτταρική σειρά (RD, L₂₀-B, Vero και Hep-2). Επίσης διατηρείται, ως μάρτυρας από κάθε κυτταρική σειρά, ένας σωλήνας, στον οποίο δεν ενοφθαλμίζεται ιός.

Οι σωλήνες μεταφέρονται σε δωμάτιο επώασης στους 36°C, όπου τοποθετούνται υπό κλίση (5°) σε περιστρεφόμενο κύλινδρο. Οι σωλήνες εξετάζονται καθημερινά για πιθανή εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης, και τα αποτελέσματα της παρακολούθησης καταγράφονται. Επίσης καταγράφονται πιθανές ενδείξεις τοξικότητας, εκφυλισμού των κυττάρων ή επιμόλυνσης.

Μετά από την παρατήρηση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης, οι σωλήνες ψύχονται στους -20° C.

Για ενίσχυση του ιικού τίτλου, η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε (μετά από πραγματοποίηση διαδοχικών αραιώσεων) τρεις φορές και από τους σωλήνες της τρίτης

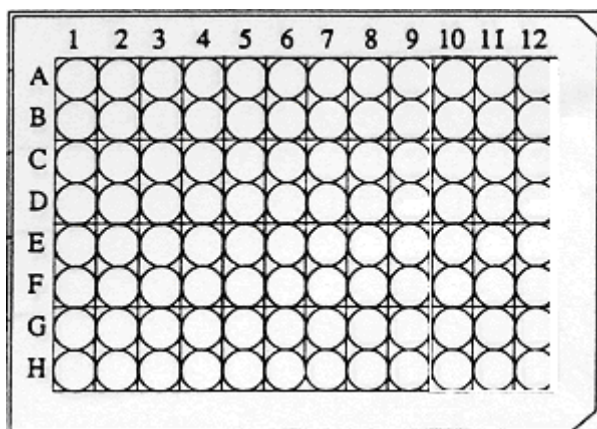
ανακαλλιέργειας, λήφθηκε το υλικό για περαιτέρω επεξεργασία (ταυτοποίηση μέσω οροεξουδετέρωσης).

B4. ΔΙΑΔΟΧΙΚΕΣ ΑΡΑΙΩΣΕΙΣ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η διαδοχική αραιώση των κυτταροκαλλιιεργειών, στις οποίες είχαν ενοφθαλμιστεί τα κλινικά στελέχη πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, προκειμένου να διαχωριστούν πιθανά μείγματα ιών. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης (εικόνα 23) προστέθηκαν σε όλες τις δεξαμενές, εκτός από εκείνες της πρώτης και της τελευταίας στήλης (A1, B1, C1 κ.ο.κ και A12, B12, C12 κ.ο.κ) 90 μl μέσου καλλιέργειας (MM). Στις δεξαμενές A1, C1, E1 κ.ο.κ προστέθηκαν 100 μl από κάθε δείγμα ιού (μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια) ενώ στις A12, B12, C12 κ.ο.κ προστέθηκαν 100 μl κυτταροκαλλιέργειας μάρτυρα. Από τις πρώτες δεξαμενές (A1, C1, E1 κ.ο.κ) , λήφθηκαν 10 μl, τα οποία μεταφέρθηκαν στις δεξαμενές A2, C2, E2 κ.ο.κ. Μετά από ανάδευση με την πιπέτα λήφθηκαν επίσης 10 μl διαλύματος και μεταφέρθηκαν στις επόμενες δεξαμενές (A3, C3, E3 κ.ο.κ). Ξεκινώντας από την δεξαμενή A1, κάθε ιικό δείγμα αραιώθηκε μέχρι την δεξαμενή B10, δηλαδή μέχρι τελική αραιώση 10^{-19} . Όμοια πραγματοποιήθηκε η αραιώση των υπόλοιπων ιικών δειγμάτων στις επόμενες σειρές δεξαμενών. Στην συνέχεια οι πλάκες τοποθετήθηκαν στους 36°C για επώαση.

Η παρακολούθηση για εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης πραγματοποιήθηκε μέχρι την ημέρα καταστροφής του μάρτυρα κυττάρων στις τελικές δεξαμενές (A12, B12, C12 κ.ο.κ). Τελικά, για κάθε ιικό δείγμα, λήφθηκε η τελευταία αραιώση, στην οποία παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση και ακολούθησε ενοφθαλμισμός του αραιωμένου ιού στην αντίστοιχη κυτταρική σειρά, όπως αναφέρεται παραπάνω.



Εικόνα 23. Πλάκα μικροτιτλοποίησης

B5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ ΜΕ ΔΕΞΑΜΕΝΕΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΑΝΤΙΟΡΩΝ – ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ (SERONEUTRALIZATION)

Η ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών εντεροϊών, είχε ήδη προηγηθεί της μελέτης αλλά επαναλήφθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των κλινικών δειγμάτων εξυπηρετώντας στόχους επιβεβαίωσης. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση ειδικών δεξαμενών αντιορών, όπως ορίζει το πρωτόκολλο της Π.Ο.Υ (World Health Organization, 1996).

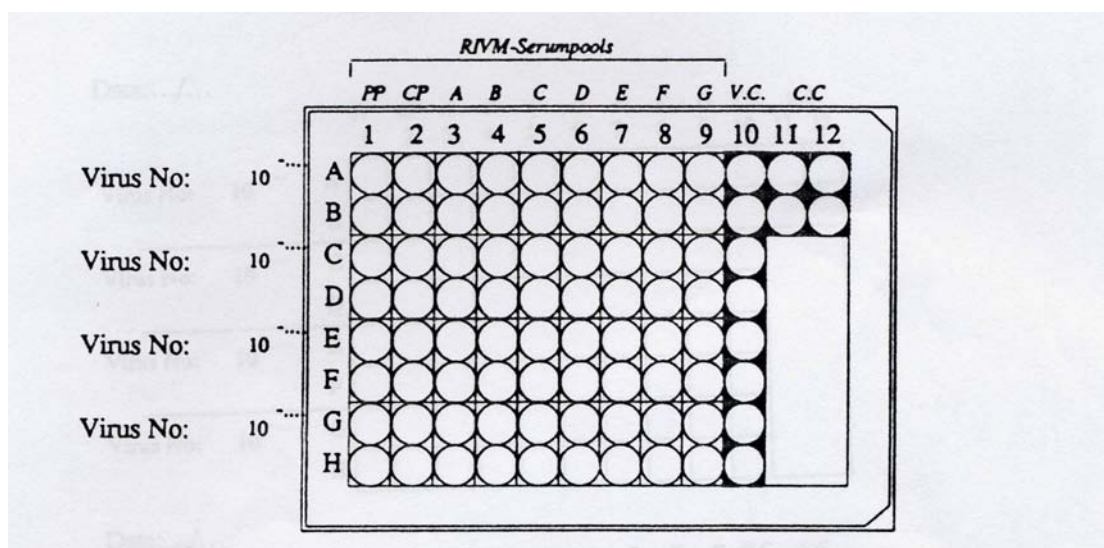
Για την ορο-ταυτοποίηση προηγήθηκε η προετοιμασία των ακόλουθων:

Απομονωμένα στελέχη ιών σε κυτταροκαλλιέργεια, αντιοροί εντεροϊών RIVM με οδηγίες εφαρμογής, μέσο καλλιέργειας (MM), πιπέτες των 1, 2 και 10 ml, 1 πλάκα μικροτιτλοποίησης, δοχεία/σωλήνες των 10ml, κυτταρικό εναιώρημα RD, αυτοκόλλητες ταινίες. Τα παραπάνω υλικά απαιτούνται για την ταυτοποίηση τεσσάρων ιικών στελεχών. Για περισσότερα στελέχη απαιτούνται περισσότερες πλάκες ορο-εξουδετέρωσης (1 πλάκα για 4 δείγματα).

Ακολούθησαν τα εξής:

1. Προετοιμασία της πλάκας μικροτιτλοποίησης

- Προετοιμασία των αντιορών των εντεροϊών σύμφωνα με τις οδηγίες εφαρμογής RIVM.
- Σήμανση των πλακών με το όνομα του στελέχους, το είδος του αντιορού κτλ, όπως στην εικόνα 24.
- Προσθήκη 50 µl αντιορού στις δεξαμενές A1-H9.
- Προσθήκη 50 µl μέσου καλλιέργειας (MM) στις δεξαμενές V.C. (Virus Controls- Μάρτυρες ιών: A10-H10).
- Προσθήκη 100 µl μέσου καλλιέργειας (MM) στις δεξαμενές C.C. (Cell controls- μάρτυρες κυττάρων: A11-B12).



Εικόνα 24. Πλάκα μικροεξουδετέρωσης με δεξαμενές αντιορών εντεροϊών

2. Προσθήκη των ιών

- Προσθήκη 50 μl του πρώτου ιού στις δεξαμενές με αντιορό (A1-B9) και στις δεξαμενές με τον ιικό μάρτυρα (A,B –10).
- Επανάληψη της ίδιας διαδικασίας για τους λοιπούς ιούς στις θέσεις C1-D10, E1-F10 και G1-H10 αντίστοιχα.
- Κάλυψη της πλάκας και ανακίνηση για 1 λεπτό.
- Επώαση της πλάκας για μία ώρα στους 36 °C για 1 ώρα.

3. Προσθήκη των κυττάρων

- Προσθήκη 100μl από το κυτταρικό εναιώρημα RD – κατά προσέγγιση 150.000 κύτταρα / ml – σε όλες τις δεξαμενές.
- Κάλυψη της πλάκας (με αυτοκόλλητη ταινία).
- Επώαση στους 36 °C.
- Καθημερινή ανάγνωση και καταγραφή. Η διαδικασία ολοκληρώνεται 24 ώρες μετά από την εκδήλωση κυτταροπαθογόνου δράσης στον μάρτυρα του ιού (V.C.) και η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πραγματοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Μοτίβο Κυτταροπαθογόνου Δράσης	Ιός	Διασταυρούμενη αντίδραση
AB	ECHO 4 Pesascek	Coxs. B pool 20
AC	ECHO7	
AD	ECHO11 (60-3590)	
AE	ECHO14	G pool 20
AF	ECHO 9 (Heyer)	
AG	ECHO 6 d' Amori	
BC	Coxsackie A9 (60-3843)	
BD	ECHO 1	Coxs. B pool 20
BE	ECHO27	Coxs. B pool 20
BF	ECHO 3	G pool trace
BG	ECHO 25	Coxs. B pool 40
CD	ECHO 21	
CE	ECHO 22	
CF	ECHO 2	Coxs. B pool 20, B pool 160, G pool 20
CG	ECHO 5	E pool 40
DE	ECHO 20	Coxs. B pool 320
DF	ECHO 12	Coxs. B pool 20
DG	ECHO 30	
EF	ECHO 33	Coxs. B pool 20
EG	ECHO 29 (63-6771)	Coxs. B pool 20
FG	ECHO 13	B pool trace

Πίνακας 4. Πίνακας ταυτοποίησης εντεροϊών με την μέθοδο της οροεξουδετέρωσης.

B6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ

Μετά από την παρατήρηση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης και την ταυτοποίηση των απομονωμένων ιών, οι μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες καταψύχθηκαν στους -80°C . Για την εκχύλιση του ιϊκού RNA, εφαρμόστηκε η μέθοδος της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (Cases et al, 1995) με τις παρακάτω τροποποιήσεις: Αρχικά, για την λύση των κυττάρων επώασθησαν 200μl από κάθε μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια (μετά από την απόψυξή της) με 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και 800μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης. Η επώαση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου ($18-25^{\circ}\text{C}$) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml ισοπροπανόλης (διατηρημένης στους -20°C). Μετά από ανάδευση (vortex) για 1 λεπτό, τα δείγματα διατηρήθηκαν στον πάγο για 40 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στις $14.000 \times g$ (σε θερμοκρασία 4°C). Η ισοπροπανόλη απομακρύνθηκε από το υπερκείμενο διάλυμα και στο ίζημα που παρέμεινε προστέθηκε 1ml αιθανόλης

70%. Ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση στις 14.000 x g για 10 λεπτά. Μετά την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης, το απομονωθέν RNA αφέθηκε να στεγνώσει σε επωαστικό κλίβανο στους 70 °C για 3 λεπτά. Ακολούθησε επαναδιάλυση σε 200μl απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού, ελεύθερου νουκλεασών. Τα RNA των δειγμάτων φυλάχθηκαν στους -80 °C, για μακροπρόθεσμη χρήση.

Διαλύματα:

- Διάλυμα Θειοκυανούχου Γουανιδίνης: 4M GuSCN, 0.5% N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiothreitol, 25 mM sodium citrate.

B7. ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

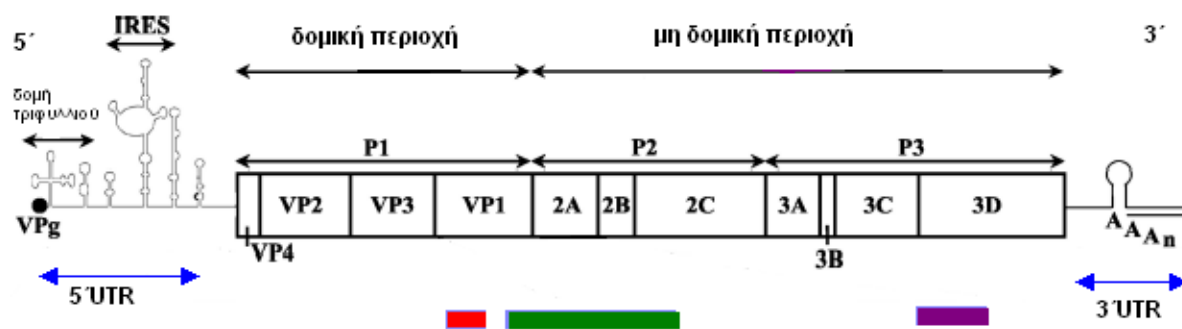
Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πρώτο πειραματικό στάδιο της εργασίας επιλέχθηκαν με βάση την περιοχή - γενωμικό στόχο, η οποία ήταν επιθυμητό να ελεγχθεί ως προς το διαγνωστικό τμήμα της μελέτης και η οποία θα εξυπηρετούσε, ταυτόχρονα, μελλοντικές μελέτες σχετικά με τις εξελικτικές σχέσεις των κλινικών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν (βλ κεφ. Αποτελέσματα, πίνακας 5). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκαν ήδη σχεδιασμένοι, από προηγούμενες μελέτες, εκκινητές αφενός για την διευκόλυνση και ταχύτερη πραγματοποίηση των πειραμάτων και αφετέρου γιατί οι αλληλουχίες κλινικών Echo στελεχών, που διατίθενται στο διαδίκτυο, είναι περιορισμένες και αφορούν λίγους οροτύπους, με αποτέλεσμα να καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολος ο σχεδιασμός γενικευμένων εκκινητικών μορίων, ιδίως στις μη δομικές, πιο ευμετάβλητες περιοχές του γονιδιώματος των ιών αυτών. Συγκεκριμένα, στην 5' μη κωδική περιοχή του γονιδιώματος των ιών (5'UTR), η οποία δεν χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία και συχνότητα μεταλλάξεων, επιλέχθηκε ένα ζευγάρι εκκινητών (UG52-UC53), το οποίο υβριδίζεται σε ένα ιδιαίτερα σταθερό τμήμα αυτής, δίνοντας την δυνατότητα ανίχνευσης όλων των οροτύπων των προτύπων στελεχών εντεροϊών και όλων των κλινικών στελεχών που έχουν μέχρι σήμερα ελεγχθεί (Georgopoulou et al., 2000, Georgopoulou et al., 2001, Siafakas et al., 2000, Siafakas et al., 2001, Siafakas et al., 2002a, Siafakas et al., 2002b).

Στοχεύοντας σε μία υψηλά συντηρημένη περιοχή του 5' άκρου της VP1 περιοχής, το ζευγάρι εκφυλισμένων εκκινητών 292-222 επιλέχθηκε επίσης με βάση την δημοσιευμένη ικανότητά του να ανιχνεύει και ταυτόχρονα να ταυτοποιεί τους εντεροϊούς (Oberste et al., 2003). Στο υπόλοιπο τμήμα της VP1, τα ζευγάρια 040-011, 012-011 (Oberste et al., 1999b) και EUC2-EUG3a,b,c (Caro et al., 2001) χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της ικανότητάς τους να ανιχνεύουν τα κλινικά στελέχη της εργασίας μας αλλά

και λόγω της δυνατότητας που προσφέρουν στον προσδιορισμό της πρωτοταγούς διάταξης των τμημάτων που πολλαπλασιάζουν. Επιπρόσθετα, το μείγμα εκφυλισμένων εκκινητικών μορίων EUC2-EUG3a,b,c είχε πριν την έναρξη της εργασίας μας, υποστηριχθεί ότι δίνει θεαματικά αποτελέσματα στην κλινική ταυτοποίηση των εντεροϊών με ταυτόχρονο το πλεονέκτημα ότι πολλαπλασιάζει ένα μεγάλο γενωμικό κομμάτι που καλύπτει 300 βάσεις από το 5' άκρο της VP1, ολόκληρα τα 2 A και 2B γονιδιακά τμήματα και 300 βάσεις από το 5' άκρο της 2C. Το συγκεκριμένο λοιπόν ζευγάρι, με την προϋπόθεση ότι θα πολλαπλασίαζε τα κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν, θα μπορούσε μελλοντικά να εφαρμοσθεί στην ανάγνωση της πρωτοταγούς αλληλουχίας και την εξιχνίαση των εξελικτικών συσχετίσεων των στελεχών σε περιοχές, όπως οι 2A και 2B, που είναι ιδιαίτερα δύσκολο να πολλαπλασιαστούν.

Τέλος, το ζευγάρι 5850F-6500R, το οποίο σχεδιάστηκε αρχικά για τον πολλαπλασιασμό της 3D περιοχής μιας ομάδας κλινικών στελεχών Echo ιών, με στόχο την φυλογενετική τους μελέτη (Lukashev et al., 2003), χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό της ικανότητάς του να ανιχνεύει Coxsackie A και B ιούς, εκτός από τα στελέχη των Echo στελέχη και την μετέπειτα εφαρμογή του στην εξελικτική μελέτη των κλινικών στελεχών στην περιοχή αυτή.

Όλα τα προαναφερθέντα μόρια εκκίνησης παρασκευάστηκαν από την Invitrogen, Life Technologies (Paisley, UK). Πληροφορίες σχετικά με την αλληλουχία, την θέση του γονιδιώματος στην οποία στοχεύουν και της συγκέντρωσης στην οποία χρησιμοποιήθηκαν παρέχονται στον πίνακα 5 (βλ κεφ. Αποτελέσματα).



Εικόνα 25. Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του γονιδιώματος που πολλαπλασιάστηκαν μέσω ειδικά επιλεγμένων εκκινητών.

Β8. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Για την μετατροπή των απομονωμένων ιϊκών RNA σε cDNA εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, επειδή στην περίπτωση των εκκινητών EUC2-EUG3a-EUG3b-EUG3c, που χρησιμοποιήθηκαν στην συνέχεια για τον πολλαπλασιασμό του γενωμικού τμήματος 3' VP1-5'2C, απαιτείτο, στην αντίστροφη μεταγραφή, η χρήση ειδικευμένων εκκινητών. Σε όλες τις υπόλοιπες περιπτώσεις η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε ως εξής: 5μl απομονωμένου ιϊκού RNA επώασθη με 2μl τυχαίων εκκινητών (random primers) d(N)₉ (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) στους 70 °C, για 5 λεπτά. Μετά την διακοπή της αντίδρασης (με άμεση μεταφορά σε πάγο) προστέθηκε σε κάθε ένα από τα δείγματα, μείγμα αποτελούμενο από: 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (M-MLV reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων, συγκέντρωσης 10mM (dNTPs), 100 μονάδες αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV (Promega Corporation Madison WI, USA) και 20 μονάδες αναστολέα ριβονουκλεασών, RNase Inhibitor (HT Biotechnology, UK). Τέλος, προστέθηκε απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό ελεύθερο νουκλεασών, (Sigma Aldrich, St Louis MO), μέχρι τελικού όγκου 20 μl. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 1 ώρα και στην συνέχεια έγινε απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με επώαση στους 95°C για 5 λεπτά.

Για την παραγωγή μιας δεύτερης σειράς cDNA προϊόντων, τα οποία στην συνέχεια πολλαπλασιάστηκαν με τους εκκινητές EUC2-EUG3a,b,c, το παραπάνω πρωτόκολλο τροποποιήθηκε ως προς τα εκκινητικά μόρια της αντίστροφης μεταγραφής και ως προς την αρχική θερμοκρασία επώασης, αυτών, με τα RNA. Συγκεκριμένα, αντί των τυχαίων εκκινητών (random primers) χρησιμοποιήθηκαν 10 pmol από κάθε έναν από

τους αντικωδικούς εκκινητές EUC2a και EUC 2b και το μείγμα αυτών με τα ιϊκά RNA επώαστηκε στους 42⁰ C (Caro et al., 2001).

B9. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ – PCR

Καθορισμένα τμήματα του παραγόμενου cDNA ενισχύθηκαν με την διαδικασία της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) με την βοήθεια των εκκινητικών μορίων, που περιγράφονται στον πίνακα 5 (βλ κεφ. Αποτελέσματα). Το μείγμα συνίστατο από: 3μl από κάθε cDNA, 2μl εκκινητικών μορίων, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 10x (Taq reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 2μl χλωριούχου μαγνησίου (MgCl₂) συγκέντρωσης 50mM, 2 μονάδες Taq DNA πολυμεράσης (Promega Corporation Madison WI, USA) και απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, ελεύθερο νουκλεασών έως τελικού όγκου 50μl. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε θερμικό κυκλοποιητή Techne Progene Thermal Cycler.

Προηγήθηκε αποδιάταξη του cDNA στους 95⁰ C για 5 λεπτά και στη συνέχεια, ακολούθησε η εφαρμογή των συνθηκών αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης για κάθε ζευγάρι εκκινητών ως εξής: Για το ζευγάρι UC53-UG52 πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι πολλαπλασιασμού με αποδιάταξη στους 95⁰ C για 10 sec, υβριδοποίηση στους 60⁰ C για 10 sec και επιμήκυνση στους 74⁰ C για 10 sec. Για τα ζευγάρια 040/011 και 012/011 πραγματοποιήθηκαν 35 κύκλοι με αποδιάταξη στους 95⁰ C για 10 sec, υβριδοποίηση στους 50⁰ C για 10 sec και επιμήκυνση στους 74⁰ C για 10 sec. Ο πολλαπλασιασμός του 5' άκρου της VP1 πραγματοποιήθηκε με το ζευγάρι 292-222 ακολουθώντας 30 κύκλους αποδιάταξης στους 95⁰ C για 10 sec, υβριδοποίησης στους 42⁰ C για 30 sec και επιμήκυνσης στους 74⁰ C για 10 sec. Το μείγμα εκκινητών EUC2-EUG3a,b,c χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό ενός μεγάλου γενωμικού τμήματος (1452bp) που κωδικοποιεί για το 3' άκρο της VP1 μέχρι το 5' άκρο της 2 C κάτω από συνθήκες αποδιάταξης στους 95⁰ C για 20 sec, υβριδοποίησης στους 45⁰ C για 1 λεπτό και επιμήκυνσης στους 74⁰ C για 1 λεπτό. Τέλος, για τον πολλαπλασιασμό 600 βάσεων του 5' άκρου της 3D περιοχής εφαρμόστηκε το ζευγάρι 5850F-6500R και πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι αποδιάταξης στους 95⁰ C για 20 sec, υβριδοποίησης στους 50⁰ C για 30 sec και επιμήκυνσης στους 74⁰ C για 30 sec. Η επιμήκυνση και σταθεροποίηση των πολλαπλασιασμένων τμημάτων ολοκληρώθηκε, σε όλες τις περιπτώσεις, με ένα τελευταίο στάδιο επώασης στους 78⁰ C για 15 λεπτά.

B9.1. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ RT - PCR ΣΕ ΑΓΑΡΟΖΗ

Η αγαρόζη είναι ένα γραμμικό πολυμερές, το οποίο αποτελείται από εναλλασσόμενα κατάλοιπα της D- και L- γαλακτόζης, τα οποία ενώνονται μέσω α-(1→3) και β-(1→4) γλυκοσιδικών δεσμών. Ο ρυθμός μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα της αγαρόζης επηρεάζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

-Το μοριακό μέγεθος του DNA: Μεγαλύτερα DNA μόρια μετακινούνται με πιο αργούς ρυθμούς σε σχέση με τα μικρότερα.

-Την συγκέντρωση της αγαρόζης: Ένα κομμάτι γραμμικού DNA ενός ορισμένου μεγέθους μεταναστεύει με διαφορετικούς ρυθμούς σε πηκτώματα διαφόρων συγκεντρώσεων.

-Την στερεοδιαμόρφωση του DNA: Το υπερελικωμένο κυκλικό, το τεμαχισμένο κυκλικό και το γραμμικό DNA παρουσιάζουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο ρυθμός μετανάστευσης των τριών ειδών του DNA εξαρτάται από το είδος και τη συγκέντρωση του πηκτώματος, από την ισχύ του ρεύματος που χρησιμοποιείται, από την ιονική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης και από την πυκνότητα των υπερελικωμένων στροφών του DNA.

-Την παρουσία του βρωμιούχου αιθιδίου: Το βρωμιούχο αιθίδιο προκαλεί ελάττωση της ικανότητας μετακίνησης του DNA κατά ένα ποσοστό 15%.

-Την τάση, η οποία χρησιμοποιείται.

-Το είδος της αγαρόζης [υπάρχουν δύο κύρια είδη αγαρόζης, η κανονική (standard) και η αγαρόζη χαμηλής τήξεως (low melting)].

-Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA επηρεάζεται από την σύνθεση και την ιονική ισχύ του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Η απώλεια ιόντων προκαλεί ελαχιστοποίηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας, με αποτέλεσμα τα τμήματα DNA που ηλεκτροφορούνται να μεταναστεύουν ελάχιστα ή και καθόλου. Στην αντίθετη περίπτωση, όταν η ιονική ισχύς είναι πολύ ισχυρή παράγονται υψηλά ποσοστά θερμότητας με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας μετανάστευσης. Βέβαια, η αύξηση της ισχύος πέραν ενός ορίου μπορεί να προκαλέσει αποδιάταξη του DNA ή και λιώσιμο του πηκτώματος, οπότε οι τιμές της ιονικής ισχύος δεν πρέπει να ξεπερνούν το επιθυμητό όριο.

Η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Sambrook et al. 1989. Για πήκτωμα διαστάσεων 5cm x 9cm x 0.5cm απαιτούνται περίπου 40 ml υγρού θερμού πηκτώματος. Αρχικά ετοιμάζεται η θήκη και τοποθετούνται

τα «χτενάκια». Ανάλογα με τα αναμενόμενα μεγέθη του DNA χρησιμοποιείται κατάλληλη συγκέντρωση αγαρόζης (στη περίπτωση μας 1,5 %) μαζί με διάλυμα TBE 1x και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολουθεί θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να λιώσει η αγαρόζη (1 λεπτό). Όταν το διάλυμα φτάσει στους 40°C περίπου προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml. Η προσθήκη του βρωμιούχου αιθιδίου απαιτείται για την οπτική παρατήρηση των τμημάτων DNA κάτω από υπεριώδες φως: το συγκεκριμένο αντιδραστήριο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται, με δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως, μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm.

Στην συνέχεια, το διάλυμα τοποθετείται στη θήκη και πολυμερίζεται πριν χρησιμοποιηθεί. Ακολουθεί ανάμειξη κατάλληλης ποσότητας του προϊόντος της PCR (10 µl) με 2 µl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης). Για τον προσδιορισμό και την πιστοποίηση των διάφορων ζωνών που αντιστοιχούν σε δίκλωνο DNA είναι απαραίτητη η ταυτόχρονη φόρτωση κατάλληλου μάρτυρα μοριακού βάρους (DNA ladder), ο οποίος αποτελείται από κομμάτια DNA γνωστού μήκους. Ο «ladder», που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο ΦX 174 (250 µg/ml), με μοριακό βάρος 1353 bp. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις σε ένταση 120 Volts, 50 mA για περίπου 1 ώρα.

Στη συνέχεια το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετείται κάτω από τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE, Hartland WI), όπου ελέγχεται και φωτογραφίζεται με Kodak digital camera.

Διαλύματα:

5 x TBE: 5.4% Tris base, 2.75% H₃BO₃, 10mM EDTA.

Διάλυμα φόρτωσης DNA: 1mM EDTA, 0.25% κυανό της βρωμοφαινόλης (bromophenol blue), 40% σουκρόζη.

B9.2. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR – ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΟΤΑΓΟΥΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ

Ο καθαρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με την χρήση του προϊόντος Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel) και σύμφωνα με την ακόλουθη διαδικασία: Παραλαμβάνονται 30µl από το προϊόν του πολλαπλασιασμού των cDNA και ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Όταν η ηλεκτροφόρηση προχωρήσει αρκετά, ώστε να διαχωριστούν τα προϊόντα πολλαπλασιασμού από τα τυχόν παραπροϊόντα, πραγματοποιείται αποκοπή των επιθυμητών τμημάτων, που αντιστοιχούν

στο πολλαπλασιασμένο DNA, ζύγισμα και μεταφορά τους σε σωλήνα erpendorf. Για κάθε 100mg τμήματος προστίθενται, στην συνέχεια, 300μl διαλύματος λύσης (NT1) και πραγματοποιείται θέρμανση σε υδατόλουτρο (50° C για 5-10 λεπτά) και ανάμειξη (vortex), ώστε να διαλυθούν πλήρως τα υπολείμματα του πηκτώματος. Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (column) των 2ml, όπου με φυγοκέντρηση στις 8000 x g για 1 λεπτό, το απομονωμένο DNA προσδένεται, ενώ το διήθημα που προκύπτει απορρίπτεται. Τελικά, μετά από 3 πλυσίματα με 600 μl διαλύματος NT3, 200λ NT3 και 500λ διαλύματος NT2, αντίστοιχα, το DNA αναδιαλύεται σε 25-50μl διαλύματος NE (φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 1 λεπτό).

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλινικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen Inc (Seoul, Korea). Η όλη διαδικασία διεκπεραιώθηκε τμηματικά, με την χρήση των αντίστοιχων εκκινητικών μορίων που εφαρμόστηκαν στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR).

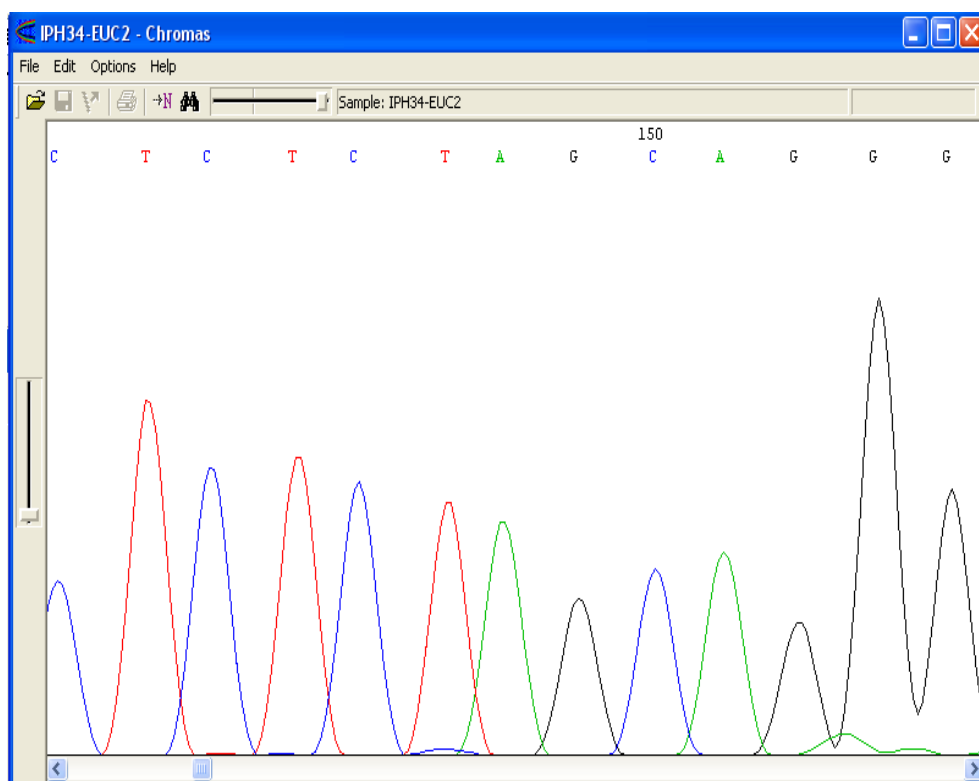
B10. ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των κλινικών στελεχών, που προσδιορίστηκαν, μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα και την πιθανή εξελικτική τους συσχέτιση συγκριτικά με τις αλληλουχίες προτύπων στελεχών εντεροϊών. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε εξελικτική μελέτη του 5' άκρου της VP1 περιοχής, του γενωμικού τμήματος που καλύπτει 300 βάσεις από το 3' άκρο της VP1 μέχρι το 5' άκρο της 2C (σε κάποια στελέχη αλληλουχήθηκε όλο το γονίδιο 2C) και τέλος ενός γονιδιακού τμήματος του 5' άκρου της 3D αλληλουχίας (600 βάσεις). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής που διατίθενται στο διαδίκτυο.

B10.1. ΔΙΟΡΘΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Τα αποτελέσματα καθορισμού της πρωτοταγούς διάταξης ενός γενετικού τμήματος παραλαμβάνονται με μορφή χρωματογραφήματος (εικόνα 26), που μπορεί εύκολα να «διαβαστεί», μετά τον καθαρισμό του πιθανού θορύβου που συνοδεύει κάθε αλληλουχία. Σε πολλές, ωστόσο, περιπτώσεις είναι πιθανό, ο θόρυβος να δημιουργεί πρόβλημα στην ανάγνωση, με αποτέλεσμα κάποιες κορυφές να αναγνωρίζονται ως N, δηλαδή ως πιθανή ύπαρξη, στην συγκεκριμένη θέση, οποιασδήποτε από της A, T, G ή C βάσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις απαιτείται εμπειρία για την διάκριση της πραγματικής αλληλουχίας, ενώ σε άλλες, απαιτείται η επανάληψη όλης της διαδικασίας προσδιορισμού της πρωτοδιάταξης. Επίσης, σε περιπτώσεις που μία αλληλουχία είναι

φαινομενικά σωστή, είναι απαραίτητη η προσεκτική ανάλυσή της βάση προς βάση, και κορυφή προς κορυφή, για την ανίχνευση πιθανών κενών (gaps), δηλαδή κορυφών του χρωματογραφήματος, που δεν έχουν διαβαστεί και υπολείπονται από το κείμενο που αντιστοιχεί στην πρωτοδιάταξη της αλληλουχίας.



Εικόνα. 26. Μορφή χρωματογραφήματος

B10.2. ΕΥΡΕΣΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ

Μετά από την ταυτοποίηση μιας καινούργιας αλληλουχίας νουκλεοτιδίων ή αμινοξέων, απαιτείται συχνά η αναζήτηση της κοντινότερης προς αυτήν ομόλογης ή όμοιας αλληλουχίας. Η σύγκριση πραγματοποιείται μέσα από ένα σύνολο αλληλουχιών, που βρίσκονται κατατεθειμένες στις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (EMBL, GenBank, DDBJ). Η ανεύρεση του πιο κοντινού, από άποψη πρωτοταγούς δομής, γονιδίου πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), το οποίο δημιουργήθηκε το 1990 από τους Altschul et al., και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο μέσα από την διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.

Ο αλγόριθμος BLAST λειτουργεί μέσω μιας διαδικασίας διάσπασης της αρχικής αλληλουχίας σε μικρότερα γενωμικά τμήματα ή «λέξεις», ενώ ταυτόχρονα πραγματοποιείται αναζήτηση της συσχέτισης μεταξύ των «λέξεων» αυτών και άλλων «λέξεων», οι οποίες προέρχονται από την διάσπαση των ήδη κατατεθειμένων στο διαδίκτυο (GenBank) αλληλουχιών. Μόλις εντοπισθεί ένα τέτοιο «ταίριασμα» μεταξύ δύο τμημάτων, τότε η αναζήτηση συσχέτισης επεκτείνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις (upstream και downstream) των ομόλογων τμημάτων, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μία τοπική στοίχιση. Η ποιότητα κάθε στοίχισης ποσοτικοποιείται σε μία κλίμακα και οι τοπικές στοίχισεις με την υψηλότερη βαθμολογία συσχέτισης (HSPs – high scoring segment pairs) καταγράφονται με μορφή πίνακα. Ο πίνακας αυτός παρουσιάζει τελικά τις πιο «συγγενικές» προς την εξερευνούμενη περιοχή, αλληλουχίες, κατά σειρά μειωμένης βαθμολογίας συσχέτισης, κι επομένως ομολογίας (εικόνα 27).

Πρέπει να σημειωθεί ότι η οικογένεια προγραμμάτων BLAST περιλαμβάνει πολλά εξειδικευμένα προγράμματα αναζήτησης με κυριότερα το BLASTN, το οποίο συγκρίνει μία αρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία με την νουκλεοτιδική βάση δεδομένων, το BLASTP, το οποίο συγκρίνει πρωτεϊνικές αλληλουχίες και το BLASTX, μέσω του οποίου μία αρχική νουκλεοτιδική αλληλουχία μεταφράζεται σε όλα τα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης και στην συνέχεια συγκρίνεται με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Στην παρούσα μελέτη, μετά από την διόρθωση των αρχικών χρωματογραφημάτων, οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τα γενωμικά τμήματα 5'VP1, 3'VP1, 2A, 2B, 2C και 3D τοποθετήθηκαν στα προγράμματα BLASTN και BLASTP σε μορφή fasta [στην μορφή «fasta», το όνομα κάθε στελέχους στο οποίο αντιστοιχεί η αλληλουχία γράφεται μετά από ένα σύμβολο «>» ενώ ακολουθεί ένα κενό, πριν την γραφή της αλληλουχίας με μορφή βάσεων ή αμινοξέων (εικόνα 28)]. Στην περίπτωση των τμημάτων που αφορούσαν στην VP1 περιοχή, η ανεύρεση της κοντινότερης ομόλογης αλληλουχίας, οδήγησε ταυτόχρονα στην ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών, σύμφωνα με προηγούμενες δημοσιεύσεις (Oberste et al., 2003, Caro et al., 2001). Στις μη δομικές περιοχές που μελετήθηκαν (2A, 2B, 2C και 3D) η χρήση των προγραμμάτων (BLASTN και BLASTP) βοήθησε στην ανεύρεση των κοντινότερων, ετεροτυπικών στελεχών για μελλοντική μελέτη πιθανών ανασυνδυασμών και εξελικτικών σχέσεων.

NCBI BLAST: Nucleotide sequence (616 letters) - Microsoft Internet Explorer

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

My NCBI [Sign In] [Register]

NCBI BLAST/blastn/Formatting Results - 6ZGJY5VC012 [Reformat these Results] [Edit and Resubmit] [Sign in above to save your search strategy]

Job Title: Nucleotide sequence (616 letters)

BLASTN 2.2.16 (Mar-25-2007)

RID: 6ZGJY5VC012

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
5,340,958 sequences; 20,830,057,833 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#) [Taxonomy reports](#)

Query=
Length=616

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY697439.1	Human echovirus 30 isolate Kar polyprotein gene, partial cds	1138	1138	100%	0.0	100%	
AY697438.1	Human echovirus 30 isolate Han polyprotein gene, partial cds	1112	1112	99%	0.0	99%	
AY518356.3	Human echovirus 30 isolate Kal polyprotein gene, partial cds	1105	1105	99%	0.0	99%	
AY697437.1	Human echovirus 30 isolate Pan polyprotein gene, partial cds	1083	1083	99%	0.0	98%	
AY518359.2	Human echovirus 30 isolate Sour polyprotein gene, VP1-2C region, p2	1055	1055	99%	0.0	97%	
AM237320.1	Human echovirus 30 partial polyprotein, isolate CF1495-00, genomic f	1040	1040	99%	0.0	97%	
AJ295171.1	Human echovirus 30 genomic RNA for partial polyprotein gene, isolate	1000	1000	100%	0.0	95%	
AM237319.1	/isolation source="faeces"	983	983	100%	0.0	95%	
AM237318.1	Human echovirus 30 partial polyprotein, isolate CF1845-94, genomic f	928	928	100%	0.0	93%	
AJ295178.1	Human echovirus 30 genomic RNA for partial polyprotein gene (VP1-4	928	928	94%	0.0	95%	
AM237316.1	Human echovirus 30 partial polyprotein, isolate CF670-91, genomic RI	905	905	100%	0.0	93%	
AJ279174.1	Echovirus 30 VP1-2A region, isolate FR-2689/91, genomic RNA	883	883	100%	0.0	92%	
AJ279192.1	Echovirus 30 VP1-2A region, isolate FR-2479/96, genomic RNA	876	876	99%	0.0	92%	
AJ279198.1	Echovirus 30 VP1-2A region, isolate FR-2099/92, genomic RNA	872	872	100%	0.0	92%	
AJ279197.1	Echovirus 30 VP1-2A region, isolate FR-2298/96, genomic RNA	870	870	99%	0.0	92%	
AJ279191.1	Echovirus 30 VP1-2A region, isolate FR-1829/96, genomic RNA	870	870	99%	0.0	92%	
AM237322.1	Human echovirus 30 partial polyprotein, isolate CF521-96, genomic RI	861	861	99%	0.0	91%	
AM237317.1	Human echovirus 30 partial polyprotein, isolate CF495-92, genomic RI	856	856	100%	0.0	91%	

Εικόνα 27 Αποτελέσματα αναζήτησης Blast μετά από την εισαγωγή της γενετικής αλληλουχίας του στελεχούς *Human Echovirus 30 isolate Kar* στο ειδικό παράθυρο δεδομένων.

NCBI BLAST/blastn suite: BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query.

Enter Query Sequence

Enter accession number, gi, or FASTA sequence

Query subrange

From

To

Or, upload file

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Choose Search Set

Database

Human genomic + transcript Mouse genomic + transcript Others (nr etc.)

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism

Optional

Enter organism name or id - completions will be suggested

Optional

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown.

Entrez Query

Optional

Enter an Entrez query to limit search

Program Selection

Optimize for

Highly similar sequences (megablast)

More dissimilar sequences (discontiguous megablast)

Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database nr using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

Algorithm parameters

Note: Parameter values that differ from the default are highlighted in yellow

Εικόνα 28 Τοποθέτηση αλληλουχίας σε μορφή fasta στο ειδικό παράθυρο δεδομένων του προγράμματος Blast.

Αξίζει, τέλος, να αναφερθεί ότι τα πρωταρχικά προγράμματα BLAST, που σχεδιάστηκαν, δεν μπορούσαν να διαχειριστούν την παρουσία κενών (gaps) στις στοιχίσεις. Η δυνατότητα αυτή εισήχθη το 1997, μέσω των προγραμμάτων BLAST νέας γενιάς. Τα συγκεκριμένα προγράμματα μπορούν να διαχειρίζονται πιθανά κενά ενώ ταυτόχρονα διαθέτουν μία νέα δυνατότητα εύρεσης ισχνών, αλλά βιολογικά σημαντικών ομοιοτήτων μεταξύ αλληλουχιών με μικρή συγγένεια. Επιπλέον, το πρόγραμμα PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST) διαθέτει την ικανότητα δόμησης ενός βαθμολογικού λογισμικού ή προφίλ, το οποίο παρουσιάζει ειδικότητα θέσης. Μέσω αυτού, από τις πολλαπλές στοιχίσεις με την υψηλότερη συσχέτιση είναι δυνατό να ανιχνευθούν υψηλά συντηρημένες θέσεις σε συγκεκριμένες πρωτοταγείς διατάξεις. Το σύστημα αυτό, εφαρμόστηκε στην περίπτωση των αλληλουχιών που προέκυψαν από τις 2C και 3D περιοχές, για τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινήτων, που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν, στην συνέχεια, για τον πολλαπλασιασμό επιπρόσθετων γενωμικών τμημάτων των κλινικών μας στελεχών (3' άκρο της 2C και 3' άκρο της 3D). Η διαδικασία αυτή ήταν απαραίτητη δεδομένου ότι οι αλληλουχίες που διατίθενται από τα αντίστοιχα τμήματα στο διαδίκτυο, αφορούν κυρίως σε πρότυπα στελέχη και είναι ακατάλληλες για τον πολλαπλασιασμό των γενετικά εξελιγμένων, ιδίως στις λειτουργικές περιοχές του γονιδιώματος, κλινικών στελεχών.

B10.3. ΣΤΟΙΧΙΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΩΝ (CLUSTALW - CLUSTALX)

Ένα από τα κοινά σημεία των αναλύσεων αλληλουχιών είναι η στοίχιση των γενωμικών τμημάτων που πρόκειται να μελετηθούν. Η στοίχιση προηγείται οποιασδήποτε περαιτέρω επεξεργασίας, είτε αυτή αφορά στην εύρεση ομοιοτήτων μέσα σε μία οικογένεια αλληλουχιών, είτε στην πρόβλεψη δευτεροταγών δομών των στοιχισμένων τμημάτων. Φυσικά, ο κύριος λόγος για τον οποίο πρέπει πρωταρχικά οι υπό μελέτη αλληλουχίες να τοποθετηθούν σωστά η μία εκατέρωθεν της άλλης είναι η φυλογενετική τους μελέτη, η οποία δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί αν η στοίχιση δεν είναι σωστή.

Μερικά από τα κυριότερα προβλήματα, τα οποία πρέπει να αντιμετωπιστούν προκειμένου να πραγματοποιηθεί σωστά η στοίχιση ενός μεγάλου αριθμού αλληλουχιών είναι η παρουσία επαναλήψεων, μεταλλάξεων και κενών στις υπό μελέτη αλληλουχίες. Για την υπερπήδηση των προαναφερθέντων, αλλά και άλλων εμποδίων, έχουν σχεδιαστεί

ποικίλα προγράμματα (Dot Plot, Dynamic, MSA, FastMSA, SAGA, DCA, PRRP, DIALIGN), τα οποία χρησιμοποιούν διάφορους αλγορίθμους.

Μια συνηθισμένη διαδικασία στοίχισης περιλαμβάνει την εφαρμογή των προγραμμάτων Clustal (ClustalW και ClustalX), τα οποία επιλέχθηκαν στην παρούσα εργασία.

Τα προγράμματα Clustal διατίθενται ελεύθερα (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>), είναι πανομοιότυπα από την άποψη του αλγορίθμου που χρησιμοποιούν και διαθέτουν δυνατότητα λήψης ενός αρχείου αλληλουχιών και αυτόματης στοίχισής τους με την προοδευτική διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω. Η διαφοροποίηση των δύο προγραμμάτων έγκειται στο γεγονός ότι το ClustalW προσφέρει ένα σχετικά απλό περιβάλλον εργασίας βασισμένο σε δομή κειμένου (simple text-based interface), το οποίο είναι κατάλληλο για εργασίες υψηλού φόρτου (high throughput tasks), ενώ το ClustalX προσφέρει ένα γραφικό περιβάλλον (graphical interface).

Τα δύο προγράμματα Clustal διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία συμβάλλουν στην πραγματοποίηση στοιχίσεων με εξαιρετική ακρίβεια και ταχύτητα. Οι αλληλουχίες, αρχικά, «ζυγίζονται» μία προς μία, ανάλογα με το πόσο στενά συγγενικές είναι μεταξύ τους (με βάση το πρωταρχικό δέντρο – guide tree). Αυτό είναι ιδιαίτερα χρήσιμο γιατί αποτρέπει τον περιορισμό μίας στοίχισης, που μπορεί να προκύψει από την ύπαρξη μεγάλων ομάδων παρόμοιων αλληλουχιών. Κατά δεύτερον, στην περίπτωση των αμινοξικών στοιχίσεων, το λογισμικό που «ζυγίζει» τις αλληλουχίες (weight matrix), ποικίλλει, ανάλογα με το πόσο συγγενικές είναι δύο αλληλουχίες ή δύο ομάδες αλληλουχιών. Έτσι στην περίπτωση στενά συγγενικών αλληλουχιών χρησιμοποιείται λογισμικό που δίνει υψηλή βαθμολογία (high scores) ενώ στην αντίθετη περίπτωση, δίνει χαμηλή. Αυτό είναι σημαντικό, γιατί είναι απαραίτητη η απόδοση υψηλής βαθμολογίας σε ταιριάσματα (matches) συντηρημένων αμινοξικών τμημάτων. Τέλος, ένα βασικό πλεονέκτημα των προγραμμάτων είναι ότι χρησιμοποιούν μία σειρά τεσσάρων λογισμικών είτε από την σειρά BLOSUM είτε από την σειρά PAM (Henikoff and Henikoff, 1992). Με αυτόν τον τρόπο το πρόγραμμα επιχειρεί να δημιουργήσει, κατά την διάρκεια της στοίχισης, μία διαβάθμιση στην ποινή, που επιβάλλεται στην συνολική βαθμολογία στοίχισης λόγω της ύπαρξης κενών (gap-penalties), με τρόπο που εξαρτάται από κάθε αλληλουχία και κάθε συγκεκριμένη θέση που συγκρίνεται. Αυτός ο τοπο – ειδικός (position-specific) μηχανισμός διαφορικής μείωσης της βαθμολογίας με βάση τα κενά, μπορεί να πραγματοποιηθεί τεχνητά (με ρύθμιση πριν από την στοίχιση) ή αυτόματα και χρησιμοποιείται για την συγκέντρωση κενών στις θηλιές που υπάρχουν

μεταξύ των στοιχείων δευτεροταγούς δομής. Σε περίπτωση αυτόματης ρύθμισης οι ποινές (gap penalties) μειώνονται σε θέσεις στοιχίσεως υδροφυλικών καταλοίπων (πιθανώς θηλειών) ή σε θέσεις, όπου υπάρχουν ήδη πολλά κενά. Επίσης μειώνονται κοντά σε μερικά κατάλοιπα, όπως είναι τα κατάλοιπα γλυκίνης. Αντίθετα, η ποινή που επιβάλλεται αυξάνεται σε θέσεις γειτονικές σε υπάρχοντα κενά ή σε άλλα συγκεκριμένα κατάλοιπα.

Στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες κάθε γενωμικής, προς σύγκριση, περιοχής τοποθετήθηκαν σε μορφή «fasta» η μία εκατέρωθεν της άλλης. Στην συνέχεια, το σύνολο των αλληλουχιών τοποθετήθηκε μέσω αντιγραφής-επικόλλησης στο ειδικό παράθυρο του προγράμματος, όπου μετά την πληκτρολόγηση της αντίστοιχης εντολής πραγματοποιήθηκε η στοίχισή τους ανά ζεύγη προκειμένου να παραχθεί ένα λογισμικό απόστασης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός πρωταρχικού δέντρου των αλληλουχιών. Το αποτέλεσμα κάθε στοίχισης διασώθηκε με την μορφή αρχείου κατάληξης «.aln» για περαιτέρω χρήση στο πρόγραμμα στοίχισης ClustalX.

Όπως προαναφέρθηκε, το πρόγραμμα ClustalX παρέχει ένα γραφικό περιβάλλον εργασίας (graphical interface), στο οποίο είναι δυνατή η αναπαράσταση των στοιχίσεων σε έγχρωμη μορφή. Επίσης, είναι δυνατή η αλλαγή των παραμέτρων λειτουργίας του προγράμματος, πριν από κάθε στοίχιση (από την εντολή «Alignment Parameters» στο μενού Alignment). Για την επιλογή των καταλληλότερων παραμέτρων δεν υπάρχουν γενικοί κανόνες. Αν, για παράδειγμα, μία στοίχιση επιδεικνύει πολλά, μεγάλα κενά, τότε ο χρήστης μπορεί να αυξήσει την παράμετρο «gap-opening penalty» και να επαναλάβει την στοίχιση. Η αξιολόγηση, ωστόσο, κάθε στοίχισης, είναι εφικτή μέσω μίας καμπύλης ποιότητας στοίχισης (alignment quality curve) η οποία παράγεται από το ClustalX στην βάση των αλληλουχιών, μετά το τέλος κάθε εργασίας.

Πιθανώς, το πιο σημαντικό πρόβλημα κατά την διόρθωση ή βελτίωση μίας στοίχισης, είναι, όπως και στο ClustalW η διαχείριση των κενών. Τα κενά είναι απαραίτητα να εισάγονται γιατί η φυλογενετική συσχέτιση απαιτεί τοπολογική ομολογία (positional homology). Αυτό σημαίνει, ότι τα νουκλεοτίδια που παρατηρούνται σε μία συγκεκριμένη θέση στις ταξινομικές βαθμίδες που ερευνώνται αντλούν, υποθετικά, την καταγωγή τους από μία συγκεκριμένη θέση ενός κοινού προγόνου (Swofford et al., 1996). Όταν λοιπόν, δύο ή περισσότερες, υποθετικά ομόλογες αλληλουχίες έχουν διαφορετικό μήκος, τότε η τοποθέτηση των κενών επιτρέπει την ανάκτηση αυτής της τοπολογικής ομολογίας. Στην περίπτωση της δικής μας μελέτης, η εισαγωγή των κενών

πραγματοποιήθηκε μέσω του ClustalW. Το αρχείο που διασώθηκε από την αρχική στοίχιση μέσω αυτού του προγράμματος (aln) εισήχθη στην συνέχεια στο ClustalX, όπου πραγματοποιήθηκε επανάληψη της στοίχισης μέσω της εντολής «Do complete Alignment» από το μενού «Alignment». Με αυτόν τον τρόπο προέκυψε ένα αρχείο που περιείχε ένα πρωταρχικό δέντρο (output Guide Tree) και ένα αρχείο με το αποτέλεσμα της στοίχισης (Alignment file).

B10.4. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ

Οι μέθοδοι κατασκευής δένδρων μπορούν να ταξινομηθούν σε μεθόδους βασισμένες σε αποστάσεις και σε μεθόδους βασισμένες σε χαρακτήρες. Οι πιο κοινά εφαρμόσιμες μέθοδοι βασισμένες στην απόσταση περιλαμβάνουν την Ένωση Γειτόνων (Neighbor Joining-NJ) και τη μέθοδο των Fitch-Margoliash, ενώ οι πιο κοινές μέθοδοι βασισμένες σε χαρακτήρες περιλαμβάνουν τη Μέγιστη Φειδολότητα (Maximum Parsimony) και τη Μέγιστη Πιθανοφάνεια (Maximum Likelihood). Οι μέθοδοι που βασίζονται στην απόσταση χρησιμοποιούν το βαθμό ανομοιότητας ανάμεσα σε δύο στοιχισμένες ακολουθίες για να παράγουν δένδρα. Οι μέθοδοι που βασίζονται σε χαρακτήρες έχουν λίγα κοινά μεταξύ τους, εκτός από τη χρησιμοποίηση των δεδομένων των χαρακτήρων σε όλα τα βήματα της ανάλυσης. Αυτό επιτρέπει την εκτίμηση της αξιοπιστίας της θέσης κάθε βάσης, σε μία στοίχιση, με βάση όλες τις άλλες θέσεις των βάσεων.

Σε όλες τις περιπτώσεις των κλινικών αλληλουχιών που μελετήθηκαν η αρχική κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό ClustalX, το οποίο, ανήκει στην κατηγορία των προγραμμάτων που βασίζονται σε μεθόδους υπολογισμού γενετικής απόστασης (NJ) για την κατασκευή εξελικτικών δέντρων από ένα σύνολο πληροφοριών που βρίσκονται σε έναν αριθμό αλληλουχιών. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στην παρατήρηση ότι τα δέντρα NJ προσεγγίζουν πάντα την πραγματική φυλογένεση ακόμη και στην περίπτωση εξέτασης μεγάλου αριθμού αλληλουχιών.

Επιπρόσθετα, ωστόσο, ακολούθησε η κατασκευή μίας δεύτερης σειράς φυλογενετικών δέντρων με την χρήση του λογισμικού πακέτου PhyIip (<http://evolution.genetics.washington.edu/PHYLIIP.html>). Πρόκειται για ένα λογισμικό πακέτο (Phylogeny Inference Package) το οποίο αποτελείται από διάφορα προγράμματα υπολογισμού γενετικών αποστάσεων και κατασκευής φυλογενετικών δέντρων σύμφωνα με διαφορετικούς αλγόριθμους. Η μέθοδος που επιλέχθηκε στην συγκεκριμένη περίπτωση, ήταν αυτή της Μέγιστης Πιθανοφάνειας. Η κύρια ιδέα στην φυλογένεση που

προκύπτει μέσω της μέγιστης πιθανοφάνειας είναι ο καθορισμός της τοπολογίας των δέντρων, του μήκους των κλάδων και των παραμέτρων του εξελικτικού μοντέλου (π.χ. της αναλογίας μετάβασης / μεταστροφής), κατά τέτοιο τρόπο ώστε να αυξάνεται η πιθανότητα παρατήρησης των πραγματικών εξελικτικών γεγονότων που έχουν συμβεί σε κάθε μία αλληλουχία. Η μέγιστη πιθανοφάνεια, είναι ουσιαστικά η πιθανότητα του παρατηρούμενου γεγονότος και όχι η πιθανότητα των παραμέτρων που έχουν τεθεί. Έτσι, ενώ οι μέθοδοι που βασίζονται στην γενετική απόσταση αντλούν τους υπολογισμούς τους μόνο από τα δεδομένα του αριθμού των μεταλλάξεων ανά θέση, η μέγιστη πιθανοφάνεια συνυπολογίζει όλες τις σχετικές παραμέτρους ενός δεδομένου μοντέλου μεταλλάξεων (substitutional model). Ωστόσο, όταν γίνονται οι υπολογισμοί για την κατασκευή ενός φυλογενετικού δέντρου, μέσω της Μέγιστης Πιθανοφάνειας, οι παράμετροι του εξελικτικού μοντέλου και τα μήκη των κλάδων, πρέπει να υπολογιστούν σε όλα τα προκύπτοντα δέντρα, και από αυτά να γίνει η επιλογή του καλύτερου. Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιείται στα διάφορα προγράμματα ειδική καθοδήγηση για την επιλογή των πιο λογικών φυλογενετικών γραμμών. Στην περίπτωση του πακέτου PHYLIP, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα DNAML για τον σχεδιασμό και την επιλογή των πιο κατάλληλων φυλογενετικών δέντρων.

B10.5. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ

Η αξιολόγηση των φυλογενετικών δέντρων, που προέκυψαν με τους διαφορετικούς αλγορίθμους, πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης bootstrap. Επινοήθηκε το 1979 (Efron, 1979) και προτάθηκε ως μια μέθοδος εκτίμησης δένδρων στη φυλογενετική ανάλυση από τον Felsenstein (Felsenstein et al., 1985) Η ανάλυση bootstrap είναι ουσιαστικά μία τεχνική δειγματοληψίας (sampling) που εφαρμόζεται με σκοπό τον καθορισμό του στατιστικού λάθους σε καταστάσεις στις οποίες η βασική κατανομή των δειγμάτων είτε είναι άγνωστη είτε είναι δύσκολο να προκύψει με αναλυτικό τρόπο. Συγκεκριμένα, η τεχνική προσφέρει έναν εύχρηστο τρόπο υπολογισμού της βασικής κατανομής μέσω επαναλαμβανόμενης τυχαίας δειγματοληψίας από ένα αρχικό σύστημα δεδομένων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται resampling.

Μέσω της ανάλυσης bootstrap επιτυγχάνεται ο έλεγχος της σχετικής σταθερότητας των φυλογενετικών ομάδων, που δημιουργούνται στα φυλογενετικά δέντρα. Το κύριο πλεονέκτημά της είναι ότι μπορεί να εφαρμοσθεί σε όλες τις μεθόδους κατασκευής δέντρων. Συνολικά, κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, θεωρούνται αξιόπιστοι κλάδοι ή ομάδες οι οποίες υποστηρίζονται από bootstrap value μεγαλύτερο

του 70 – 75%, ενώ στην περίπτωση που η αξία bootstrap είναι μικρότερη του 70%, τότε οι κλάδοι πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή.

B10.6. ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ (TREEVIEW)

Η απεικόνιση των φυλογενετικών δέντρων πραγματοποιήθηκε, και στις δύο περιπτώσεις κατασκευής (μέσω των ClustalX και Phylip) με την εφαρμογή του προγράμματος TreeView 1.6.6 (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/~rod/treeview/html>). Στην περίπτωση του προγράμματος TreeView, τα «bootstrap values» των δέντρων παρουσιάζονται μετά από πληκτρολόγηση της εντολής «Show internal edges labels» από το μενού «Tree».

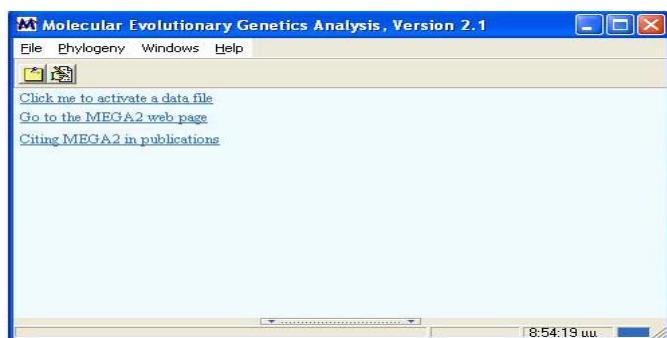
B10.7. ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΜΕΛΕΤΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ (MEGA)

Επιπρόσθετα των φυλογενετικών σχέσεων, τα γενωμικά τμήματα των κλινικών στελεχών συγκρίθηκαν από άποψη μέσης νουκλεοτιδικής απόκλισης με την χρήση του προγράμματος MEGA 2.1 (Kumar et al. 2001), το οποίο είναι διαθέσιμο στην διεύθυνση <http://www.megasoftware.net>. Το πρόγραμμα αυτό διαθέτει την ικανότητα υπολογισμού μιας σειράς παραμέτρων για την ανάλυση νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών από εξελικτική άποψη.

Για την μελέτη των αλληλουχιών απαιτείται η κατασκευή ενός αρχείου αλληλουχιών σε μορφή mega: Αρχικά γράφεται το σύμβολο «#» ακολουθούμενο από την λέξη «mega». Στη δεύτερη γραμμή αναγράφεται το σύμβολο «!» και η λέξη «Title», μετά από την οποία ακολουθεί το όνομα που θέλουμε να δώσουμε στην εργασία που θα πραγματοποιηθεί. Π.χ για την 3D περιοχή, αναγράφεται «3D». Στις επόμενες σειρές, ακολουθούν οι αλληλουχίες, μπροστά από τις οποίες εισάγεται ξανά το σύμβολο «#» ακολουθούμενο από το όνομα κάθε αλληλουχίας. Τέλος το αρχείο σώζεται με κατάληξη «.meg».

Ανοίγοντας το ειδικό παράθυρο του προγράμματος (εικόνα 29), από την επιλογή file δίνεται η εντολή «open data» για την εισαγωγή του κατασκευασμένου αρχείου «meg». Στην συνέχεια είναι δυνατός ο χωρισμός των αλληλουχιών σε ομάδες για την πραγματοποίηση ομαδοποιημένων μελετών (από την εντολή «select taxa and groups» του μενού «data»). Από την επιλογή «distances» επιλέγεται το μοντέλο, που θα χρησιμοποιηθεί για την μελέτη (στην συγκεκριμένη περίπτωση εφαρμόστηκε το «Nucleotide: No. Of differences»), ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζεται η αναλογία

transition/transversion (στην οποία τίθεται η τιμή 2) και η παράμετρος γ (τιμή 1). Πρέπει να τονιστεί ότι η απόσταση που υπολογίζεται με το πρόγραμμα Mega, είναι απλώς ο αριθμός των θέσεων, στις οποίες οι αλληλουχίες, συγκρινόμενες ανά δύο, είναι διαφορετικές. Για την σωστή, λοιπόν, διαχείριση των κενών, σε αυτήν την περίπτωση, απαιτείται η προεπιλογή της εντολής complete-deletion για διαγραφή των κενών που εισάγονται κατά την στοίχιση των αλληλουχιών.



Εικόνα 29. Παράθυρο εργασίας του προγράμματος Mega

Τέλος, από το μενού «distances» επιλέγεται είτε η εντολή «compute pairwise», στην περίπτωση που θέλουμε να γίνει σύγκριση των αλληλουχιών μία προς μία, είτε η εντολή «compute within / among group means», αν απαιτείται σύγκριση των ομάδων που έχουν προκαθοριστεί. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, το πρόγραμμα δίνει την ικανότητα υπολογισμού του αριθμού των νουκλεοτιδικών θέσεων που διαφέρουν (D: Transitions + Transversions), του αριθμού των θέσεων που παρουσιάζουν μετάβαση (s: Transitions only), του αριθμού των θέσεων που παρουσιάζουν μεταστροφή (v: Transversions only) και τέλος της αναλογίας των μεταβάσεων έναντι των μεταστροφών ($R = s/v$). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η εντολή D (D: Transitions + Transversions), και κάθε τελικό αριθμητικό αποτέλεσμα (εικόνα 30) διαιρέθηκε με τον αριθμό των νουκλεοτιδίων, που συγκρίθηκαν σε κάθε γενετική περιοχή. Με αυτόν τον τρόπο, προέκυψε τελικά η εκατοστιαία νουκλεοτιδική απόκλιση των αλληλουχιών ή των ομάδων των αλληλουχιών των κλινικών στελεχών, σε κάθε γενωμικό τμήμα που αναλύθηκε.

Εικόνα 30. Πίνακας αποτελεσμάτων από τον υπολογισμό της μέσης νουκλεοτιδικής απόστασης μεταξύ κλινικών στελεχών στην 3D περιοχή

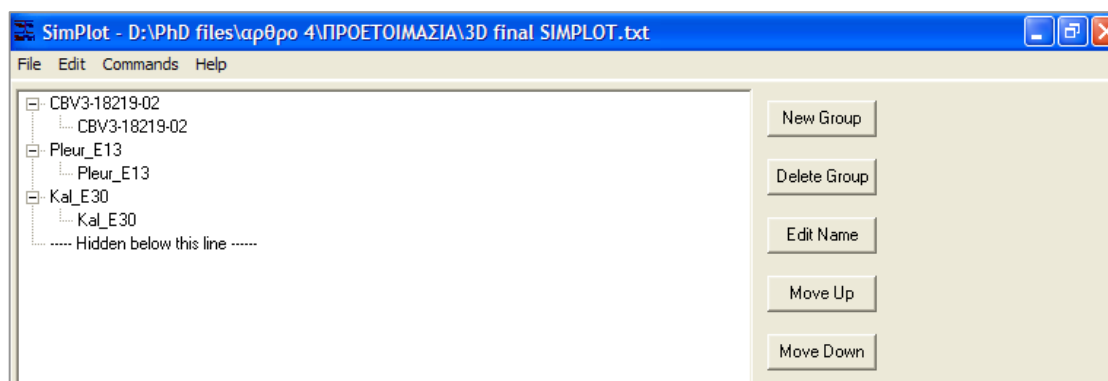
B10.8. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ

Οι περισσότερες μέθοδοι, που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών ή την χαρτογράφηση των θέσεων ανασυνδυασμού σε γενετικές αλληλουχίες, χρησιμοποιούν αλγορίθμους που βασίζονται στην γενετική απόσταση ή την φυλογενετική ανάλυση. Επιπρόσθετα, αρκετές μέθοδοι (average-over-window-scanning approaches) χρησιμοποιούν μία προσέγγιση σάρωσης, η οποία βασίζεται στην μετρούμενη παρέκκλιση (variant) της υπό μελέτη αλληλουχίας από έναν μέσο όρο. Η αρχή αυτών των μεθόδων είναι η εξής: Ένα σύνολο αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences) και μία πιθανά ανασυνδυασμένη αλληλουχία (query sequence) στοιχίζονται και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε αλληλοεπικαλυπτόμενες υποπεριοχές, για τις οποίες υπολογίζεται μία παράμετρος (statistic / measure). Αυτή η παράμετρος, στη συνέχεια αναπαρίσταται σε ένα γράφημα x/y (x/y scatter plot), τοποθετώντας ως συντεταγμένες στο άξονα x τις τιμές της στοίχισης (alignment coordinates), και στον άξονα y την διακύμανση της παραμέτρου. Όλες οι τιμές (values) καταγράφονται στο μέσο (midpoint) ενός παράθυρου απεικόνισης (window) και συνδέονται γραφικά μέσω οριζόντιων γραμμών.

Στην παραπάνω κατηγορία μεθόδων ανήκουν οι μέθοδοι ομοιότητας – ετερογένειας (similarity – dissimilarity methods) και οι μέθοδοι σάρωσης bootscanning,

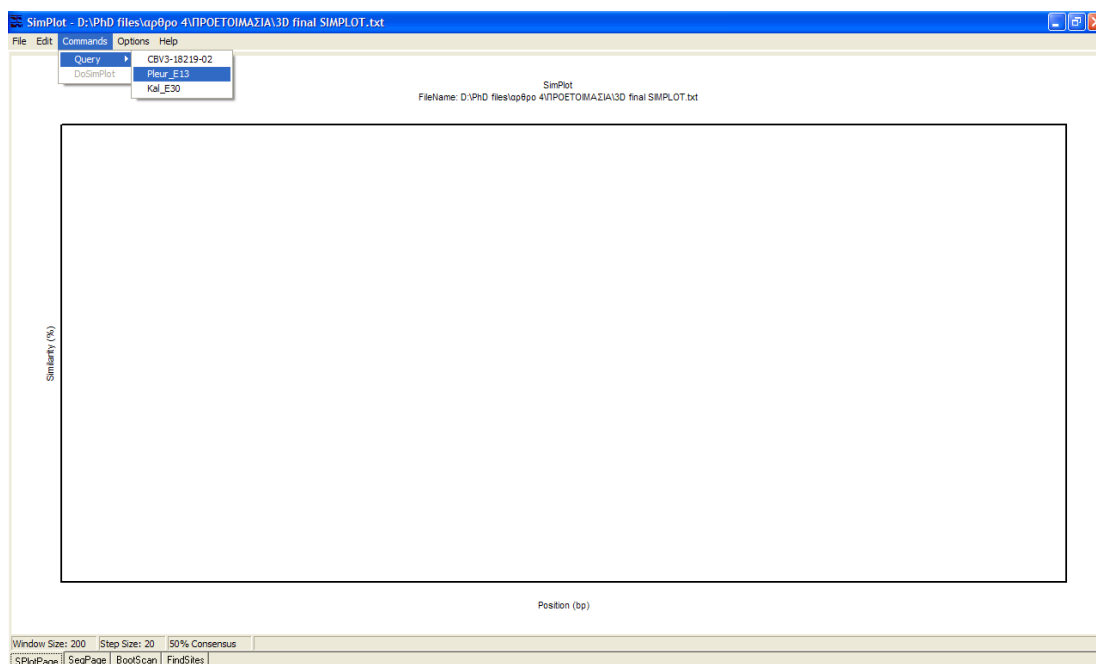
οι οποίες βασίζονται σε ένα συνδυασμό φυλογενετικής ανάλυσης και ελέγχου αξιοπιστίας (bootstrap value) των υπό μελέτη αλληλουχιών. Στην πρώτη περίπτωση, η ανάλυση των πιθανά ανασυνδυασμένων αλληλουχιών πραγματοποιείται, χρησιμοποιώντας ως παράμετρο (statistic/ measure) την τιμή της ομοιότητας (sim – similarity value) ή της ετερογένειας (1-sim), που υπολογίζεται μεταξύ της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) και κάθε μίας εκ των αλληλουχιών αναφοράς (reference sequences). Στη δεύτερη περίπτωση, η φυλογενετική συσχέτιση των αλληλουχιών σε κάθε παράθυρο σάρωσης προκύπτει χρησιμοποιώντας το λεγόμενο «bootstrap resampling, το οποίο προαναφέρθηκε, και η παράμετρος που επιλέγεται για την σύγκριση είναι η αξία bootstrap των κλάδων που περιέχουν την πιθανά ανασυνδυασμένη αλληλουχία μαζί με κάποια ή κάποιες από τις αλληλουχίες αναφοράς. Το πλεονέκτημα των μεθόδων σάρωσης bootscanning έναντι των μεθόδων ομοιότητας έγκειται στο γεγονός ότι η μετάπτωση από μία υψηλή σε μία χαμηλή αξία, χρησιμοποιώντας ως μέτρο σύγκρισης τις τιμές bootstrap, είναι πιο προφανής.

Στην περίπτωση των κλινικών στελεχών, που αναλύθηκαν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό στην παρούσα μελέτη, επιλέχθηκε, για τους λόγους που προαναφέρθηκαν, το λογισμικό πακέτο Simplot, το οποίο πραγματοποιεί ανάλυση ομοιότητας-ετερογένειας αλλά και ανάλυση bootscanning. Το Simplot αποτελεί ένα ευπροσάρμοστο λογισμικό ανάλυσης ανασυνδυασμών (Lole et al., 1999) και μπορεί να εγκατασταθεί μέσω της διεύθυνσης <http://sray.med.som.jhmi.edu/RaySoft/SimPlot/>. Για την πραγματοποίηση μελέτης Bootscanning είναι απαραίτητη και η ύπαρξη του λογισμικού πακέτου PHYLIP (απαραίτητα αρχεία είναι τα PHYLIP95.exe και PHYLIP96.exe) ενώ για την πραγματοποίηση σάρωσης με παράμετρο σύγκρισης την ομοιότητα ή την ετερογένεια των αλληλουχιών, το πρόγραμμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί αμέσως μετά την φόρτωσή του ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία: Μετά το άνοιγμα του προγράμματος, πραγματοποιείται φόρτωση ενός αρχείου στοίχισης (alignment file) των αλληλουχιών που πρόκειται να ερευνηθούν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό. Έτσι προκύπτει ένα γράφημα με μορφή δέντρου, όπως φαίνεται στην εικόνα 31.

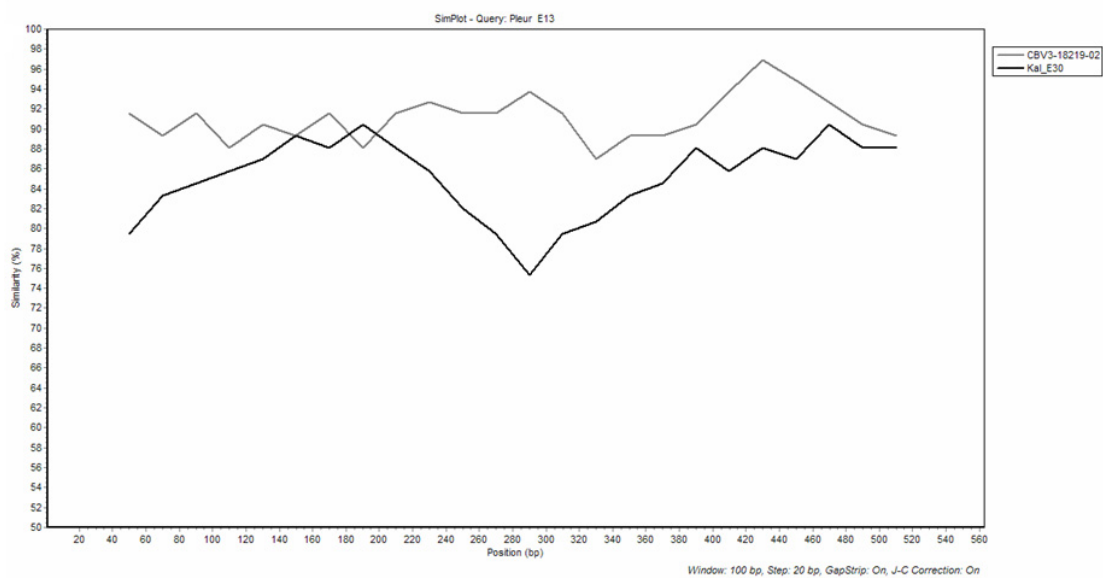


Εικόνα 31. Γράφημα μορφής φυλογενετικού δέντρου του προγράμματος Simplot

Στη βάση του παράθυρου βρίσκεται η εντολή SplotPage, μέσω της οποίας γίνεται μετάβαση στην σελίδα, όπου σχεδιάζονται τα γραφήματα ομοιότητας (Similarity Plots). Μέσω της εντολής «Commands» στο μενού αυτής της σελίδας (εικόνα 32), ορίζεται αρχικά η προς μελέτη αλληλουχία, η οποία επιπρόσθετα φέρει τον πιθανό ανασυνδυασμό [στην περίπτωση, ωστόσο, των κλινικών στελεχών που μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη τέθηκε ως query sequence η αλληλουχία του προτύπου στελέχους και ως αλληλουχία αναφοράς εκείνη της υπό μελέτη αλληλουχίας, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονη σύγκριση δύο ή περισσότερων κλινικών στελεχών ως προς το πρότυπο στέλεχος]. Στην συνέχεια προκειμένου να πραγματοποιηθεί η ανάλυση, δίνεται η εντολή «Do Simplot» με αποτέλεσμα να προκύψει ένα γράφημα όμοιο με αυτό που παρουσιάζεται στην εικόνα 33, και στην οποία αναπαρίσταται γραφικά η μεταβολή της ομοιότητας των εξεταζόμενων αλληλουχιών ως προς την αλληλουχία του προτύπου στελέχους. Μέσω αυτού του γραφήματος είναι δυνατός, τελικά, ο εντοπισμός πιθανής αντιστροφής της ομοιότητας μιας αλληλουχίας, συγκριτικά με μία άλλη με αποτέλεσμα τον καθορισμό και την γραφική απεικόνιση πιθανής ή πιθανών θέσεων ανασυνδυασμού.



Εικόνα 32. Επιλογή της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) από ένα σύνολο αλληλουχιών που πρόκειται να αναλυθούν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό με το πρόγραμμα Simplot.



Εικόνα 33. Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού ομοιότητας της αλληλουχίας μεταξύ κλινικών στελεχών

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ενίσχυση γενωμικών περιοχών των echo ιών με διαφορετικά πρωτόκολλα RT-PCR

Στη διεθνή βιβλιογραφία της βιολογίας του γένους των εντεροϊών, έχουν προταθεί διάφορα πρωτόκολλα ικανά να ενισχύουν γενωμικές περιοχές με μεγάλη ποικιλότητα. Αυτό έχει επιτευχθεί με το σχεδιασμό ειδικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (εκφυλισμένοι εκκινητές), που περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους νουκλεοτιδικές θέσεις όπου υπάρχουν μίγματα βάσεων καθώς και δεοξυινωσίνη. Στην παρούσα μελέτη (Kottaridi et al., 2004) εφαρμόσαμε ήδη δημοσιευμένα πρωτόκολλα RT-PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές UG₅₂-UC₅₃, 292-222, 012-011, EUG_{3a,3b,3c}-EUC₂ (Πίνακας 5) για την ενίσχυση και των 28 στελεχών αναφοράς των echo ιών (Πίνακας 2) καθώς και 38 κλινικών στελεχών (Πίνακας 3) των οροτύπων ECV3, ECV5, ECV6, ECV9, ECV11, ECV13, ECV14, ECV30.

Αναλυτικά τα αποτελέσματα από την εφαρμογή των παραπάνω εκκινητών στα στελέχη αναφοράς είχαν ως εξής: το ζεύγος UG₅₂-UC₅₃ ήταν αποτελεσματικό στην ενίσχυση όλων των στελεχών αναφοράς· το ζεύγος 012-011 ενίσχυσε όλα τα πρότυπα στελέχη εκτός από το ECV32· το ζεύγος 292-222 δεν ενίσχυσε το στέλεχος ECV15, παρόλο που σύμφωνα με τον Oberste (Oberste et al., 1999a) οι εκκινητές 292-222 ενισχύουν όλα τα στελέχη αναφοράς. Οι εκκινητές EUG_{3a,3b,3c}-EUC₂ δεν ενίσχυσαν τα πρότυπα στελέχη ECV3 και ECV20.

Όσον αφορά τα κλινικά στελέχη οι εκκινητές UG₅₂-UC₅₃, 012-011 και 292-222 αναγνώρισαν επιτυχώς και τα 38 στελέχη που μελετήθηκαν. Το ποσοστό της επιτυχούς ενίσχυσης ήταν χαμηλότερο χρησιμοποιώντας τους εκκινητές EUG_{3a,3b,3c}-EUC₂ οι οποίοι ήταν αποτελεσματικοί σε 35 από τα 38 από τα κλινικά δείγματα. Τα αρνητικά για το τελευταίο ζεύγος εκκινητών δείγματα αντιπροσώπευαν τους ορότυπους ECV13 και ECV30. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 6 και 7.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία (5'→3') ^α	Πολικότητα στο γένωμα	Γονίδιο-στόχος	Θέση στο γένωμα ^β	Βιβλιογραφική αναφορά
UG ₅₂	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	Sense	5'UTR	168-188	<i>Georgopoulou et al, 2000</i>
UC ₅₃	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	5'UTR	588-606	
292	MIGCIGYIGARACNGG	Sense	VP1	2554-2570	<i>Oberste et al, 2003</i>
222	CICCIGGIGGIAYRWACAT	Antisense	VP1	2912-2895	
012	ATGTAYGTICCCICGIGG	Sense	VP1	2895-2912	<i>Oberste et al, 1999</i>
011	GCICCIGAYTGITGICCRAA	Antisense	2A	3361-3242	
EUC2	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	Antisense	2C	4413-4433	<i>Caro et al, 2001</i>
EUC2a	GGTCAATACGGCATTG	Antisense	2C	4428-4448	
EUC2b	GGTCAATACGGTGTGTTGCT	Antisense	2C	4428-4448	
EUG3a	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Sense	VP1	2946-2965	
EUG3b	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Sense	VP1	2946-2965	
EUG3c	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Sense	VP1	2946-2965	
CHR1	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	Sense	2C	4284-4308	<i>Kottaridi et al, 2006</i>
CHR2	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKAG	Antisense	2C	5084-5061	
5850F	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	Sense	3D	5838-5860	<i>Lukashev et al., 2003</i>
6500R	AGRTTGCCAAAYGTYTGYCTCATTGC	Antisense	3D	6532-6507	

^αIUB ambiguity codes, ^βαρίθμηση με βάση το πρότυπο στέλεχος ECV30 Bastianni ,I: δεοξυριβόση

Πίνακας 5. Ονομασία, αλληλουχίες, πολικότητα και ακριβής θέση του γονιδιώματος, στην οποία στοχεύουν τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Εκκινητές PCR	Στελέχη αναφοράς	Κλινικά δείγματα
UG ₅₂ - UC ₅₃	28/28	38/38
292-222	27/28	38/38
012-011	27/28	38/38
EUG 3a, 3b, 3c-EUC2	26/28	34/38

Πίνακας 6. Συνολικός αριθμός στελεχών αναφοράς και κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν επιτυχώς

Εκκινητές PCR	Στελέχη αναφοράς	Κλινικά δείγματα
UG ₅₂ - UC ₅₃	-	-
292-222	ECV15	-
012-011	ECV32	-
EUG 3a, 3b, 3c-EUC2	ECV3, ECV20	ECV7, ECV 13 (2δείγματα), ECV 30

Πίνακας 7. Ορότυποι echo ιών που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

3.2. Αξιολόγηση της οροεξουδετέρωσης και των μοριακών τεχνικών διάγνωσης για την ταυτοποίηση των echo ιών

Στο δεύτερο μέρος της παρούσας διατριβής, μελετήθηκαν 41 κλινικά στελέχη echo ιών (Πίνακας 3) τα οποία αντιπροσώπευαν 7 διαφορετικούς οροτύπους. Η ταυτοποίηση των κλινικών στελεχών εντεροϊών, είχε ήδη προηγηθεί της μελέτης, αλλά επαναλήφθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των κλινικών δειγμάτων εξυπηρετώντας στόχους επιβεβαίωσης. Η ταυτοποίηση πραγματοποιήθηκε με την χρησιμοποίηση ειδικών δεξαμενών αντιορών (RIVM pools), όπως ορίζει το πρωτόκολλο της Π.Ο.Υ (World Health Organization 1996). Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν μοριακές τεχνικές για την τυποποίηση των κλινικών δειγμάτων, ξεκινώντας από την ταξινόμησή τους σε γενετικές ομάδες (clusters) μετά από ενζυμική πέψη τους με την ενδονουκλεάση περιορισμού HpaII. Σύμφωνα με την εργασία των Σιαφάκα και συν. (Siafakas et al., 2002a) η χρησιμοποίηση των εκκινητών UG52-UC53, για την ενίσχυση του τμήματος της 5' μη-μεταφραζόμενης γενωμικής περιοχής (5'-UTR) που περιλαμβάνει μεγάλο μέρος της περιοχής προσκόλλησης των ριβοσωμάτων στο γενετικό υλικό (internal ribosome entry site-IRES), ακολουθούμενη από την αναζήτηση προφίλ ενδονουκλεολιτικής πέψης με το ένζυμο HpaII της ως άνω ενισχυμένης περιοχής, μπορεί να οδηγήσει στην ταξινόμηση των οροτύπων των εντεροϊών σε πέντε ομάδες (I-V). Τέλος, ακολούθησε η μοριακή τυποποίηση των παραπάνω στελεχών η οποία προέκυψε μετά από αλληλούχιση 315 νουκλεοτιδίων του 5' άκρου του γονιδίου VP1 και 340 νουκλεοτιδίων από το 3' άκρο του ίδιου γονιδίου και φυλογενετική ανάλυση.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 8 η αρχική ταξινόμηση των μελετηθέντων κλινικών στελεχών σε γενετικές ομάδες με βάση την πέψη του τμήματος της 5'μη κωδικής περιοχής από την περιοριστική ενδονουκλεάση HpaII, τοποθέτησε τα στελέχη αυτά στις ομάδες I και III με τις συγκεκριμένες ομάδες σύμφωνα με τους Σιαφάκα και συν. να περιλαμβάνουν οροτύπους echo ιών. Με αυτόν τον τρόπο ένα σύντομο πρώτο αξιόπιστο αποτέλεσμα για την ταξινόμηση των προς μελέτη κλινικών στελεχών ήταν στη διάθεσή μας.

Σε 3 από τα 41 μελετηθέντα κλινικά δείγματα, η κλασική μέθοδος της οροεξουδετέρωσης δεν είχε δώσει αποτέλεσμα όσον αφορά τον ακριβή ορότυπο και τα δείγματα αυτά είχαν χαρακτηριστεί αρχικά ως «μη τυποποιήσιμα» στελέχη εντεροϊών. Όπως φαίνεται στον πίνακα 8, η οροτυπική ομάδα στην οποία η εφαρμογή των ειδικών δεξαμενών αντιορών ήταν μη ικανοποιητική ως προς τον προσδιορισμό του οροτύπου, ήταν κυρίως εκείνη που περιλάμβανε ECV30 κλινικά στελέχη εντεροϊών. Ο

προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του 5' και 3' άκρου του γονιδίου VP1 και η φυλογενετική ανάλυση που ακολούθησε, απέδειξε ότι και τα 3 μη τυποποιήσιμα κλινικά στελέχη ανήκαν στον ορότυπο E30. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκε ανακριβές αποτέλεσμα από την εφαρμογή των ειδικών δεξαμενών αντιορών σε 2 από τα υπόλοιπα 38 υπό μελέτη κλινικά δείγματα. Πιο συγκεκριμένα, το λανθασμένο αποτέλεσμα αφορούσε ένα E13 και ένα E30 κλινικό στέλεχος που είχαν οροτυπηθεί αρχικά ως E30 και E6 αντίστοιχα.

Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης, συγκρίθηκαν και υπολογίστηκε η μέση εκατοστιαία ομοιότητα μεταξύ των κλινικών στελεχών σε δύο διαφορετικά τμήματα της VP1 περιοχής (πίνακας 9) και η μέση εκατοστιαία ομοιότητα των κλινικών στελεχών με τους ομόλογους ορότυπους των πρότυπων echo ιών (πίνακας 8). Το ποσοστό ομοιότητας μεταξύ κλινικών και ομόλογων πρότυπων στελεχών στο 5' άκρο του γονιδίου VP1 κυμάνθηκε από 75,5% έως 83,5%, ενώ το ίδιο ποσοστό για το 3' άκρο του γονιδίου VP1 κυμάνθηκε από 78% έως 87,5% (πίνακας 8). Σύμφωνα με την εργασία των Oberste και συν. (Oberste et al., 1999b) ομοιότητα αλληλουχίας προερχόμενη από το γονίδιο VP1 που ξεπερνά το 75% με πρότυπο στέλεχος αναφοράς καταχωρημένο στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank), υποδηλώνει ότι το υπό μελέτη στέλεχος ανήκει στον ομόλογο ορότυπο, αρκεί ο επόμενος κοντινός σε επίπεδο ομοιότητας αλληλουχίας ορότυπος να έχει ποσοστό ομοιότητας μικρότερο από 70%. Τα αποτελέσματα μας συμφωνούν με τα παραπάνω κριτήρια ομολογίας και υποδεικνύουν ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ οροτύπου και γονοτύπου, με το 3' γενωμικό τμήμα να παρουσιάζει, μεγαλύτερο ποσοστό νουκλεοτιδικής ομολογίας.

Η φυλογενετική ανάλυση που ακολούθησε βασίστηκε στις αλληλουχίες του γονιδίου VP1 και έδειξε ότι αλληλουχίες του ίδιου οροτύπου πάντα ομαδοποιούνται στενά τόσο μεταξύ τους όσο και με τα πρότυπα στελέχη αναφοράς με υψηλές τιμές bootstrap (εικόνες 34, 35), παρέχοντας έτσι μια εναλλακτική μέθοδο για τη μοριακή τυποποίηση των echo ιών (Kotaridi et al., 2005).

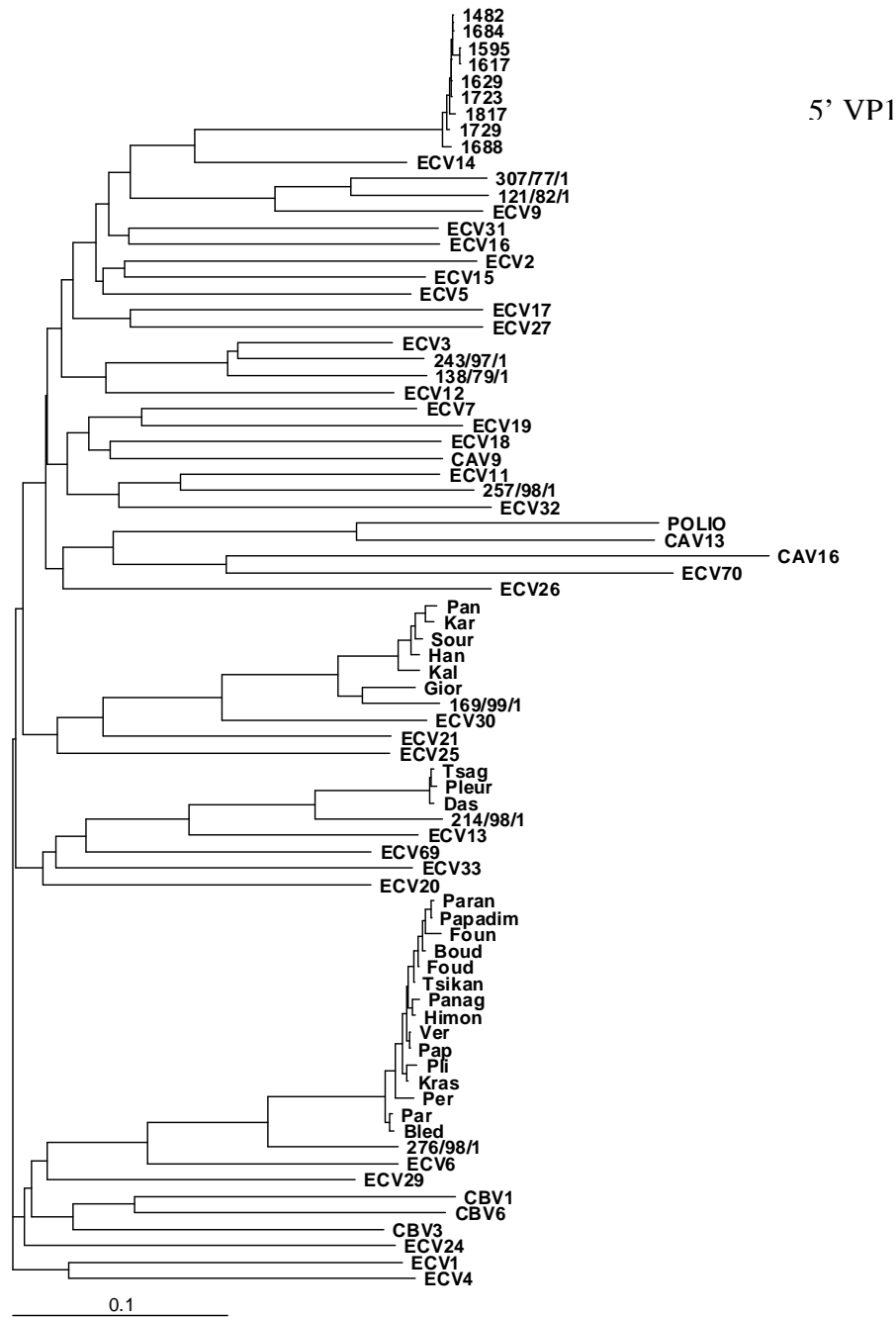
Οροτυπικές ομάδες κλινικών στελεχών	Επιτυχή αποτελέσματα με τη χρήση αντιορών RIVM	Αποτελέσματα μερικής πέψης στην 5' UTR με το ένζυμο HpaII Cluster	% Ποσοστιαία ομολογία με τα αντίστοιχα πρότυπα	
			5'VP1	3'VP1
ECV 6	16/16	I (16/16)	75,5	77,8
ECV 30	3/7	I (7/7)	81	83,1
ECV 13	3/4	I (4/4)	78,3	79,6
ECV 14	9/9	III (9/9)	78,1	81
ECV 11	1/1	III (1/1)	76	80
ECV 9	2/2	I (2/2)	83,5	87,5
ECV 3	2/2	III (2/2)	81	81,5

Πίνακας 8. Συγκριτικά αποτελέσματα ταυτοποίησης κλινικών Echo ιών

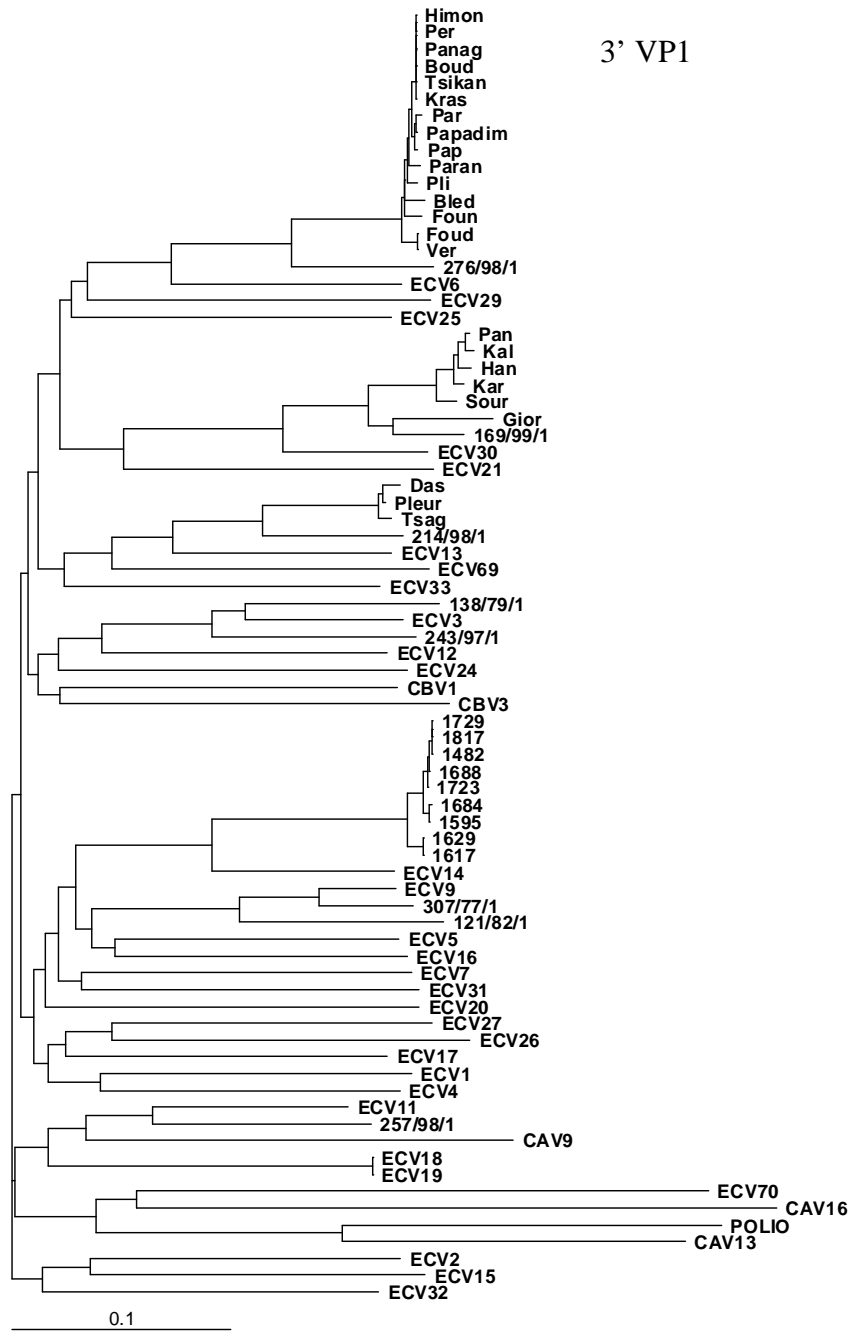
Γενομική περιοχή	Ορότυπος	ECV6	ECV13	ECV30	ECV14	ECV3	ECV9	ECV11
5' VP1	ECV6	98,9						
	ECV13	64,1	99,5					
	ECV30	40,2	36,6	94,6				
	ECV14	38,8	35,1	58,45	99,5			
	ECV3	59,9	60,48	34,8	38,6	80		
	ECV9	57,7	41,56	52,5	63,1	44,09	87,2	
	ECV11	64,1	63,3	62,2	68	68,5	66,5	*
3' VP1	ECV6	98,5						
	ECV13	62,2	98,5					
	ECV30	37,9	35,1	93,2				
	ECV14	35,6	57,3	55,2	97,2			
	ECV3	57,3	57,3	33,1	35,4	80		
	ECV9	55,2	40,8	51,3	61,2	42,1	82	
	ECV11	56,5	55,1	58,2	51	61	66	*

* Η μελέτη περιλάμβανε ένα κλινικό στέλεχος E11

Πίνακας 9. Μέση εκατοστιαία ομολογία μεταξύ των κλινικών στελεχών Echo ιών σε δύο διαφορετικά τμήματα της VP1 περιοχής



Εικόνα 34. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο τμήμα του γονιδίου VP1 nt. 2554-2895, (5' VP1).



Εικόνα 35. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο τμήμα του γονιδίου VP1nt. 2985-3325, (3' VP1).

3. 3. Μοριακή φυλογένεια των γονιδίων VP1, 2A και 2B κλινικών στελεχών echo ιών: επιδημιολογική συσχέτιση και παρατηρήσεις επί της γενετικής ποικιλομορφίας

Στο τρίτο μέρος της παρούσας διατριβής (Kottaridi et al., 2006), αλληλουχήθηκαν και μελετήθηκαν φυλογενετικά οι γενωμικές περιοχές VP1, 2A και 2B προερχόμενες από 37 κλινικά στελέχη echo ιών τα οποία αντιπροσώπευαν τέσσερις διαφορετικούς οροτύπους και απομονώθηκαν ως επί το πλείστον από επιδημίες άσηπτης μηνιγγίτιδας (πίνακας 3). Οι αλληλουχίες που προέκυψαν μετά την ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης συγκρίθηκαν και υπολογίστηκε το ποσοστό της διαφοράς σε επίπεδο νουκλεοτιδίων. Στην κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων συμπεριλήφθηκαν και οι ομόλογες αλληλουχίες όλων των οροτύπων των echo ιών καθώς και αντιπροσώπων των υπόλοιπων ειδών HEV A, C και D των εντεροϊών.

Στο τμήμα του γονιδίου VP1 (nt. 2554-2895, 5'VP1) που ενισχύθηκε και αλληλουχήθηκε το ποσοστό της νουκλεοτιδικής διαφοράς μεταξύ των οροτυπικών ομάδων κυμάνθηκε μεταξύ 36,35% έως 64,9% (πίνακας 10) ενώ το ίδιο ποσοστό εντός της κάθε οροτυπικής ομάδας είχε εύρος 0,42-5,7% (πίνακας 11). Για τα στελέχη των ομάδων ECV6, ECV13 και ECV30 που κυκλοφορούσαν ταυτόχρονα κατά τη διάρκεια επιδημιών άσηπτης μηνιγγίτιδας το έτος 2001 τα ποσοστά της ενδο-οροτυπικής ομοιότητας που καταγράφηκαν ήταν μικρότερα (αριθμοί εντός παρενθέσεως-πίνακας 11). Ακολούθησε η στοίχιση των αλληλουχιών του τμήματος του γονιδίου VP1 των κλινικών στελεχών με ομόλογες αλληλουχίες άλλων στελεχών εντεροϊών όπως αναφέρθηκε παραπάνω και η κατασκευή φυλογενετικού δένδρου (εικόνα 34). Όλα τα στελέχη με ομόλογο ορότυπο ήταν μονοφυλετικά και ομαδοποιήθηκαν στενά με τα πρότυπα στελέχη δημιουργώντας στο φυλογενετικό δένδρο τέσσερις ευδιάκριτους κλάδους όπου καθένας από αυτούς αντιστοιχούσε σε μια οροτυπική ομάδα.

Στη 2A γενωμική περιοχή η ενδο-οροτυπική νουκλεοτιδική ποικιλομορφία κυμάνθηκε μεταξύ 0-10,35% (πίνακας 11) ενώ η μεταξύ των οροτυπικών ομάδων ποικιλομορφία υπολογίστηκε από 20,87-22,26% (πίνακας 10). Η συσχέτιση μεταξύ φυλογενετικής ομαδοποίησης και οροτύπου που παρατηρήθηκε στο γονίδιο VP1 φαίνεται να καταργείται στο γειτονικό 2A γονίδιο έχοντας ως αποτέλεσμα ένα διαφορετικό προφίλ φυλογενετικού δένδρου (εικόνα 36). Επιπλέον, αυτό που πρέπει να σημειωθεί κατά την παρατήρηση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο 2A είναι ότι αν και τα επιδημικά στελέχη παραμένουν ομαδοποιημένα, το στέλεχος ECV6 Paraz, δεν είναι κοντά φυλογενετικά με τα υπόλοιπα ECV6 κλινικά στελέχη. Επίσης το κλινικό

στέλεχος ECV30 Gior φαίνεται να ξεκινά ανεξάρτητη γενετική γραμμή και να απομακρύνεται από τα υπόλοιπα ECV30 επιδημικά κλινικά στελέχη. Τα μη-επιδημικά ECV6 και ECV13 στελέχη δε, διατηρούν τη μονοφυλετική ομαδοποίηση με τα υπόλοιπα στελέχη του ίδιου οροτύπου. Η φυλογενετική συσχέτιση με τα πρότυπα στελέχη στο γονίδιο 2A καταργείται εκτός από την ομάδα των ECV30.

Οι αλληλουχίες του γονιδίου 2B των επιδημικών οροτυπικών ομάδων διέφεραν κατά 0,29-12,02% εντός του οροτύπου (Πίνακας 11) και κατά 19,06-21,28% μεταξύ των οροτυπικών ομάδων (Πίνακας 10). Με εξαίρεση το κλινικό στέλεχος E30 Gior το οποίο συνεχίζει να μην ομαδοποιείται με τα υπόλοιπα μέλη της ομάδας E30 στο γονίδιο 2B, όλα τα επιδημικά στελέχη του ίδιου οροτύπου είναι μονοφυλετικά και δεν βρίσκονται κοντά εξελικτικά με τα ομόλογα πρότυπα στελέχη. Τα μη επιδημικά κλινικά δείγματα που συμπεριλήφθησαν στη μελέτη, ακολουθούν ανεξάρτητη εξελικτική πορεία καθώς φαίνεται στην απεικόνιση του φυλογενετικού δένδρου για το γονίδιο 2B (εικόνα 37).

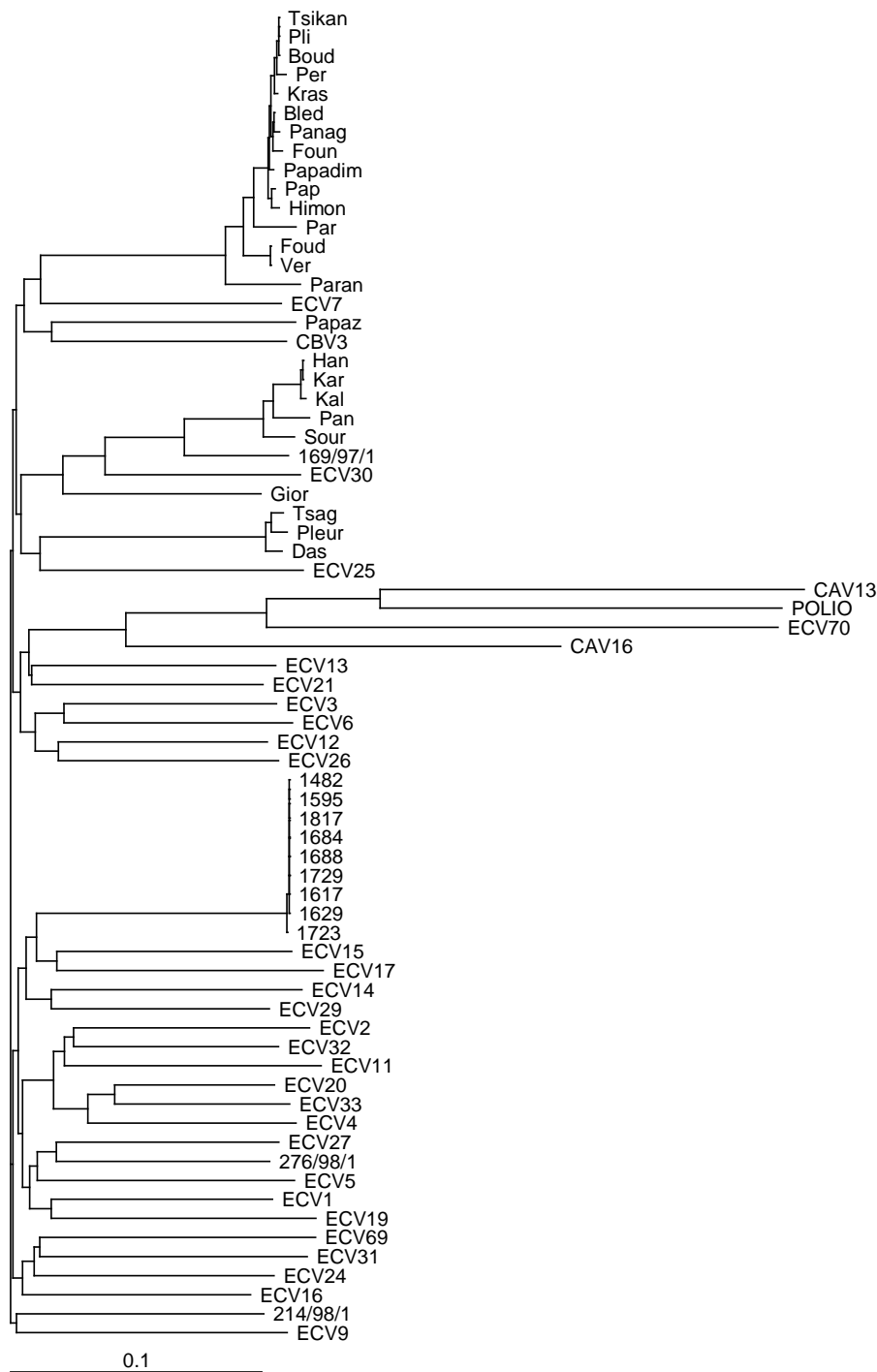
Σε επίπεδο αλληλουχίας αμινοξέων στη VP1 καψιδική περιοχή, τα ECV6 επιδημικά κλινικά στελέχη διέφεραν κατά 6 αμινοξικά κατάλοιπα, ενώ τα στελέχη των οροτυπικών ομάδων ECV30, ECV14 και ECV13 διέφεραν μεταξύ τους κατά 3, 2 και 1 αμινοξύ αντίστοιχα. Στην αμινοξική αλληλουχία της ιικής πρωτεΐνης 2A μεγάλη ποικιλομορφία καταγράφηκε μεταξύ των ECV6 στελεχών με το στέλεχος Paraz να συγκεντρώνει το μεγαλύτερο αριθμό διαφορετικών αμινοξέων σε σχέση με τα υπόλοιπα επιδημικά του ίδιου οροτύπου. Μεταξύ των ECV30 επιδημικών για το στέλεχος Gior σημειώθηκαν οι περισσότερες αμινοξικές διαφορές, ενώ για τα στελέχη των οροτύπων ECV13 και ECV14 η πρωτεΐνη 2A ήταν σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη. Κατά την ανάλυση της 2B πρωτεϊνικής αλληλουχίας σε όλες τις οροτυπικές ομάδες παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό ομοιότητας (Εικόνα 38).

	Οροτυπική ομάδα	ECV6	ECV13	ECV30
VP1	ECV13	36,35		
	ECV30	60,09	62,94	
	ECV14	61,53	64,9	41,65
2A	Οροτυπική ομάδα	ECV6	ECV13	ECV30
	ECV13	21,17		
	ECV30	20,87	22,26	
	ECV14	21,51	22,22	21,92
2B	Οροτυπική ομάδα	ECV6	ECV13	ECV30
	ECV13	20,7		
	ECV30	21,28	20,0	
	ECV14	19,06	19,5	20,43

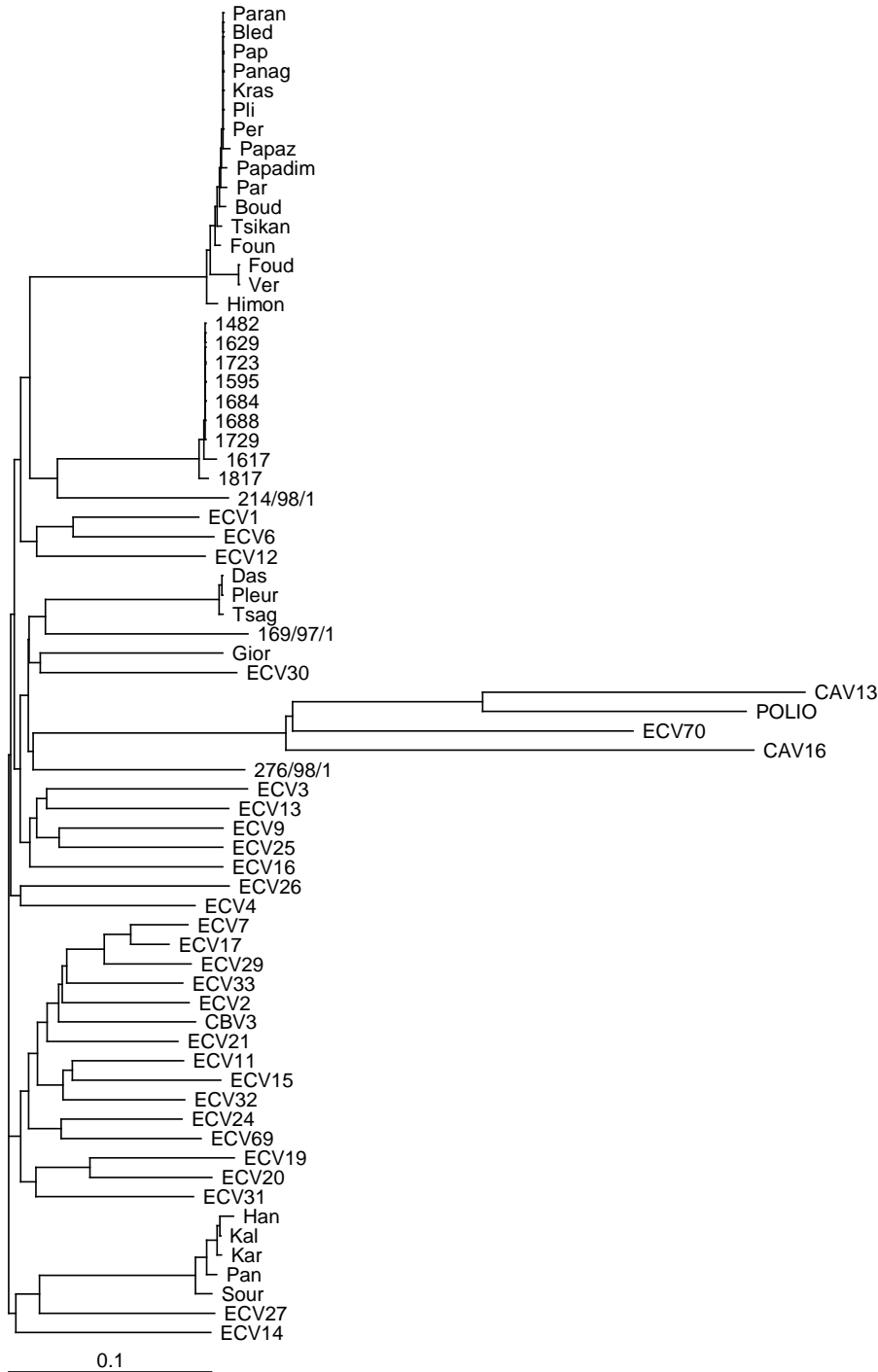
Πίνακας 10. Μέση εκατοστιαία απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών οροτυπικών ομάδων των κλινικών στελεχών Echo ιών σε τρεις διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματός τους

Οροτυπική ομάδα	Αριθμός δειγμάτων ανά οροτυπική ομάδα	Μέση εκατοστιαία απόκλιση εντός των οροτυπικών ομάδων		
		5' VP1 (295 bp)	2A (441 bp)	2B (297 bp)
E6	17	2,06 (0,60)*	5,62 (3,8)*	3,33 (0,71)*
E13	4	5,7 (0,45)*	10,35 (1,36)*	9,76 (0,22)*
E30	7	4,84 (4,07)*	9,1 (8,61)*	12,02 (7,99)*
E14	9	0,42	0,0	0,29

Πίνακας 11. Μέση εκατοστιαία απόκλιση εντός των διαφορετικών οροτυπικών ομάδων των κλινικών στελεχών Echo ιών σε τρεις διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματός τους. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δείχνουν τα ποσοστά της ενδο-οροτυπικής ποικιλότητας στα επιδημικά στελέχη.



Εικόνα 36. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στελεχών στο γονίδιο 2A. Τα επιδημικά στελέχη είναι ευδιάκριτα ομαδοποιημένα με εξαίρεση το στέλεχος *Papaz*.



Εικόνα 37. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στελεχών στο γονίδιο 2B.

VP1 aa 618-716

►B-C loop◄

Ver	TRHVKNYHVRSESSVENFLRSACVYVIVEYKTRD-DTPDKMYDSWVINTRQVAQLRRKLEFFTYVRFDVENVTFVITSVQDDSTRQNTDTPALHTQIMYIP
FounV.....
PliK.....A.....R.....V.....
KrasK.....V.....
PapazK.....V.....
FoudV.....
TsikanV.....
PapadimV.....
BledV.....
ParV.....
PerK.....V.....
PapV.....
HimonT.....
PanagS.....
ParanV.....
BoudV.....
Sour	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.TN.E.T...M...M...L...S.RT..TYAS.S.P...V.V.
Pan	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.TN.E.T...M...M...L...S.RT..TYAS.S.P...V.V.
Han	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.TN.E.T...M...M...L...S.RT..TYAS.S.P...V.V.
Kal	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.TN.E.T...M...M...L...S.RT..TYAS.S.P...V.V.
Gior	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.TN.E.T...M...M...L.I...S.RT..KYAS.S.P...V.V.
Kar	...V...T...I...MG.A...AQ.A.EKVNDELDR.AN.E.T...M...M...L...S.RT..TYAS.S.P...V.CV.
Das	.C.L.R.K...I...C...YTT.D.HG-.AA.AK.A..T.T..K...M...L...L...A.VT..N.SQ.A.V...V...V.
Tsag	.C.L.R.K...I...C...YTT.D.HG-.AA.AK.A..T.T..K...M...L...L...A.VT..N.SQ.A.V...V...V.
Pleur	.C.L.R.K...I...C...YTT.D.HG-.AA.AK.A..T.T..K...M...L...L...A.VT..N.SQ.A.V...V...V.
1688	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...V.
1482	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...V.
1629	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...V.
1817	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...L.
1595	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...I.
1617	...S...TI...C...H.AT..AKGSAGDTDR...D..IKELV...C.M...L...M...I.EQG.ALTQ.M.V...I.

2A aa 858-1007

Ver	GAFGQQSGAVYVGNRYVVRNHLATHNDWQNCWEDYNRDLLVSTTTAHGCDTIARCHCTAGVYFCSSKNKHYPVSPFEGPGLVEVQSEYYPKRYQSHVLLAAGFSEPDCGILRCEHGVIGVVMTGGEGVGFADIRDLWLEDDAMEQ
FounI.....N.....
PliA.....I.....
KrasA.....I.....
Papaz	.V.....A.....Q.....A.R.....IV.....R.....I.....
FoudI.....
TsikanA.....I.....
PapadimI.....
BledI.....
ParG.....I.....LP.....W.....
PerA.....I.....L.....
PapI.....
HimonI.....E.....
PanagI.....G.....
ParanK.....GRI...P.RT.....I.....
BoudA.....I.....
Sour	.V.....A.....L.....V.....Q.ST...A.....L.....V.....
Pan	.V.....A.....L.....V.....Q.ST...A.....Q...RL.....V.....
Han	.V.....A.....L.....V.....I.....Q.ST...A.....L.....V.....
Kal	.I.....A.....L.....V.....I.....Q.ST...A.....L.....V.....
Gior	.V.....A.....L.....V.....Q.T...A.R.....R...T.....L.....V.....
Kar	.V.....A.....L.....V.....I.....Q.ST...A.....L.....V.....
Das	.V.....A.....Q.....Y.A.R.....T.....I.....V.....
Tsag	.V.....L.....Y.A.R.....T.....I.....V.....
Pleur	.V.....L.....Y.A.R.....T.....I.....V.....
1688	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1482	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1629	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1817	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1595	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1617	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1723	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1684	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....
1729	...H.A..A.....Q.....Q..T...A.....L.....V.....

```

Ver      GVKDYVEQLGNAFGSGFTNQICEQVNLKESLIQQDSVLEKSLKALVKIIALVIVVRNHEDLITVTATLALIGCTSSPWRWLKQKVSQYFGVPMARQ
Foun     .....I.....
Pli      .....I.....
Kras     .....I.....
Papaz    .....P.....I.....
Foud     .....I.....
Tsikan   .....I.....
Papadim  .....I.....
Bled     .....I.....
Par      .....I.....
Per      .....I.....
Pap      .....I.....
Himon    .....I.....
Panag    .....I.....
Paran    .....I.....
Boud     .....I.....

Sour     .....V.....I.....D.....Y.I.....
Pan      .....V.....I.....I.....D.....Y.IH.....
Han      .....T.....V.....I.....I.....D.....Y.IH.....
Kal      .....V.....I.....I.....D.....Y.IH.....
Glor     .....V.....I.....D.....T.....Y.I.....
Kar      .....V.....I.....I.....D.....Y.IH.....

Das      ..R.....V.....I.....D.....Y.I.....
Tsag     ..R.....V.....I.....D.....Y.I.....
Pleur    ..R.....V.....I.....D.....Y.I.....

1688     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1482     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1629     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1817     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1595     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1617     .....VV.....I.....V.....D.....Y.I.....
1723     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1684     .....V.....I.....D.....Y.I.....
1729     .....V.....I.....D.....Y.I.....
    
```

Εικόνα 38. Στοιχισή πρωτεϊνικών ακολουθιών (alignment) για 98 κατάλοιπα της (5') VP1 καψιδικής πρωτεΐνης και για ολόκληρες τις 2A και 2B πρωτεΐνες, των επιδημικών κλινικών στελεχών της παρούσας μελέτης. Οι τελείες υποδηλώνουν ομοιότητα με το ECV6 κλινικό στέλεχος Ver.

3.4. Αναζήτηση εξελικτικών σχέσεων και πιθανών ανασυνδυασμών στο 3' άκρο του γονιδιώματος των echo ιών.

Επόμενος σταθμός στη μελέτη του γονιδιώματος των Echo ιών κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής, ήταν η αλληλούχιση του γονιδίου 2C και 563 nt του 5' άκρου του γονιδίου 3D. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 4 στελέχη προερχόμενα από την επιδημία της άσηπτης μηνιγγίτιδας καθώς και 2 στελέχη που συλλέχθηκαν ανεξάρτητα. Η μοριακή τυποποίηση στο γονίδιο VP1 των στελεχών αυτών που προηγήθηκε είχε δείξει ομολογία με τα πρότυπα στελέχη ECV6, ECV13 και ECV30. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να συγκρίνουμε και να αναλύσουμε φυλογενετικά τα παραπάνω στελέχη echo ιών με άλλα στελέχη εντεροϊών της ομάδας B με τα οποία βρέθηκε να έχουν υψηλό Blast hit και είχαν απομονωθεί σε απομακρυσμένες από την Ελλάδα περιοχές από σποραδικές περιπτώσεις και να επισημάνουμε το γεγονός ότι τα μη-δομικά γονίδια των εντεροϊών είναι πανταχού παρόντα και μπορούν να συνδυάζονται ελεύθερα στο 3' άκρο των εντεροϊών ώστε συχνά ιοί με διαφορετική γεωγραφική προέλευση και χρονολογία απομόνωσης να δείχνουν ότι ακολουθούν κοινή εξελικτική πορεία. (Kottaridi et al., 2007)

Η μέση εκατοστιαία νουκλεοτιδική διαφορά των υπό μελέτη στελεχών με αντιπροσώπους πρότυπων στελεχών των υπόλοιπων ομάδων εντεροϊών, υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού MEGA 3.1. Όπως φαίνεται στον πίνακα 12, το παραπάνω ποσοστό μεταξύ των στελεχών και της ομάδας HEV-B κυμαίνεται μεταξύ 18,4-19,2% στο γονίδιο 2C και μειώνεται σε 16,9-17,5% στο γονίδιο 3D. Τα πρότυπα στελέχη με τη μεγαλύτερη ομοιότητα ήταν τα E30_Bastianni, E1_Farouk και E25_JV4 για το γονίδιο 2C και E30_Bastianni, E1_Farouk για το γονίδιο 3D. Όλα τα στελέχη ήταν τουλάχιστον 34,98% στο 2C και 27,4% στο 3D διαφορετικά από αντιπροσώπους των υπόλοιπων ειδών HEV (A, C, D και Polio) (Πίνακας 12).

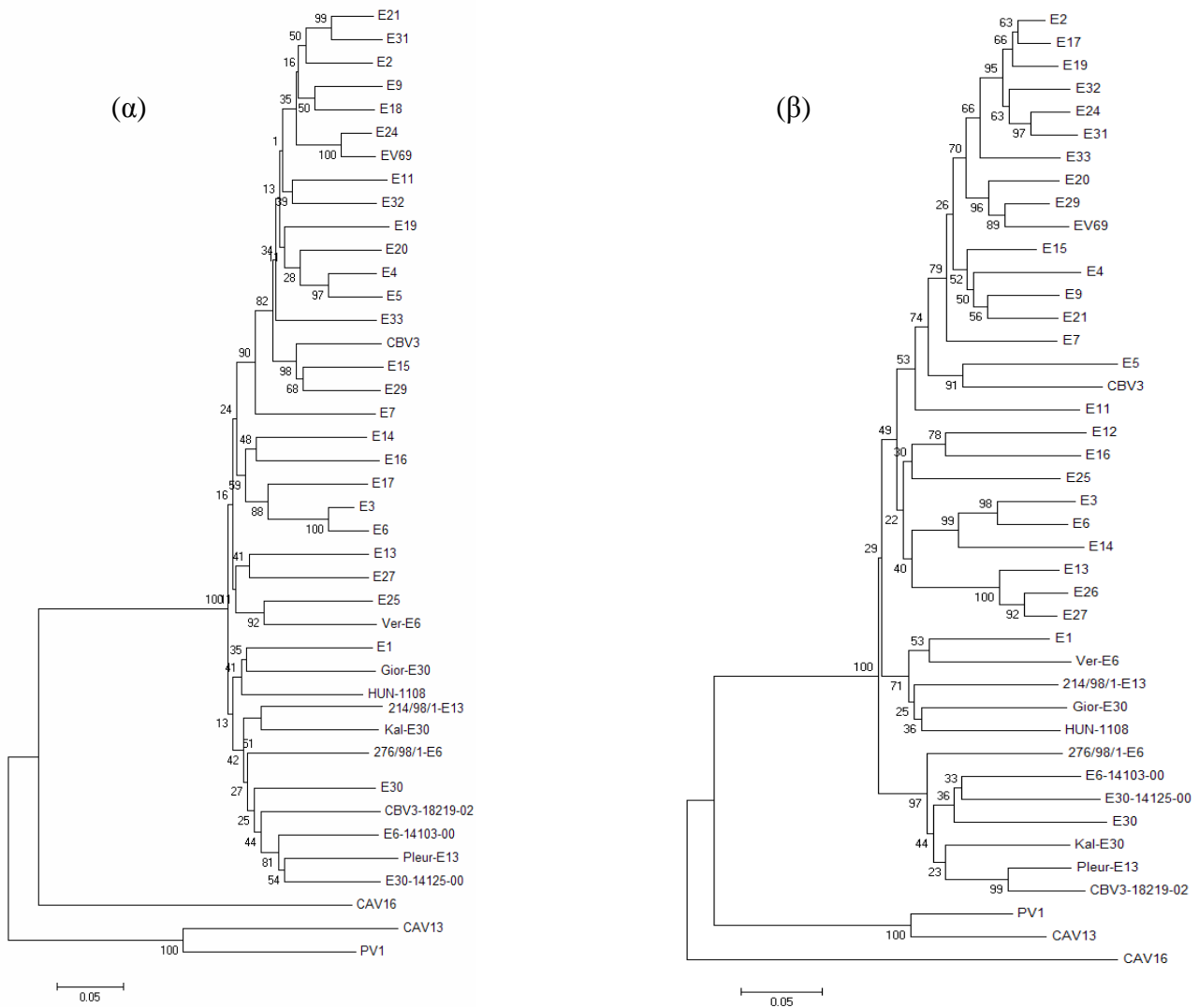
Για την παρατήρηση φυλογενετικών συσχετίσεων κατασκευάστηκαν φυλογενετικά δένδρα (εικόνα 39α και 39β) όπου φαίνεται ότι και σε αυτές τις μη-δομικές γενωμικές περιοχές των echo ιών η συσχέτιση με τον ορότυπο έχει χαθεί και επιπλέον στελέχη του ίδιου ορότυπου εξελίσσονται ανεξάρτητα. Όλα τα κλινικά στελέχη χωρίζονται σε δύο ομάδες με τα πρότυπα E30_Bastianni και E1_Farouk αντίστοιχα να αποτελούν μέλη της κάθε ομάδας, εύρημα το οποίο βρίσκεται σε συμφωνία με τη διεθνή βιβλιογραφία. Εξαίρεση αποτελεί το στέλεχος Ver_E6 το οποίο στο γονίδιο 2C σχετίζεται με το πρότυπο στέλεχος E25_JV4 σε ξεχωριστή ομάδα από αυτές που σχηματίζουν τα υπόλοιπα κλινικά.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η διαφορετική εξέλιξη στελεχών του ίδιου οροτύπου που απομονώθηκαν την ίδια χρονική περίοδο στην ίδια γεωγραφική περιοχή κατά τη διάρκεια της επιδημίας της άσηπτης μηνιγγίτιδας. Συγκεκριμένα, τα στελέχη Gior_E30 και Kal_E30 του οροτύπου ECV30 σχετίζονται φυλογενετικά με ξεχωριστές ομάδες στελεχών ακολουθώντας διαφορετικές γενετικές γραμμές. Το Gior_E30 ομαδοποιείται τόσο στο γονίδιο 2C όσο και στο 3D με το στέλεχος της βιβλιογραφίας HUN-1108 το οποίο απομονώθηκε στην Ουγγαρία κατά τη διάρκεια επιδημίας από Echo ιό οροτύπου 11 (Chevaliez et al., 2004) ενώ αντίθετα, το Kal_E30 ομαδοποιείται και στα δύο γονίδια με στελέχη που απομονώθηκαν στην πρώην Σοβιετική Ένωση μεταξύ των ετών 2000-2002 (Lukashev et al., 2005b) αποδεικνύοντας έτσι ότι η τοπική ή χρονολογική συσχέτιση των στελεχών δεν επηρεάζει πάντοτε την εξέλιξη τους. Για τα στελέχη 214/98/1_E13 και Pleur_E13 η μονοφυλετική ομαδοποίηση που παρατηρείται στο γονίδιο 2C καταργείται στο 3D, ενώ τα 276/98/1_E6 και Ver_E6 δεν είναι μονοφυλετικά σε κανένα από τα δύο γονίδια.

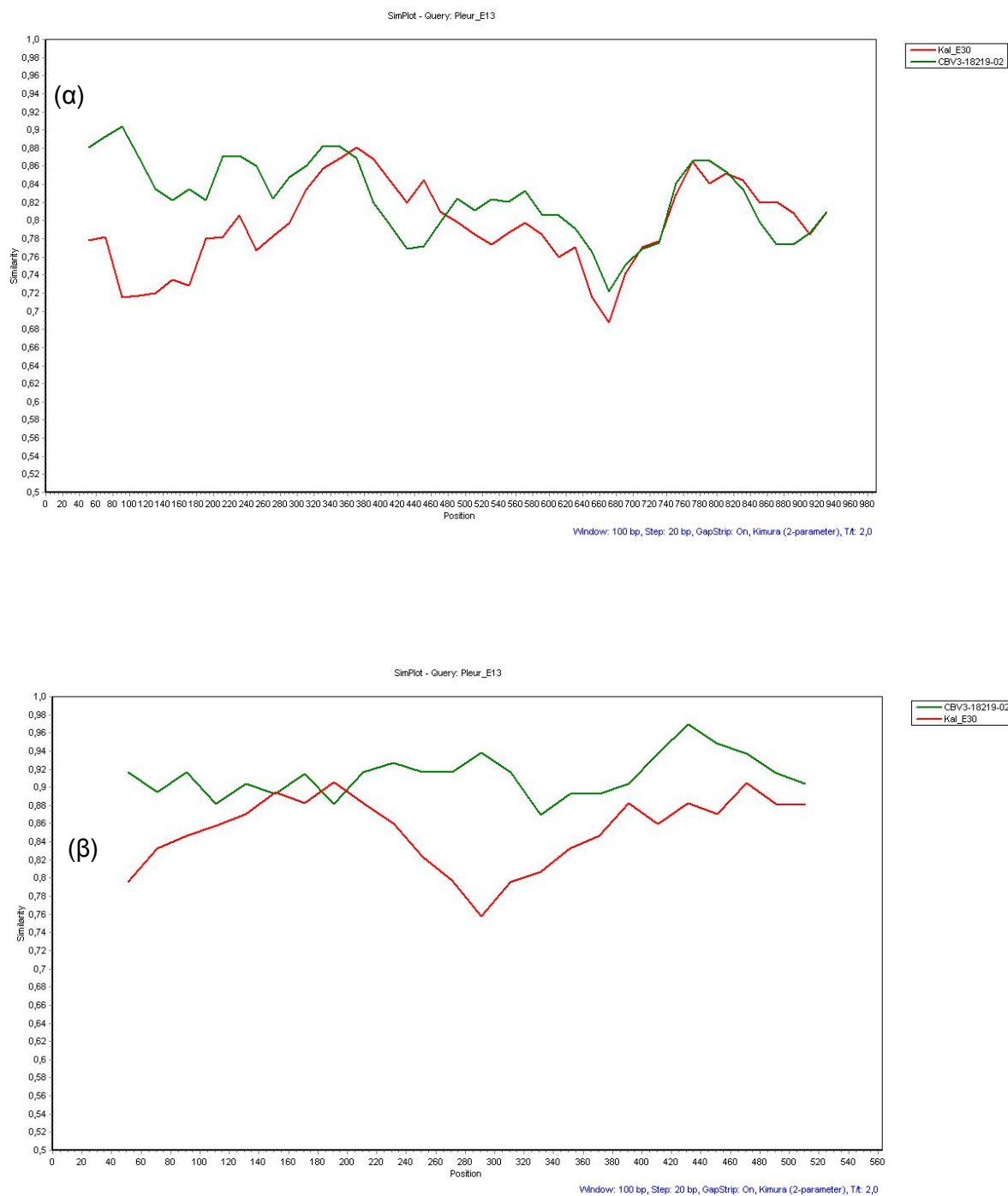
Στο γονίδιο 3D το στέλεχος Pleur_E13 φαίνεται να σχετίζεται στενά φυλογενετικά με το CBV-18219-02 της βιβλιογραφίας (Lukashev et al., 2005b) ώστε να θεωρείται πιθανός ένας ανασυνδυασμός μεταξύ των παραπάνω στελεχών. Προκειμένου να ελεγχθεί αυτή η πιθανότητα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των αλληλουχιών των γονιδίων 2C και 3D των παραπάνω στελεχών καθώς και του Kal_E30, με τη βοήθεια του λογισμικού SimPlot (εικόνα 40). Ως query sequence τέθηκε εκείνη του στελέχους Pleur_E13 και ως αλληλουχίες αναφοράς εκείνες των CBV-18219-02 και Kal_E30. Στο γράφημα που προέκυψε για το γονίδιο 2C (εικόνα 40α) μετά την εφαρμογή της εντολής «Do Simplot» δεν εντοπίστηκε κάποια αξιοσημείωτη μεταβολή στην ομοιότητα των εξεταζόμενων αλληλουχιών. Αντίθετα, στο γράφημα που προέκυψε για το γονίδιο 3D όπως αυτό αναπαρίσταται στην εικόνα 40β φαίνεται αύξηση της ομοιότητας της αλληλουχίας του στελέχους Pleur_E13 με αυτήν του CBV-18219-02 έως 97% γεγονός που υποδηλώνει μέσω της συγκεκριμένης γραφικής απεικόνισης πιθανό ανασυνδυασμό.

Κλινικά στελέχη	HEV-A	HEV-B	HEV-C	HEV-D	Polio
2C					
Ver_E6	35.12	18.7	40.02	35.8	37.79
Gior_E30	35.15	18.82	40.12	35.75	37.68
Kal_E30	35.16	19.2	40.07	34.99	37.57
Pleur_E13	35.2	18.91	40.15	35.6	37.62
214/98/1_E13	34.98	19.1	40.04	35.55	38.01
276/98/1_E6	35.09	18.4	40.08	35.48	36.98
3D					
Ver_E6	33.8	17.5	28.46	33.9	27.4
Gior_E30	32.5	17.3	29.7	33.5	28.6
Kal_E30	31.6	17.01	29.59	32.98	28.9
Pleur_E13	32.1	17.2	30.78	32.77	29.7
214/98/1_E13	31.9	16.9	30.4	33.46	29.2
276/98/1_E6	32.9	17.23	30.8	33.1	29.4

Πίνακας 12. Μέση εκατοστιαία νουκλεοτιδική διαφορά μεταξύ των κλινικών στελεχών και αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών στα γονίδια 2C



Εικόνα 39. Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων ολόκληρης της γενωμικής περιοχή 2C (α) και 563 nt του 5' άκρου του γονιδίου 3D.



Εικόνα 40. Γραφική απεικόνιση της ομολογίας 2 επιδημικών στελεχών προερχόμενων από την Ελλάδα (Pleur_E13 και Kal_E30) συγκριτικά με το στέλεχος CBV3-18219-02 το οποίο προέρχεται από τη Μολδαβία (Lukashev et al., 2005) σε ολόκληρο το γονίδιο 2C (α) και στα πρώτα 563 nt του γονιδίου 3D (β). Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα SimPlot 3.2 beta προκειμένου να αποδοθούν σχηματικά πιθανές θέσεις ανασυνδυασμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ταξινόμηση των ιών σε οικογένειες έχει κυρίως βασιστεί στη μορφολογία του ιοσώματος, τη φύση του γενωμικού υλικού, τη στρατηγική αντιγραφής του ιού, καθώς και άλλες βιολογικές, φυσικοχημικές και αντιγονικές ιδιότητες είναι επίσης σημαντικές στην ταυτοποίηση και ομαδοποίηση των ιών μέσα στις διαφορετικές οικογένειες. Για τον ερευνητή επιστήμονα η ταξινόμηση των ιών είναι σημαντική καθώς παρέχει ένα αρχικό πλαίσιο για την καλύτερη κατανόηση των βιολογικών ιδιοτήτων του ιού. Για τον κλινικό επιστήμονα η πληροφορία για την ταυτοποίηση ενός ιού αποτελεί αξιόπιστη βάση για τη σωστή διάγνωση μεμονωμένων ή επιδημιολογικά συσχετιζόμενων περιπτώσεων με ουσιαστικό στόχο να δίδεται η κατάλληλη θεραπεία ή να προλαμβάνεται η επέκταση μιας νόσου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή της παρούσας διατριβής, οι ανθρώπινοι εντεροϊοί αρχικά ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τις αντιγονικές τους ιδιότητες σε 64 οροτύπους, ενώ ένα νέο σχήμα ταξινόμησης που βασίζεται στις μοριακές και βιολογικές τους ιδιότητες προτείνει την ταξινόμησή τους σε 5 είδη. Η τυποποίηση των εντεροϊών απαιτείται για τους εξής λόγους: α) για τη διάκριση των πόλιο από τους μη πόλιο-εντεροϊούς στο πλαίσιο της εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας-β) για να προσδιοριστεί η σχέση μεταξύ του τύπου του εντεροϊού και των διαφόρων ασθενειών και των εκδηλώσεών τους προκειμένου να επιτυγχάνεται σωστός σχεδιασμός θεραπευτικών ή προληπτικών μέτρων-γ) για να ταυτοποιηθούν νέοι τύποι εντεροϊών ή variants αυτών-δ) για να μελετηθούν οι εντεροϊοί στα νεογνά και τους ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς όπου λοιμώξεις με εντεροϊούς μπορούν να προκαλέσουν μόνιμες μολύνσεις του κεντρικού νευρικού συστήματος- και ε) για να διερευνηθεί η μοριακή επιδημιολογία και μοριακή φυλογένεια των εντεροϊών που ανιχνεύονται σε κλινικά ή περιβαλλοντικά δείγματα.

Η παραδοσιακή τεχνική για την ταυτοποίηση των εντεροϊών που χρησιμοποιεί ειδικές δεξαμενές εξουδετερωτικών αντιορών, τείνει να εξαλειφθεί καθώς παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα όπως η πολυπλοκότητα και η απαίτηση αρκετού χρόνου για τη διεκπεραίωσή της. Αδιαμφισβήτητη είναι η δυσκολία που υπάρχει όταν προκύπτουν μη-ταυτοποιήσιμοι εντεροϊοί οι οποίοι μπορεί να αντιπροσωπεύουν μικτές μολύνσεις, συσσωματώματα εντεροϊών, νέα ή μη αναγνωρισμένα στο παρελθόν στελέχη. Επίσης με

τη χρήση αυτής της μεθόδου μπορούν να ταυτοποιηθούν 20 από τους 28 ορότυπους Echo ιών ενώ δεν είναι δυνατόν να διακριθούν οι ορότυποι των Coxsackie B ιών.

Προκειμένου να αναπτυχθεί ένα αξιόπιστο, ακριβές σύστημα μοριακής τυποποίησης ήταν απαραίτητο να ληφθεί υπόψη η δομή και λειτουργία του γενώματος των εντεροϊών καθώς και η ποικιλότητα ορισμένων περιοχών του γενώματός τους. Η σύγχρονη τεχνολογία της μοριακής βιολογίας χρησιμοποίησε ευρέως την τεχνική της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (RT-PCR) ακολουθούμενη από την ανάλυση πολυμορφισμού μήκους των προϊόντων PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) και την ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης (sequencing) για την ταχεία διάγνωση λοιμώξεων από εντεροϊούς. Το ερώτημα που αρχικά απασχόλησε τα εργαστήρια που ασχολήθηκαν με τη μοριακή ανίχνευση των εντεροϊών, επικεντρώθηκε στην αναζήτηση κατάλληλης γενωμικής περιοχής για τον εντοπισμό γενετικού υλικού εντεροϊών στο προς εξέταση δείγμα. Έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητές που στόχευαν σε υψηλά συντηρημένες περιοχές της 5' μη κωδικής περιοχής (5'UTR) ή σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της VP2 καψιδικής πρωτεΐνης (Romero, 1999; Rotbart et al., 1995; Zoll et al., 1992).

Όσον αφορά την 5'UTR οι εκκινητές UG₅₂-UC₅₃, που χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα διατριβή ήταν οι πλέον κατάλληλοι για την πιστοποίηση ύπαρξης γενετικού υλικού εντεροϊών τόσο σε στελέχη αναφοράς, όσο και σε κλινικά στελέχη. Η ενδο-οροτυπική όμως ποικιλότητα της 5'UTR είναι μεγάλη (Drebot et al., 1994; Kopecka et al., 1995) ώστε να μην είναι δυνατός ο συσχετισμός μεταξύ αυτού του τμήματος του γενετικού υλικού και του οροτύπου. Σύμφωνα με την εργασία των Σιαφάκα και συν. (Siafakas et al., 2003) η ενίσχυση του τμήματος της 5'UTR με τους παραπάνω εκκινητές που περιλαμβάνει μεγάλο μέρος της περιοχής προσκόλλησης των ριβοσωμάτων στο γενετικό υλικό (internal ribosome entry site-IRES), ακολουθούμενη από την αναζήτηση προφίλ ενδονουκλεολυτικής πέψης με το ένζυμο HpaII (RFLP ανάλυση) της ως άνω ενισχυμένης περιοχής, μπορεί σε ένα πρώτο βήμα να οδηγήσει στην ταξινόμηση των οροτύπων των εντεροϊών σε πέντε ομάδες (I-V) με τους ορότυπους των Echo ιών να απαντούν σε δύο από αυτές (Cluster I και Cluster III).

Η σύγκριση τόσο νουκλεοτιδικών όσο και αμινοξικών αλληλουχιών από το 5' άκρο της VP2 καψιδικής περιοχής, αποκάλυψε την ύπαρξη 4 μεγάλων φυλογενετικών ομάδων μέσα στο γένος των εντεροϊών (Clusters A-D) (Oberste et al., 1998b; Poÿry et al., 1996; Pulli et al., 1995; Zell et al., 1997) και η γενωμική αυτή περιοχή θεωρήθηκε καταλληλότερη σε σχέση με την 5'UTR για την ανάπτυξη μοριακής διαγνωστικής

μεθόδου συσχέτισμού του γονοτύπου με τον ορότυπο (Huttunen et al., 1996; Poÿry et al., 1996; Pulli et al., 1995). Όμως, καταγράφηκαν περιπτώσεις όπου στελέχη τα οποία ενώ ήταν γνωστό ότι ανήκαν στον ίδιο ορότυπο δεν ομαδοποιούνταν στενά κατά τη φυλογενετική ανάλυση (Arola et al., 1996 Oberste et al., 1998b), και έτσι για το τμήμα αυτό του γενετικού υλικού των εντεροϊών είναι πλέον αποδεκτή η μερική συσχέτιση του γενώματος με τον ορότυπο.

Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδίου VP1 όλων των πρότυπων στελεχών των ανθρώπινων εντεροϊών από τους Oberste και συν (Oberste et al., 1998b), καθώς και η μερική αλληλούχιση του ίδιου γονιδίου όπως περιγράφεται σε άλλες εργασίες (Oberste et al., 1999a; Caro et al., 2001; Norder et al., 2001) έδειξε ότι υπάρχει πλήρης συσχέτιση του γενώματος σε αυτήν την περιοχή με τον ορότυπο. Η VP1 καψιδική πρωτεΐνη βρίσκεται τοποθετημένη κυρίως στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος των picorna-ιών και αποτελεί τμήμα των αντιγονικών θέσεων (Mateu, 1995). Όπως έχει αποδειχθεί η BC-θηλειά η οποία συμμετέχει στο σχηματισμό της αντιγονικής θέσης 1, περιέχει ειδικές για τον ορότυπο αντιγονικές θέσεις (Minor, 1990; Norder et al., 2001) και εντοπίζεται μεταξύ των αμινοξέων 82-93 (για τον echo ιό 30-AJ295172) της VP1 καψιδικής πρωτεΐνης (295aa) (Muckelbauer et al., 1995; Norder et al., 2001). Πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών του γονιδίου VP1 μεταξύ στελεχών διαφορετικών οροτύπων, έδειξε τη μεγαλύτερη ποικιλότητα συγκεντρωμένη στην περιοχή που αντιστοιχεί στη BC-θηλειά υποδηλώνοντας ότι το τμήμα αυτό του γενώματος αποτελεί το πλέον κατάλληλο για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών (Thoelen et al., 2003).

Η διεθνής βιβλιογραφία έχει προτείνει διάφορα πρωτόκολλα RT-PCR για την ενίσχυση του γονιδίου VP1. Το εμπόδιο που ήταν απαραίτητο να ξεπεραστεί ήταν η αναμενόμενη ενδοοροτυπική γενετική ποικιλότητα μεταξύ των στελεχών που σε συνδυασμό με τον αρχικά μικρό αριθμό καταχωρημένων στη GenBank αλληλουχιών καθιστούσε δύσκολο τον κατάλληλο σχεδιασμό εκκινητικών ολιγονουκλεοτιδίων με αυξημένη ειδικότητα. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου μοριακής τυποποίησης με βάση την RT-PCR και την ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης, αναπτύχθηκε στην εργασία των Oberste et al., 2003 (Oberste et al., 2003) όπου περιγράφεται η χρήση εκφυλισμένων εκκινητών που περιέχουν δεοξυριβόνη και μίγματα βάσεων και ενισχύουν με επιτυχία το γονίδιο VP1 όλων των 64 οροτύπων των εντεροϊών.

Στο πρώτο μέρος της παρούσας διατριβής, επιλέχθηκαν τέσσερα πρωτόκολλα της βιβλιογραφίας για την ανίχνευση και μοριακή τυποποίηση των Echo ιών, προκειμένου να ελεγχθεί η αξιοπιστία και η εφαρμογή τους σε όλα τα πρότυπα και σε κλινικά στελέχη

των Echo ιών. Αρχικά εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του ζεύγους εκκινητών UG₅₂-UC₅₃ στην ενίσχυση της 5' UTR όλων των πρότυπων και 38 κλινικών στελεχών Echo ιών. Θετικό αποτέλεσμα καταγράφηκε και για τα 28 στελέχη αναφοράς καθώς και για όλα τα κλινικά στελέχη. Στη συνέχεια ελέγχθηκαν οι εκφυλισμένοι εκκινητές 012-011 που περιγράφονται στην εργασία των Oberste et al., 1999 (Oberste et al., 1999b). Οι εκκινητές αυτοί σχεδιάστηκαν με βάση συντηρημένα μοτίβα αμινοξικών αλληλουχιών που εντοπίζονται στο 3' άκρο του γονιδίου VP1 και στο 5' άκρο του γονιδίου 2A. Συγκεκριμένα το μοτίβο MYVPPG στο 3' άκρο του γονιδίου VP1 είναι παρόν σε 44 πρότυπα στελέχη εντεροϊών (Oberste et al., 1999a). Σε 13 πρότυπα στελέχη υπάρχει η αντικατάσταση I→V, για τον CAV τύπου 7 υπάρχει A→V, ενώ οι ιοί CAV12, 14 και ο EV71 περιέχουν το μοτίβο MYVPTG. Για τους ιούς του είδους B όπου ανήκουν οι Echo ιοί, το μοτίβο καταγράφεται ως M(Y/F)(V/I)PPG και ακολουθείται από το αμινοξύ G (Oberste et al., 1999a). Ο εκκινητής 012 βασίζεται στο μοτίβο MYVPPG. Όσον αφορά τον αντικωδικό εκκινητή 011, ο σχεδιασμός του έγινε λαμβάνοντας υπόψη τη συντηρημένη μεταξύ των περισσότερων εντεροϊών αλληλουχία FG(Q/H)QSGA η οποία τοποθετείται στο 5' άκρο του γονιδίου 2A. Σύμφωνα με την παραπάνω εργασία, κατά τον έλεγχο της ειδικότητας των συγκεκριμένων εκκινητών, στα πρότυπα στελέχη των Echo ιών επιτυχής ενίσχυση σημειώθηκε σε 20 από τα 28 στελέχη αναφοράς με τους ορότυπους ECV3, 7, 9, 11, 15, 21, 29, 32 να εμφανίζουν αρνητικό αποτέλεσμα. Αντίθετα, στο δικό μας εργαστήριο η εφαρμογή των ίδιων εκκινητών και στα 28 στελέχη αναφοράς Echo ιών παρουσίασε μεγαλύτερη ειδικότητα καθώς το μόνο πρότυπο στέλεχος που δεν ενισχύθηκε ήταν το ECV32 (Kottaridi et al., 2004). Όσον αφορά τα κλινικά στελέχη, η χρήση των εκκινητών 012-011 έδωσε θετικό αποτέλεσμα για όλα τα υπό μελέτη κλινικά δείγματα τόσο στην εργασία των Oberste και συν. (Oberste et al., 1999b), όσο και στην εφαρμογή τους στα κλινικά δείγματα Echo ιών της παρούσας διατριβής (Kottaridi et al., 2004).

Σε μια άλλη μελέτη των Caro et al., (Caro et al., 2001), περιγράφεται ένα διαφορετικό πρωτόκολλο για την μοριακή τυποποίηση των ανθρώπινων εντεροϊών, το οποίο κατά την αντίστροφη μεταγραφή χρησιμοποιεί ειδικούς και όχι τυχαίους εκκινητές και το προϊόν ενίσχυσης περιλαμβάνει το 3' άκρο του γονιδίου VP1, ολόκληρες τις 2A και 2B κωδικές περιοχές και το 5' άκρο του γονιδίου 2C με το μέγεθος του προϊόντος της RT-PCR να φθάνει τις 1452 βάσεις. Σύμφωνα με την εργασία αυτή η ενίσχυση του 3' άκρου της VP1 περιοχής είναι κατάλληλη για το συσχέτισμό του γονοτύπου με τον ορότυπο και επομένως είναι χρήσιμη για τη μοριακή διάγνωση και ταυτοποίηση του

οροτύπου, ενώ το υπόλοιπο τμήμα του αρκετά μεγάλου προϊόντος ενίσχυσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες μοριακής επιδημιολογίας και εξέλιξης των εντεροϊών. Αν και η εφαρμογή του πρωτοκόλλου που περιγράφεται από τους Caro και συν. σε όλα τα στελέχη αναφοράς των Echo ιών στη συγκεκριμένη εργασία έδωσε θετικό αποτέλεσμα για όλους τους οροτύπους, στο εργαστήριό μας για τα στελέχη ECV3 και ECV20 δεν υπήρξε προϊόν ενίσχυσης. Όσον αφορά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε κλινικά στελέχη η παραπάνω εργασία παρουσιάζει επιτυχή ενίσχυση και στα 26 στελέχη Echo ιών που περιλάμβανε, ενώ αντίθετα από τα 38 στελέχη Echo ιών που είχαμε στη διάθεσή μας για την παρούσα διατριβή, θετικό αποτέλεσμα καταγράφηκε στα 34. Ειδικότερα, κλινικό δείγμα οροτύπου ECV7 ήταν αρνητικό, αν και κλινικό στέλεχος του ίδιου οροτύπου στην εργασία των Caro και συν. ήταν θετικό. Επίσης αρνητικά ήταν 2 από τα 6 ECV13 και 1 από τα 4 ECV30 κλινικά στελέχη μας. Η ικανότητα των συγκεκριμένων εκκινητών να ενισχύουν κάποια και όχι όλα τα στελέχη του ίδιου οροτύπου πιθανόν να αντικατοπτρίζει την ενδοοροτυπική ποικιλότητα και επιτείνει την ανάγκη για αλληλούχιση περισσότερων στελεχών ώστε να οριοθετηθεί η παραπάνω ποικιλότητα και να σχεδιαστούν βελτιστοποιημένοι εκκινητές.

Το πρόβλημα στη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών φαίνεται πως βρήκε λύση με το σχεδιασμό των εκκινητών 292-222 καθώς περιγράφεται στην εργασία των Oberste και συν. (Oberste et al., 2003). Πρόκειται για εκφυλισμένους εκκινητές που περιέχουν ινοσίνη και ενισχύουν περίπου 340 βάσεις από το 5' άκρο του γονιδίου VP1 σε όλους τους 64 οροτύπους των εντεροϊών, σε νέους οροτύπους εντεροϊών (Oberste et al., 2000; Oberste et al., 2001) καθώς και σε μερικούς ρινοϊούς (Oberste et al., 2000). Η αλληλούχιση του προϊόντος PCR και η σύγκριση της ευρεθείσας αλληλουχίας με ομόλογες αλληλουχίες καταχωρημένες στη GenBank, δίνει ακριβή πληροφορία για τον προσδιορισμό του οροτύπου. Έτσι, ομοιότητα με ποσοστό μεγαλύτερο του 75% με κάποιο από τα πρότυπα στελέχη υποδηλώνει ότι το υπό μελέτη δείγμα ανήκει στον ομόλογο ορότυπο αρκεί με τον επόμενο κοντινότερο ορότυπο να παρουσιάζει ομολογία μικρότερη του 70% (Oberste et al., 1999a; Oberste et al., 1999b; Oberste et al., 2000). Η εφαρμογή των συγκεκριμένων εκκινητών για την ενίσχυση του 5' άκρου της VP1 στα κλινικά δείγματα της παρούσας διατριβής έδωσε προϊόν ενίσχυσης σε όλα, ενώ στα πρότυπα στελέχη με το ίδιο πρωτόκολλο καταγράφηκε απουσία ενίσχυσης για το πρότυπο ECV15.

Στη συνέχεια της παρούσας διατριβής συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα της τυποποίησης 41 κλινικών στελεχών Echo ιών που προέκυψαν από την εφαρμογή της

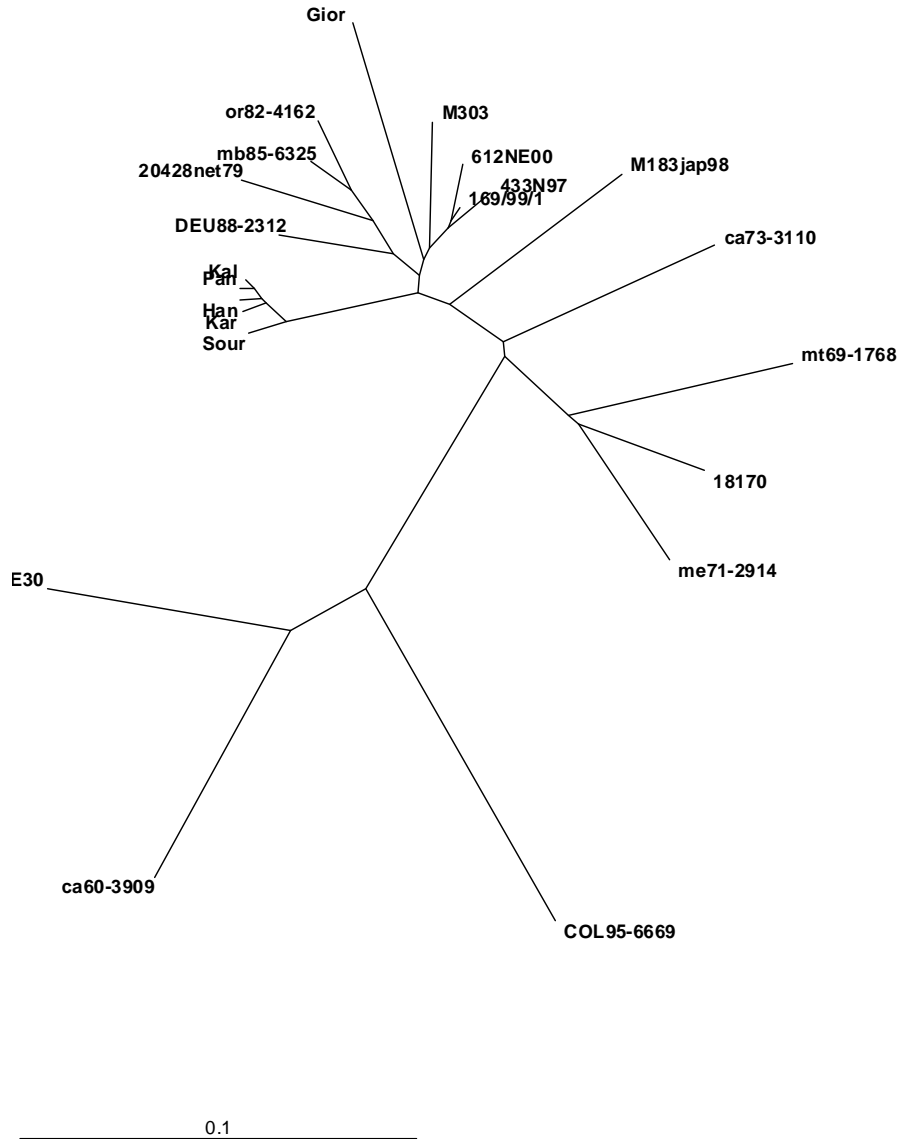
κλασσικής μεθόδου της οροεξουδετέρωσης, με αυτά της RT-PCR και της φυλογενετικής ανάλυσης του 5' και 3' άκρου του γονιδίου VP1 (Kottaridi et al., 2005). Με τη χρήση των ειδικών δεξαμενών εξουδετερωτικών αντιορών (RIVM pools), όπως περιγράφεται και στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, 3 από τα 7 υπό μελέτη κλινικά στελέχη ECV30 χαρακτηρίστηκαν ως μη τυποποιήσιμα, ενώ για 1 στέλεχος ECV13 και 1 στέλεχος ECV30 ο ορότυπος που βρέθηκε ήταν διαφορετικός από αυτόν που η μοριακή τυποποίηση στη συνέχεια καθόρισε.

Μια πιθανή εξήγηση για το μεγάλο ποσοστό αποτυχίας προσδιορισμού του οροτύπου των ECV30 στελεχών με αυτή τη μέθοδο, είναι το γεγονός ότι ο Echo ιός τύπου 30 είναι αντιγονικά ετερογενής, με τρεις μείζονες αντιγονικές ομάδες να έχουν εντοπιστεί (Duncan, 1968; Wenner et al., 1967) και ότι η πλειοψηφία των θέσεων με τη μεγαλύτερη ποικιλότητα να εδράζει στο τέλος της VP1 πρωτεΐνης. Πρόκειται για έναν ιό που συχνά απομονώνεται σε επιδημίες άσηπτης μηνιγγίτιδας σε αρκετές χώρες με εύκρατες κλιματολογικές συνθήκες (Oberste et al., 1999a; Oberste et al., 1999c; Trallero et al., 2000). Μελέτες επιτήρησης του ECV30 δείχνουν ότι ο συγκεκριμένος ιός ακολουθεί μάλλον επιδημικό παρά ενδημικό τρόπο μετάδοσης, προκαλώντας μεγάλες επιδημίες τις οποίες ακολουθούν περίοδοι αρκετών χρόνων όπου ο ιός παραμένει αδρανής πιθανώς εξαιτίας της ανάπτυξης ανοσίας στον πληθυσμό (Oberste et al., 1999a). Το πρότυπο εξέλιξης των ECV30 διαφέρει από αυτό των υπόλοιπων εντεροϊών. Η μοριακή επιδημιολογία του ECV30 μπορεί να συγκριθεί με αυτή του ιού της γρίπης, καθώς επικρατούσες γενετικές γραμμές μπορούν να εκτοπίσουν τις λιγότερο εγκαθιδρυμένες σε έναν πληθυσμό. Έχει δειχθεί ότι η κυκλοφορία των γονότυπων των πολιοϊών περιορίζεται γεωγραφικά. Αντίθετα, ένας συγκεκριμένος γονότυπος ECV30 μπορεί να κυκλοφορεί ταυτόχρονα σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου.

Σύμφωνα με μελέτες μοριακής επιδημιολογίας του ECV30, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη τεσσάρων γονοτύπων (1-4) και 2 υποομάδων για το γονότυπο 4 (4a και 4b) με βάση τη στοίχιση των αλληλουχιών ολόκληρου του VP1 γονιδίου 136 γεωγραφικά διάσπαρτων ECV30 στελεχών που απομονώθηκαν σε 10 χώρες μεταξύ των ετών 1956-1988 και την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων χρησιμοποιώντας τις μεθόδους της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood) και της «ένωσης γειτόνων» (neighbor joining) (Oberste et al., 1999a). Το πρόβλημα σχετικά με το παραπάνω κριτήριο κατάταξης των Echo ιών 30 που αναφέρεται από τον Palacios σε μεταγενέστερη εργασία (Palacios et al., 2002), αφορά το γεγονός ότι οι νουκλεοτιδικές αποστάσεις που καταγράφονται μεταξύ μελών διαφορετικών γονοτύπων είναι μικρότερες σε σχέση με

αυτές μεταξύ μελών του ίδιου γονότυπου. Άλλοι ερευνητές που μελέτησαν τη μοριακή επιδημιολογία 112 Ευρωπαϊκών στελεχών παρουσίασαν μια διαφορετική ταξινόμηση των ECV30 ιών σε τρεις γονότυπους (1-3) με τον τελευταίο γονότυπο να χωρίζεται σε τέσσερις υπο-ομάδες (3a-3d) με βάση την αλληλουχία της γενωμικής περιοχής VP4-VP2 (Savolainen et al., 2001). Η αδυναμία αυτού του σχήματος ταξινόμησης εστιάζεται στο γεγονός ότι το τμήμα του γενώματος που χρησιμοποιεί είναι λιγότερο αξιόπιστο σε σχέση με τη VP1 ή τη VP1/2A περιοχή. Επιπρόσθετα, η διερεύνηση του γονότυπου 1 θεωρείται ελλιπής καθώς η φυλογενετική ανάλυση δεν περιλαμβάνει όλα τα στελέχη αναφοράς καθώς και στελέχη που απομονώθηκαν πριν το 1977. Η πληρέστερη κατάταξη των ECV30 ιών περιγράφεται από τον Palacios και συν. (Palacios et al., 2002) και βασίζεται στην κατασκευή φυλογενετικών δένδρων και την εκτίμηση τόσο των νουκλεοτιδικών όσο και των αμινοξικών αποστάσεων που προέκυψαν μετά την αλληλούχιση του 3' άκρου του γονιδίου VP1 σε 318 ECV30 στελέχη και όλα τα στελέχη αναφοράς. Κατά τη φυλογενετική ανάλυση τα στελέχη αυτά ταξινομήθηκαν σε δύο ευρείς γονότυπους (I και II) και αυτοί χωρίστηκαν περαιτέρω σε υποομάδες και οι υποομάδες σε γενετικές γραμμές με βάση τις νουκλεοτιδικές αποστάσεις.

Η φυλογενετική ανάλυση του 3' άκρου του γονιδίου VP1 των ECV30 στελεχών που περιλήφθηκαν στη διατριβή και απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια άσηπτης μνηγιγίτιδας το 2001 στην Ελλάδα, παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς 5 από τα 6 στελέχη ομαδοποιούνται στενά και δημιουργούν έναν ευδιάκριτο κλάδο στο φυλογενετικό δένδρο υποδεικνύοντας μια καινούρια γενετική γραμμή στην υποομάδα B του γονότυπου II, όταν συγκριθούν με στελέχη της βιβλιογραφίας και των δύο γονότυπων I και II. Αντίθετα, το στέλεχος *Gior* ενώ απομονώθηκε κατά την ίδια επιδημία τοποθετείται σε ανεξάρτητο κλάδο (Εικόνα 41). Το ECV30 στέλεχος *169/97/1* που προέρχεται από σποραδική περίπτωση φαίνεται να ομαδοποιείται στενά με στελέχη της βιβλιογραφίας που ανήκουν στη γενετική γραμμή F της υποομάδας B του γονότυπου II (Kottaridi et al., 2005).



Εικόνα 41. Φυλογενετικό δένδρο του τμήματος του γονιδίου VP1nt. 2985-3325, (3' VP1), κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες των κλινικών στελεχών Echo ιών οροτύπου 30 της παρούσας διατριβής και αντιπροσωπευτικών των γονοτύπων I και II Echo 30 στελεχών προερχόμενων από την τράπεζα αλληλουχιών GenBank

Όπως φαίνεται από τη φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων 2A και 2B, η συσχέτιση γονοτύπου-οροτύπου που παρατηρήθηκε στο γονίδιο VP1 διακόπτεται. Επιπλέον η μονοφυλετικότητα των στελεχών του ίδιου οροτύπου δεν είναι καθολική

αλλά περιορίζεται στα στελέχη που προέρχονται από την επιδημία της άσηπτης μηνιγγίτιδας με στελέχη οροτύπων ECV6, ECV13 και ECV30 και την επιδημία με στελέχη οροτύπου ECV14. Ενώ στο γονίδιο VP1 στελέχη του ίδιου οροτύπου ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης ομαδοποιούνται στενά μεταξύ τους, στις γειτονικές γενετικές περιοχές 2A και 2B δεν παρατηρείται κάτι σχετικό παρά μόνον μεταξύ στελεχών με επιδημιολογική σύνδεση. Έτσι, τα κλινικά στελέχη που προέρχονταν από τη Ρουμανία και συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη των γονιδίων 2A και 2B ενίσχυσαν επιπλέον με τη φυλογενετική τους ανάλυση, την επιδημιολογική συσχέτιση των ελληνικών στελεχών (Kottaridi et al., 2006).

Η παρατήρηση που αφορά τη διακοπή της μονοφυλετικότητας στελεχών του ίδιου οροτύπου ήδη από την πολύ κοντινή με την καψιδιακή περιοχή, οδηγεί στην υπόθεση ότι τα στελέχη αυτά προέρχονται από κοινό πιθανώς πρόσφατο πρόγονο και η αποκλίνουσα εξέλιξή τους που είναι εμφανής στο γονίδιο 2A και 2B έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών μη-δομικών γενωμάτων, με τη συσσώρευση σημειακών μεταλλαγών και την ύπαρξη πιθανών γεγονότων ανασυνδυασμού. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ECV6 επιδημικό στέλεχος *Paraz*, το οποίο δεν ομαδοποιείται με τα υπόλοιπα στελέχη της ομάδας του στο γονίδιο 2A, πιθανόν εξαιτίας κάποιου γεγονότος ανασυνδυασμού που συνέβη κατά την εξέλιξή του και οδήγησε στην ανταλλαγή αυτού του γενετικού τμήματος με κάποιο αντίστοιχο από τα κυκλοφορούντα στελέχη. Επίσης συνεχίζει να έχει ενδιαφέρον η εξελικτική πορεία του ECV30 επιδημικού στελέχους *Gior* το οποίο όπως ήδη σχολιάστηκε κατά την ανάλυση του 3' άκρου του γονιδίου VP1, διαγράφει ανεξάρτητη εξελικτική πορεία από τα υπόλοιπα επιδημικά ECV30 στελέχη.

Εκτός από τη φυλογενετική ανάλυση, ο υπολογισμός των νουκλεοτιδικών διαφορών μεταξύ των στελεχών του ίδιου οροτύπου υποδηλώνει την επιδημιολογική συσχέτιση αυτών (Kottaridi et al., 2006). Οι ενδο-οροτυπικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στο γονίδιο 2A μεταξύ των επιδημικών στελεχών ECV6 και ECV30 είναι ψηλότερες σε σχέση με αυτές των στελεχών των οροτύπων ECV13 και ECV14 και οφείλονται στις αλληλουχίες των στελεχών *Gior* και *Paraz*.

Στο τελευταίο μέρος της διατριβής αλληλουχήθηκαν και αναλύθηκαν φυλογενετικά οι γενετικές περιοχές 2C και 3D επιλεγμένων κλινικών στελεχών Echo ιών. Οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν τις μη-κωδικές πρωτεΐνες γενικά παρουσιάζουν μικρότερη ποικιλότητα σε σχέση με τις δομικές (Huttunen et al., 1996; Muir et al., 1998). Εξαιτίας της απουσίας του μηχανισμού επιδιόρθωσης (proofreading activity) της 3D πολυμεράσης ο ρυθμός εισαγωγής λάθους νουκλεοτιδίων είναι υψηλός και συνεπώς είναι

δυνατόν να συγκεντρώνονται μεταλλαγές κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του ιικού γενώματος (Drake JW, 1993; Drake and Holland 1999). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι ο ανασυνδυασμός είναι ένας σημαντικός και σχετικά συχνός μηχανισμός της εξέλιξης των εντεροϊών καθώς ανταλλαγές γενετικών τμημάτων μπορούν να συμβούν εντός ενός οροτύπου (intratypic recombination) ή μεταξύ διαφορετικών οροτύπων (intertypic recombination) (Santti et al., 1999).

Η πρώτη νύξη για πιθανό ανασυνδυασμό σε κλινικά στελέχη εντεροϊών καταγράφηκε κατά την ανάλυση φυλογενετικών συσχετίσεων στελεχών CBV5 που προέρχονταν από τις ΗΠΑ, στις γενωμικές περιοχές VP1-2A και 5'NTR (Korecka et al., 1995). Μερικά χρόνια αργότερα, το 2000, η ανάλυση 35 CAV9 στελεχών σε τρεις γενωμικές περιοχές και η ασυμφωνία στη φυλογενετική ομαδοποίηση μεταξύ καμιδίου και 3D περιοχής, αποδόθηκε σε συχνό ανασυνδυασμό (Santti et al., 2000). Σε άλλη εργασία (Lukashev et al., 2003b) η φυλογενετική ανάλυση των περιοχών 5' NTR, VP1 και 3D τεσσάρων E11 στελεχών που απομονώθηκαν το 1980 από βρέφη με φλεγμονή της ίριδας, παρείχε ενδείξεις για ανασυνδυασμό. Περαιτέρω ανάλυση ολόκληρου του γενώματος αυτών των στελεχών έδειξε ότι και τα τέσσερα στελέχη ήταν περισσότερο όμοια με το πρότυπο στέλεχος E11 Gregory στην P1 περιοχή, ενώ στις υπόλοιπες περιοχές παρουσίαζαν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα ετερόλογα πρότυπα στελέχη E1 και E9 (Lukashev et al., 2004). Επιπλέον ενδείξεις ανασυνδυασμού στη μη δομική περιοχή κυκλοφορούντων E11 στελεχών αναφέρθηκαν και στην εργασία των Chevaliez και συν (Chevaliez et al., 2004).

Σε επόμενη μελέτη, η σύγκριση της πλήρους αλληλουχίας των ORF (ανοιχτών πλαισίων ανάγνωσης) τριών ασιατικών στελεχών του πρόσφατα χαρακτηρισμένου οροτύπου EV73, υπέδειξε ανασυνδυασμούς στη φυλογενετική ιστορία αυτών των στελεχών (Norder et al., 2002), ενώ μία επίσης πρόσφατη εργασία περιέγραψε ανασυνδυασμένα κλινικά στελέχη οροτύπου EV71 (Chan and AbuBakar, 2004). Μέχρι την παρούσα μελέτη, μόνο μία εργασία, έχει περιγράψει απουσία ανασυνδυασμού σε μελετημένο κλινικό στέλεχος (Echo 7 UMMC) ως προς το ομόλογο πρότυπό του (Echo 7 Wallace) (Norder et al., 2002).

Η πρώτη προσπάθεια για να συγκριθούν ταυτόχρονα πρότυπα στελέχη διαφορετικών οροτύπων περιγράφεται στην εργασία των Oprisan και συν (Oprisan et al., 2002), το 2002. Εννέα στελέχη τριών διαφορετικών οροτύπων των E4, E7 και E30, τα οποία απομονώθηκαν κατά τη διάρκεια επιδημίας άσηπτης μηνιγγίτιδας, συγκρίθηκαν στη VP1 και 3D περιοχή. Τα στελέχη αυτά βρέθηκε να είναι ανασυνδυασμένα

συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα πρότυπα και περισσότερο όμοια μεταξύ τους παρά με τα πρότυπα στελέχη στην 3D περιοχή. Οι Lindberg και συν. (Lindberg et al., 2003) υποστήριξαν την ύπαρξη ανασυνδυασμού σε 20 στελέχη E30 και CBV4 τα οποία παρουσίασαν διαφορετικό πρότυπο φυλογενετικής ομαδοποίησης στην VP1 και 3D περιοχή με όλα τα στελέχη να σχηματίζουν στην 3D περιοχή τρεις ευδιάκριτες ομάδες. Μια άλλη ομάδα ερευνητών (Lukashev et al., 2003a) ασχολήθηκε με τη φυλογενετική ανάλυση 40 HEV-B στελεχών που προέρχονταν από σποραδικές περιπτώσεις, απομονώθηκαν στην πρώην Σοβιετική Ένωση κατά τα έτη 1981-2002 αντιπροσώπευαν 11 οροτύπους. Τα στελέχη αυτά συγκρίθηκαν σε 4 γενωμικές περιοχές και η μελέτη της 3D περιοχής έδειξε ότι όλα τα στελέχη ήταν ανασυνδυασμένα και ομαδοποιούνταν μακριά από τα περισσότερα πρότυπα στελέχη. Επιπλέον στην 3D περιοχή τα πρόσφατα απομονωθέντα στελέχη χωρίζονταν σε δύο ομάδες εκ των οποίων η μία συγκέντρωνε στελέχη μετά το 1990 που ήταν κοντά φυλογενετικά με το πρότυπο στέλεχος E30 και η άλλη στελέχη που απομονώθηκαν μεταξύ 1980 και 1990 και ήταν κοντά φυλογενετικά με το πρότυπο στέλεχος E1. Μία πιο πρόσφατη εργασία, η οποία αφορούσε στη συγκριτική φυλογενετική ανάλυση τεσσάρων γενετικών περιοχών (5' NTR, VP4-VP2, VP1 και 3D) 55 κλινικών στελεχών, τα οποία αντιπροσώπευαν και τους έξι διαφορετικούς οροτύπους CBV εντεροϊών, παρουσίασε, κατά όμοιο τρόπο, τον ανασυνδυασμό μεταξύ του δομικού και λειτουργικού γονιδιώματος των ιών αυτών (Oberste et al., 2004b). Η εργασία υποστήριξε με σαφή τρόπο, ότι μεταξύ των κλινικών στελεχών, που κυκλοφορούν, πραγματοποιείται μεταφορά γενετικού υλικού, η οποία μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να αφορά και στην P1 δομική περιοχή του γονιδιώματος των εντεροϊών.

Στην τελευταία εργασία των Lukashev και συν (Lukashev et al., 2005b) μελετήθηκε ολόκληρο το γένωμα οχτώ HEV-B στελεχών που αντιπροσώπευαν τους οροτύπους E6, E7, E11 και CVB5 και είχαν απομονωθεί στις χώρες της πρώην Σοβιετικής Ένωσης μεταξύ των ετών 1998 και 2002. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής ενίσχυσαν την υπόθεση της ανεξάρτητης εξέλιξης των γονιδιακών τμημάτων των εντεροϊών καθώς όλα τα στελέχη βρέθηκε να είναι μωσαϊκά και μόνο οι γενωμικές περιοχές VP2-VP3-VP1 σχετίζονταν στενά με τα αντίστοιχα πρότυπα στελέχη. Το γενωμικό τμήμα 2C-3D σε επτά από τα οκτώ στελέχη ήταν περισσότερο όμοιο με τα πρότυπα E30, EV74 και EV75, ενώ το όγδοο στέλεχος ήταν περισσότερο κοντά εξελικτικά με τα πρότυπα E9 και E1.

Στα πλαίσια της μελέτης της εξέλιξης των κλινικών στελεχών που συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα διατριβή, επιλέχθηκαν 4 επιδημικά και 2 από σποραδικές περιπτώσεις κλινικά στελέχη Echo ιών που αντιπροσώπευαν τους οροτύπους E6, E13 και E30 και προσδιορίστηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδίου 2C καθώς και 560nt από το γονίδιο 3D. Αναζητήθηκαν οι φυλογενετικές τους σχέσεις με τα πρότυπα στελέχη καθώς και με κλινικά στελέχη που κυκλοφορούσαν σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και ήταν καταχωρημένα στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank). Όπως ήδη αναφέρθηκε τα βιβλιογραφικά δεδομένα παρουσιάζουν διαχωρισμό των κλινικών στελεχών στην 3D περιοχή σε δύο ομάδες με την καθεμιά να σχετίζεται με τα πρότυπα στελέχη E1 και E30 γεγονός που διαπιστώθηκε και κατά τη φυλογενετική ανάλυση των στελεχών της παρούσας διατριβής. Η ασυμφωνία που παρατηρήθηκε αφορά τη χρονολογία απομόνωσης των ομοιοζόντων κλινικών στελεχών με το E1 πρότυπο στέλεχος, η οποία κυμάνθηκε μεταξύ των ετών 1998-2001, ενώ σε άλλες σχετικές μελέτες εξελικτικά κοντά με το πρότυπο E1 τοποθετούνται στελέχη που απομονώθηκαν τη δεκαετία του 1980 (Oprisan et al., 2002; Lukashev et al., 2003; Lukashev et al., 2005). Με βάση την παρατήρηση αυτή θα πρέπει να τονιστεί ότι όσο περισσότερες νέες αλληλουχίες στελεχών που κυκλοφορούν ανά τον κόσμο καταχωρούνται στην Τράπεζα Αλληλουχιών (GenBank) κάποια από τα υπάρχοντα συμπεράσματα πιθανόν να χρειάζονται αναθεώρηση καθώς είναι προφανές ότι δεν είναι ο χρόνος απομόνωσης που παίζει τόσο σημαντικό ρόλο στην ομαδοποίηση των κλινικών στελεχών με τα πρότυπα στο 3D γονίδιο, αλλά η τυχαιότητα των γεγονότων του ανασυνδυασμού μεταξύ των απανταχού παρόντων μη δομικών γονιδίων των εντεροϊών.

Αν και η τάση που υπάρχει στην φυλογενετική ομαδοποίηση των εντεροϊών δείχνει ότι στο γονίδιο 3D συγκεντρώνονται όλα τα πρόσφατα κλινικά στελέχη μακριά από τα περισσότερα πρότυπα, τα στελέχη της παρούσας διατριβής έδειξαν την ίδια τάση και στο γονίδιο 2C. Τα στελέχη που σύμφωνα με τη φυλογενετική ανάλυση βρέθηκε να σχετίζονται στο γονίδιο 2C με το πρότυπο στέλεχος E1 διατήρησαν αυτή τη συσχέτιση και στο γονίδιο 3D, υποδηλώνοντας έτσι ότι διατηρούν την ομοιότητα με τον κοινό τους πρόγονο και κατά μήκος του 3' τμήματος του γενώματος, ενώ η ίδια παρατήρηση αφορά και κάποια όχι όμως όλα τα στελέχη που ομαδοποιούνται με το πρότυπο E30.

Η φυλογενετική μελέτη του γονιδίου 2C στελεχών που απομονώθηκαν κατά την επιδημία της άσηπτης μηνιγγίτιδας, παρουσίασε κοινή εξελικτική πορεία με στελέχη που είχαν απομονωθεί στην πρώην Σοβιετική Ένωση, υποδεικνύοντας ότι η εξέλιξη του γενώματος των εντεροϊών είναι δυνατόν να μην επηρεάζεται από γεωγραφικές ή χρονικές

επιδράσεις. Κοντινότερη φυλογενετική συσχέτιση των στελεχών Pleur_E13 και Kal_E30 με το στέλεχος CBV3_18219_02 προερχόμενο από τη Μολδαβία καταγράφηκε κατά τη φυλογενετική ανάλυση των πρώτων 563nt του γονιδίου 3D, γεγονός το οποίο οδήγησε στην αναζήτηση πιθανού ανασυνδυασμού με τη βοήθεια της similarity ανάλυσης. Η SimPlot ανάλυση του γονιδίου 3D έδειξε αυξημένη ομοιότητα του Pleur_E13 με το CBV3_18219_02 παρά με το Kal_E30 υποδεικνύοντας ότι πιθανόν να συνέβη γεγονός ανασυνδυασμού λίγα χρόνια πριν την απομόνωσή τους, αν και η συλλογή τους πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές γεωγραφικές τοποθεσίες. Αντίθετα η simplot ανάλυση κατά τη σύγκριση των ίδιων στελεχών για το γονίδιο 2C δεν παρουσίασε αυξημένα ποσοστά ομοιότητας, παρά σημειώθηκε κοινή εξελικτική πορεία για τους συγκεκριμένους γεωγραφικά απομονωμένους ιούς (Kottaridi et al., 2007). Τα παραπάνω ευρήματα ενισχύουν συμπεράσματα βιβλιογραφικών αναφορών για την τάση που υπάρχει για ανασυνδυασμό μεταξύ διαφορετικών οροτύπων κατά την εξέλιξη των εντεροϊών. Η ταχεία μετάδοση των ιών μεταξύ των διάφορων περιοχών, δείχνει ότι τα γεωγραφικά ή χρονικά εμπόδια είναι δυνατόν να καταργούνται και καθώς νέες αλληλουχίες καταχωρούνται καινούρια variants μη-δομικών αλληλουχών θα είναι υπό μελέτη.

Η εξάπλωση κάποιας ασθένειας που έχει προκληθεί από εντεροϊό είναι πιθανό να οφείλεται στη μετάδοση επιδημικών στελεχών στα οποία η ανταλλαγή τμημάτων του 3' άκρου του γενόματος μπορεί να επηρεάσει ικές λειτουργίες που εμπλέκονται στον τροπισμό, τη μολυσματικότητα και τη μετάδοση του ιού και η ανίχνευση τέτοιων ανασυνδυασμένων στελεχών θα πρέπει να αποτελεί μέρος της εργαστηριακής ρουτίνας σε εργαστήρια που ασχολούνται με τη διάγνωση των εντεροϊών.

E. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Η μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών παρέχει πληροφορίες μόνο για περίπου το 1/3 του ιικού γενώματος (Oberste et al., 1999). Ένας εντεροϊός μπορεί να θεωρηθεί ως ένα σύνολο καψιδιακών αλληλουχιών που αναζητά μη καψιδιακές αλληλουχίες υψηλής προσαρμοστικότητας ώστε να δημιουργούνται στελέχη με πλεονέκτημα εκλεκτικής επιλογής. Εναλλακτικά ένας εντεροϊός μπορεί να θεωρηθεί ως replicon που αναζητά καψίδιο προκειμένου να εισέλθει στο κύτταρο-ξενιστής και έτσι να αποκτήσει πρόσβαση στο κυτταρόπλασμα και να πολλαπλασιαστεί.

Υπάρχουν πολλές συνθήκες που πρέπει να ληφθούν υπόψη και πολλά ερωτήματα που πρέπει να απαντηθούν ώστε να γίνει κατανοητό ποιοί παράγοντες επηρεάζουν την εξέλιξη κάθε περιοχής. Για παράδειγμα, η γενική παρατήρηση ότι η P1 κωδική περιοχή του γενώματος των εντεροϊών είναι προστατευμένη από εξελικτικά γεγονότα που θα μπορούσαν να αναδιοργανώσουν τη δομή τους, ενώ άλλες περιοχές είναι περισσότερο δεκτικές σε μεγαλύτερες γενωμικές ανακατατάξεις που μπορεί να περιλαμβάνουν ανταλλαγές γονιδιακών τμημάτων μεταξύ στελεχών κατά τη διάρκεια της φυσικής μόλυνσης και κυκλοφορίας αποτελούν ερωτήματα που πλήθος βιβλιογραφικών αναφορών προσπαθούν να εξηγήσουν. Επιπλέον ερωτήματα όπως πότε και κάτω από ποιες συνθήκες ένα πιθανό γεγονός ανασυνδυασμού μπορεί να λάβει χώρα, ποιοι παράγοντες επηρεάζουν τη συχνότητά του, πώς μπορεί να ανιχνευθεί με επάρκεια και ποιος είναι ο ρόλος των γενετικών χαρακτηριστικών που απαιτούνται από τον ανασυνδυασμό ή τις σημειακές μεταλλάξεις για να καθορίσουν τα χαρακτηριστικά ενός στελέχους όσον αφορά την εξάπλωση και την παθογένεση του, αποτελούν ερωτήματα που ζητούν απάντηση από μελλοντικές εργασίες.

Για τους παραπάνω λόγους, είναι απαραίτητο να λαμβάνουν χώρα μελέτες σε κυκλοφορούντα στελέχη λαμβάνοντας υπόψη τις μοριακές και βιολογικές ιδιότητες των εντεροϊών ώστε να παρέχουν νέες πληροφορίες που κατά το δυνατόν να απαντούν στα παραπάνω ερωτήματα. Ο καθορισμός της πρωτοδιάταξης περισσότερων γενωμικών περιοχών, η εκτίμηση της δεκτικότητας συγκεκριμένων περιοχών σε γενωμικές ανακατατάξεις και χαρτογράφηση «θερμών» για ανασυνδυασμό περιοχών του γενώματος των εντεροϊών είναι κάποιες από τις προτεραιότητες που πρέπει να δοθούν στα πειράματα μελέτης της εξέλιξης των εντεροϊών, ούτως ώστε να γίνει κατανοητή η φύση του γενώματος και ο μηχανισμός εξέλιξής τους.

ΣΤ. ABSTRACT

Picornavirus family consists of 6 genera with many pathogenic strains that are for humans. Echoviruses belong to the genus of enteroviruses which comprises of 64 serotypes and is implicated in a wide range of human diseases. Enterovirus serotypes are today classified based on biological and molecular data in 5 species: (i) PV (polioviruses 1-3), (ii) HEV-A (CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16, and EV71), (iii) HEV-B (CAV9, CBV1-6, all Echoviruses and EV69), (iv) HEV-C (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22 and CAV24) and (v) HEV-D (EV68 and EV70). The enteroviral RNA is a single-stranded, positive-sense genome of 7, 4-7, 5 Kb. A small virus encoded protein (VPg) is covalently linked to the 5' terminal nucleotide. Between the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) there is a single open reading frame (ORF) of approximately 2100 codons which is translated by a cap dependent mechanism to a long polyprotein. Viral proteases cleave the polyprotein to give the structural and non-structural proteins. The capsid proteins designated VP4, VP3, VP2, VP1 respectively, are encoded by the P1 region. The protease 2A^{pro} and proteins 2B, 2C (involved in RNA replication) are encoded by the P2 region. Finally P3 region encodes VPg and precursor 3AB, the major viral protease 3C^{pro} and the RNA dependent RNA polymerase 3D^{pol}.

The classical methods for the detection and characterization of enteroviruses are based on the virus isolation through cell cultures and seroneutralization. Serological diagnosis of enteroviral infections is rather complicated due to the existence of antibody heterotypic reactions, to the lack of a uniformly reacting antigen and to the high serotype number. The development of Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction provides with a direct and sensitive tool for the detection of enterovirus genetic material in clinical samples and is used successfully in order to detect those serotypes that are not propagated in cell culture systems, as well as the non-typable with the classical methods strains.

The aim of the present doctoral thesis was firstly the analysis of different genomic regions of prototype and clinical Echovirus strains as far as it concerns the suitability of them for diagnosis. Then, some of the genome parts were sequenced and nucleotide and phylogenetic relationships were analyzed with the aid of bioinformatics software. The phylogenetic grouping pattern of the clinical isolates revealed a correlation of serotype and genotype either in 5' or in 3' end of VP1 gene but absence of this relationship in the adjacent non-structural genes. The sequences obtained from the 3' part of the genome, enforced the observation that recent echovirus isolates differ significantly from prototype

strains in the downstream regions of the genome and provided further evidence that non-structural enterovirus genes are ubiquitous and may combine freely adapting genomic sequences that are not restricted from the place of isolates' origin.

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Acharya R., Fry E., Stuart D., Fox G., Rowlands D., and Brown F. (1989) The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337:709-716.

Agirre A., Barco A., Carrasco L., and Nieva J.L. (2002) Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.*, 277:40434–40441.

Agol V.I., Belov G.A., Bienz K., Egger D., Kolesnikova M.S., Romanova L.I., Sladkova L.V., and Tolskaya E.A. (2000) Competing death programs in poliovirus-infected cells: commitment switch in the middle of the infectious cycle. *J. Virol.*, 74:5534–5541.

Agrez M.V., Shafren D.R., Gu X., Cox K., Sheppard D., and Barry R.D. (1997) Integrin $\alpha v \beta 6$ enhances coxsackievirus B1 lytic infection of human colon cancer cells. *Virology*, 239:71–77.

Aldabe R., Irurzun A., and Carasco L. (1997) Poliovirus protein 2BC increases cytosolic free calcium concentrations. *J. Virol.*, 71:6214-6217.

Alssadi S., Hassard S., and Stanway G. (1989) Sequences in the 5' non-coding region of human rhinovirus 14 RNA that affect in vitro translation. *J. Gen. Virol.*, 70:2799-2804.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., and Lipman D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215:403-410.

Ambros V., and Baltimore D. (1980) Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J. Biol. Chem.*, 255:6739–6744.

Andersson P., Edman K., and Lindberg A.M. (2002) Molecular analysis of the echovirus 18 prototype—Evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res.*, 85:71–83.

- Andino R., Rieckhof G.E., Trono D., and Baltimore D.** (1990) Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.*, 64:607-612.
- Arnold E., Luo M., Vriend G., Rossmann M.G., Palmenberg A.C., Parks G.D., Nicklin M.J., and Wimmer E.** (1987) Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:21-5.
- Arnold E., and Rossmann M.G.** (1990) Analysis of the structure of a common cold virus, human rhinovirus 14, refined at a resolution of 3.0 Å. *J. Mol. Biol.*, 211:763-801.
- Arola A., Santti J., Ruuskanen O., Halonen P., and Hyypia T.** (1996) Identification of enteroviruses in clinical specimens by competitive PCR followed by genetic typing using sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 34:313-318.
- Auvinen P., Stanway G., and Hyypia T.** (1989) Genetic diversity of enterovirus subgroups. *Arch. Virol.*, 104:175-186.
- Avellon A., Casas I., Trallero G., Perez C., Tenorio A., and Palacios G.** (2003) Molecular analysis of echovirus 13 isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 9:934-941.
- Barton D.J., Morasco B.J., and Flanagan J.B.** (1999) Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 73:10104-10112.
- Beck M.A., and Tracy S.M.** (1989) Murine cell-mediated immune response recognizes an enterovirus group-specific antigen(s). *J. Virol.*, 63(10):4148-4156.
- Beck M.A., and Tracy S.M.** (1990) Evidence for a group-specific enteroviral antigen(s) recognized by human T cells. *J. Clin. Microbiol.*, 28:1822-1827.
- Bell E.J., and McCartney R.A.** (1984) A study of Coxsackie B virus infections, 1972-1983. *J. Hyg. (Lond)*, 93:197-203.
- Bell E.J., McCartney R.A., Basquill D., and Chaudhuri A.K.** (1986) Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J. Med. Virol.*, 19:213-217.
- Belnap D.M., McDermott B.M., Filman D.J., Cheng N.Q., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., and Steven A.C.** (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:73-78.

- Bergelson J.M., Shepley M.P., Chan B.M., Hemler M.E., and Finberg R.W.** (1992) Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science*, 255:1718-1720.
- Bergelson J.M., Chan M., Solomon K.R., Stjohn N.F., Lin H.M., and Finberg R.W.** (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6245-6248.
- Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S., Horwitz M.S., Crowell R.L., and Finberg R.W.** (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275:1320-1332.
- Bhella D., Goodfellow I.G., Roversi P., Pettigrew D., Chaudhry Y., Evans D.J., and Lea S.M.** (2004) The structure of echovirus type 12 bound to a two-domain fragment of its cellular attachment protein decay-accelerating factor (CD55). *J Biol Chem*. 279:8325-32.
- Bienz K., Egger D., and Pfister T.** (1994) Characteristics of the poliovirus replication complex. *Arch. Virol. Suppl.*, 9:147-157.
- Blomquist S., Bruu A.L., Stenvik M., and Hovi T.** (2003) Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.*, 84:573-580.
- Blyn L.B., Swiderek K.M., Richards O., Stahl D.C., Semler B.L., and Ehrenfeld E.** (1996) Poly(rC) binding protein 2 binds to stem-loop IV of the poliovirus RNA 5' noncoding region: Identification by automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:11115-11120.
- Bienkowska-Szewczyk K., and Ehrenfeld E.** (1988) An internal 5'-noncoding region required for translation of poliovirus RNA in vitro. *J. Virol.*, 62:3068-3072.
- Boege U., Ko D.S., and Scraba D.G.** (1986) Toward an in vitro system for picornavirus assembly: Purification of mengovirus 14S capsid precursor particles. *J. Virol.*, 57:275-284.

- Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorichis T.** (2005) Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes*, 31:307-320.
- Borovjagin A.V., Evstafieva A.G., Ugarova T.Y.U., and Shatsky I.N.** (1990) A factor that specifically binds to the 5'-untranslated region of encephalomyocarditis virus RNA. *FEBS Lett.*, 261:237-240.
- Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., and Jacquemin-Sablon H.** (2003). Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the internal ribosome entry sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.*, 77:3353-3359.
- Brown B.A., Maher K., Oberste M.S., and Pallansch M.A.** (2003). Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the non-capsid coding region. *J. Virol.*, 77:8973–8984.
- Buckley B., and Ehrenfeld E.** (1987) The cap-binding protein complex in uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 262:13599–13606.
- Cammack N., Phillips A., Dunn G., Patel V., and Minor P.D.** (1988) Intertypic genomic rearrangements of poliovirus strains in vaccines. *Virology*, 167:507–514.
- Campanella M., de Jong A.S., Lanke K.W., Melchers W.J., Willems P.H., Pinton P., Rizzuto R., and van Kuppeveld F.J.** (2004) The coxsackievirus 2B protein suppresses apoptotic host cell responses by manipulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *J. Biol. Chem.*, 279:18440-18450.
- Cann A.J., Stanway G., Hughes P.J., Minor P.D., Evans D.M., Schild G.C., and Almond J.W.** (1984) Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *Nucleic Acids Res.*, 12:7787-7792.
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R.** (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 82:79–91.
- Carson S.D., Chapman N.N., and Tracy S.M.** (1997) Purification of the putative coxsackievirus B receptor from HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233:325-328.
- Casas I., Powell L., Klapper P.E., and Cleator G.M.** (1995) New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Methods.*, 53:25–36.

- Centers for Disease Control and Prevention.** (2002) Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus-Madagascar. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:662.
- Centers for Disease Control and Prevention.** (2004) Progress toward global eradication of poliomyelitis, January 2003-April 2004. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 51:532-535.
- Chan Y-F, and AbuBakar S.** (2004) Recombinant human enterovirus 71 in hand, foot and mouth disease patients. *Emerg. Infect. Dis.*, 10:1468–1470.
- Chapman N.M., Tracy S., Gauntt C.J., and Fortmueller U.** (1990) Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 28:843-850.
- Cherkasova E., Laassri M., and Chizhikov V.** (2003) Microarray analysis of evolution of RNA viruses:evidence of circulation of virulent highly divergent vaccinederived polioviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA*, 100:9398–9403.
- Chetverin A.B.** (1999) The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett.*, 22:460:1-5.
- Chevaliez S., Szendroi A., Caro V., Balanant J., Guillot S., Berencsi G., and Delpyroux F.** (2004) Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination. *Virology*, 325:56-70.
- Chonmaitree T., Ford C., Sanders C., and Lucia H.L.** (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 26:2576–2580.
- Chow M., Newman J.F., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J., and Brown F.** (1987) Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*, 327:482-486.
- Colunno R.J., Callahan P.L., Leippe D.M., Rueckert R.R., and Tomassini J.E.** (1989) Inhibition of rhinovirus attachment by neutralizing monoclonal antibodies and their Fab fragments. *J. Virol.*, 63:36-42.
- Colston E., and Racaniello V.R.** (1994) Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J.*, 13:5855–5862.

- Colston E.M., and Racaniello V.R.** (1995) Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J. Virol.*, 69:4823–4829.
- Committee on the Enteroviruses.** (1957) The enteroviruses. *Am. J. PublicHealth*, 47:1556–1566.
- Cooper P.D.** (1968) A genetic map of poliovirus temperature - sensitive mutants. *Virology*, 35:584–596.
- Cooper P.D., Geissler E., and Tannock G.A.** (1975) Attempts to extend the genetic map of poliovirus temperaturesensitive mutants. *J. Gen. Virol.*, 29:109–120.
- Cordingley M.G., Register R.B., Callahan P.L., Garsky V.M., and Colonno R.J.** (1989) Cleavage of small peptides in vitro by human rhinovirus 14 3C protease expressed in Escherichia coli. *J. Virol.*, 63:5037-5045.
- Costa-Mattioli M., Svitkin Y., and Sonenberg N.** (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol. Cell Biol.*, 24:6861-6870.
- Crowell R.L., and Landau B.J.** (1983) “Comprehensive Virology”. *Plenum Press, New York.*
- Cuconati A., Xiang W., Lahser F., Pfister T., and Wimmer E.** (1998) A protein linkage map of the P2 nonstructural proteins of poliovirus. *J. Virol.*, 72:1297–1307.
- Curry S., Abrams C.C., Fry E., Crowther J.C., Belsham G.J., Stuart D.I., and King A.M.** (1995) Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Virol.*, 69:430–438.
- Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., and Stuart D.** (1997) Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: The structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 71:9743–9752.
- Dagan R., Jenista J.A., Prather S.L., Powell K.R., and Menegus M.A.** (1985) Viremia in hospitalized children with enterovirus infections. *J. Pediatr.*, 106:397-401.
- Dahourou G., Guillot S., Le Gall O., and Crainic R.** (2002) Genetic recombination on wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.*, 38:3103–3110.

- Danes L., and Jaresova I.** (1985) Neutralization microtest with human coxsackievirus and echovirus serotypes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 29:399-408.
- Dasgupta A., Yalamanchili P., Clark M., Kliwer S., Fradkin L., Rubinstein S., Das S., Shen Y., Weidman M.K., Banerjee R., Datta U., Igo M., Kundu P., Barat B. and Berk A.J.** (2002) “*Molecular Biology of Picornaviruses*”. ASM Press, Washington, DC.
- De Jong A.S., Wessels E., Dijkman H.B., Galama J.M., Melchers W.J., Willems P.H., and van Kuppeveld F.J.** (2003) Determinants for membrane association and permeabilization of the coxsackievirus 2B protein and the identification of the Golgi complex as the target organelle. *J. Biol. Chem.*, 278:1012–1021.
- De Jong A.S., Melchers W.J., Glaudemans D.H., Willems P.H., and van Kuppeveld F.J.** (2004) Mutational Analysis of Different Regions in the Coxsackievirus 2B Protein: Requirements for Homo-multimerization, Membrane Permeabilization, Subcellular Localization, and Virus Replication. *J. Biol. Chem.*, 279:19924–19935.
- Del Angel R.M., Papavassilou A.G., Fernandez-Thomas C., Silverstein S.J., and Racaniello V.R.** (1989) Cell proteins bind to multiple sites within the 5' untranslated region of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:8299-8303.
- Das S., and Dasgupta A.** (1993) Identification of the cleavage site and determinants required for poliovirus 3CPro-catalyzed cleavage of human TATA-binding transcription factor TBP. *J. Virol.*, 67:3326-3331.
- Devaney M.A., Vakharia V.N., Lloyd R.E., Ehrenfeld E., and Grubman M.J.** (1988) Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of p220 component of the cap-binding complex. *J. Virol.*, 62:4407-4409.
- Diana G.D., and Pevear D.C.** (1997) Antipicornavirus drugs: Current status. *Antivir. Chem. Chemother.*, 8:401–408.
- DiMarchi R., Brooke G., Gale C., Cracknell V., Doel T., and Mowat N.** (1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 232:639-641.
- Doedens J.R. and Kirkegaard K.** (1995) Inhibition of protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J.*, 14:894–907.
- Domingo E., Martinez-Salas E., Sobrino F., de la Torre J.C., Portela A., Ortin J., Lopez-Galindez C., Perez-Brena P., Villanueva N., Najera R., van Depol S.,**

- Steinhauer D., DePolo N., and Holland J.** (1985) The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations:biological relevance-a review. *Gene*, 40:1-8.
- Drake J.W.** (1993) Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4171-5
- Drake J.W., and Holland J.J.** (1999) Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:13910-13913.
- Drebot M.A., Nguan C.Y., Campbell J.J., Lee S.H.S., and Forward K.R.** (1994) Molecular epidemiology of enterovirus outbreaks in Canada during 1991–1992: identification of echovirus 30 and coxsackievirus B1 strains by amplicon sequencing. *J. Med. Virol.*, 44:340–347.
- Duggal R., Cuconati A., Gromeier M., and Wimmer E.** (1997) Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13786–13791.
- Duggal R., and Wimmer E.** (1999) Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology*, 258:30–41.
- Duncan I.B.** (1968) Antibodies to echovirus type 30 in the Canadian population. *Can Med Assoc J.* 99: 786-90
- Earle J.A.P., Skuce R.A., Fleming C.S., Hoey E.M., and Martin S.J.** (1988) The complete nucleotide sequence of a bovine enterovirus. *J. Gen. Virol.*, 69:253-263.
- Efron, B.** (1979) Bootstrapping methods: Another look at the jackknife. *Ann. Stat.*7, 1-26.
- Egger D., Teterina N., Ehrenfeld E. and Bienz K.** (2000) Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production and viral RNA synthesis. *J. Virol.*, 74:6570-6580.
- Egger D., and Bienz K.** (2002) Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J. Virol.*, 76:10960–10971.

- Elices M.J. and Hemler M.E. (1989)** The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 86:9906-10.
- Ellard F.M., Drew J., Blakemore W.E., Stuart D.I., and King A.M. (1999)** Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J. Gen. Virol.*, 80:1911–1918.
- Evans D.M.A., Dunn G., Minor P.D., Schild G.C., Cann A.J., Stanway G., Almond J.W., Carrey K., and Maizel J.V. (1985)** Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature*, 314:548-550.
- Felsenstein, J. (1985)** Confidence intervals on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-91.
- Fenwick M.L., and Cooper P.D. (1962)** Early interactions between poliovirus and ERK cells: some observations on the nature and significance of the rejected particles *Virology*, 18:212-223.
- Ferguson M., Evans D.M., Magrath D.I., Minor P.D., Almond J.W., and Schild G.C. (1985)** Induction by synthetic peptides of broadly reactive, type- specific neutralizing antibody to poliovirus type 3. *Virology*, 143:505-515.
- Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J., Minor P.D., and Hogle J.M. (1989)** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.*, 8:1567-1579.
- Fricks, C. E., and Hogle, J. M. (1990)** Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.
- Furione M., Guillot S., Otelea D., Balanant J., Candrea A., and Crainic R. (1993)** Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology*, 196:199–208.
- Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., Kew O.M., and Agol V.I. (2000)** Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J. Virol.*, 74:7381-7390.

- Georgescu M.M., Delpeyroux F., and Crainic R.** (1995) Tripartite organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.*, 76:2343–2348.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.*, 38:4337–4342.
- Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., Vakalis N., and Vamvakopoulos N.C.** (2001) High sequence divergence in the 50 non-coding region of reference coxsackie B and ECHO viral strains and clinical isolates revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *Mol. Cell. Probes*, 15:317–327.
- Giachetti C., and Semler B.L.** (1990) “New aspects of positive-strand RNA viruses”. *ASM Press, Washington, DC*.
- Giachetti C., and Semler B.L.** (1991) Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J. Virol.*, 65:2647–2654.
- Giachetti C., Hwang S.S., and Semler B.L.** (1992) cis-Acting lesions targeted to the hydrophobic domain of a poliovirus membrane protein involved in RNA replication. *J. Virol.*, 66:6045–6057.
- Gmyl A.P., Belousov E.V., Maslova S.V., Khitrina E.V., Chetverin A.B., and Agol V.I.** (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J. Virol.*, 73:8958–8965.
- Goldwater P.N.** (1995) Immujkglobulin M capture immunoassay in investigation of coxsackievirus B5 and B6 Outbreaks in South Australia. *J. Clin. Microbiol.*, 3:1628–1631.
- Goodfellow I.G., Chaudhry Y., Richardson A., Meredith J., Almond J.W., Barclay W., and Evans D.J.** (2000a). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.*, 74:4590-4600.
- Goodfellow I.G., Powell R.M., Ward T., Spiller O.B., Almond J.W., and Evans D.J.** (2000b) Echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells is inhibited by antiserum to the complement control protein CD59. *J. Gen. Virol.*, 81:1393-1401.
- Goodfellow I.G., Sioofy A.B., Powell R.M., and Evans D.J.** (2001) Echoviruses bind heparan sulfate at the cell surface *J. Virol.*, 75:4918-492.

Greve J.M., Davis G., Meyer A.M., Forte C.P., Yost S.C., Marlor C.W., Kamarck M.E., and McClelland A. (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell*, 56:839–847.

Guillot S., Caro V., Cuervo N., Korotkova E., Combiescu M., Persu A., Aubert-Combiescu A., Delpeyroux F., and Crainic R. (2000) Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.*, 74:8434–8443.

Gulevich A.Y., Yusupova R.A., and Drygin Y.F. (2001) A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry (Mosc)*, 66:345-349.

Guttman N., and Baltimore D. (1977) A plasma membrane component able to bind and alter virions of poliovirus type 1: studies on cell-free alteration using a simplified assay. *Virology*, 82:25-36.

Halonen P., Rocha E., Hierholzer J., Holloway B., Hyypia T., Hurskainen P., and Pallansch M. (1995) Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 33:648-53.

Harber J., Bernhardt G., Lu H.H., Sgro J.Y., and Wimmer E. (1995) Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology*, 214:559–570.

He Y.N., Chipman P.R., Howitt, J., Bator C.M., Whitt M.A., Baker T.S., Kuhn R.J., Anderson C.W., Freimuth P., and Rossmann M.G. (2001) Interaction of coxsackievirus B3 with the full length coxsackievirus-adenovirus receptor *Nat. Struct. Biol.*, 8:874-878.

He Y.N., Mueller S., Chipman P.R., Bator C.M., Peng X.Z., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R. J., and Rossmann M.G. (2003) Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.*, 77:4827-4835.

Hellen C.U., Witherell G.W., Schmid M., Shin S.H., Pestova T.V., Gil A., and Wimmer E. (1993) A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7642–7646.

- Hendry E., Hatanaka H., Fry E., Smyth M., Tate J., Stanway G., Santti J., Maaronen M., Hyypia T., and Stuart D.** (1999) The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure*, 7:1527-1538.
- Henikoff S., and Henikoff J.G.** (1992) Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919.
- Herold J., and Andino R.** (2001) Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell*, 7:581-591.
- Hirst G.K.** (1962) Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27:303-309.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1985) Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*, 229:1358-1365.
- Hogle J.M., Chow M., and Filman D.J.** (1987) The structure of poliovirus. *Sci. Am.*, 256:42-49.
- Hughes P.J., North C., Minor P.D., and Stanway G.** (1989) The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. *J. Gen. Virol.*, 70:2943-2952.
- Hoover-Litty H., and Greve J.M.** (1993) Formation of rhinovirus-soluble ICAM-1 complexes and conformational changes in the virion. *J. Virol.*, 67:390-397.
- Hovanessian A.G., Puvion-Dutilleul F., Nisole S., Svab J., Perret E., Deng J.S., and Krust B.** (2000) The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp. Cell. Res.*, 261:312-28.
- Huttunen P., Santti J., Pulli T. and Hyypia T.** (1996) The major echovirus group is genetically coherent and related to coxsackie B viruses *J Gen Virol.*, 77: 715-25
- Hynes RO.** (1987) Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 48:549-54.
- Hyypia T., Auvinen P., and Maaronen M.** (1989) Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 70:3261-3268.
- Hyypia T., and Stanway G.** (1993) Biology of coxsackie A viruses. *Adv. Virus Res.*, 42:343-373.
- Iizuka N., Kohara M., Hagino-Yamagishi K., Abe S., Komatsu T., Tago K., Arita M., and Nomoto A.** (1989) Construction of less neurovirulent polioviruses by

introducing deletions into the 5' noncoding sequence of the genome. *J. Virol.*, 63:5354-5363.

Inoue T., Suzuki T., and Sekiguchi K. (1989) The complete nucleotide sequence of swine vesicular disease virus. *J. Gen. Virol.*, 70:919-934.

Jacobson M.F., and Baltimore D. (1968) Morphogenesis of poliovirus. I. Association of the viral RNA with coat protein. *J. Mol. Biol.*, 3:369-378.

Jarvis T.C., and Kirkegaard K. (1992) Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.*, 11:3135-3145.

Jimenez-Clavero M.A., Ley V., Fita I., and Verdager N. (2003) Crystallization and preliminary X-ray analysis of swine vesicular disease virus (SVDV). *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 59:541-543.

Joki-Korpela P., and Hyypia T. (2001) Parechoviruses, a novel group of human picornaviruses. *Ann. Med.*, 33:466-471.

Kapsenberg J.G., Ras A., and Korte J. (1980) Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology*, 12:329-334.

Karnauchow T.M., Tolson D.L., Harrison B.A., Altman E., Lublin D.M., and Dimock K. (1996) The HeLa cell receptor for enterovirus 70 is decay-accelerating factor (CD55). *J. Virol.*, 70:5143-5152.

Kauder S.E., and Racaniello V.R. (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.*, 113:1743-1753.

Kawamura N., Kohara M., Abe S., Komatsu T., Tago K., Arita M., and Nomoto A. (1989) Determinants in the 5' noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J. Virol.*, 63:1302-1309.

Kew O.M., and Nottay B.K. (1984) "Modern Approaches to Vaccines". *Cold Spring Harbor Press, New York.*

Kew O.M., and Pallansch M.A. (2002). "Molecular biology of picornaviruses". *ASM Press, Washington, DC.*

- Kim, G.R., Lee J.S., Jung Y.T., Chung Y.J., and Rhyu M.G.** (1997) Nucleotide sequencing of a part of the 59-noncoding region of echovirus type 9 and rapid detection during the acute phase of aseptic meningitis. *Arch. Virol.*, 142:853–860.
- Kimura M.** (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111–120.
- King A.M.Q.** (1988) Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: an analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Res.*, 16:11705–11723.
- King AMQ., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypiä T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg, A.C., Skern T., and Stanway G.** (2000) “Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses”. *Academic Press, San Diego, New York.*
- Kirkegaard K., and Baltimore D.** (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*, 47:433–443.
- Kitamura N., Semler B.L., Rothberg P.G., Larsen G.R., Adler C.J., Dorner A.J., Emini E.A., Hanecak R., Lee J.J., van der Werf S., Anderson C.W., and Wimmer E.** (1981) Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291:547-553.
- Kolatkhar P.R., Bella J., Olson N.H., Bator C.M., Baker T.S., and Rossmann M.G.** (1999) Structural studies of two rhinovirus serotypes complexed with fragments of their cellular receptor. *EMBO J.* 18:6249-6259.
- Kottaridi C., Bolanaki E. and Markoulatos P.**(2004) Amplification of Echoviruses genomic regions by different RT-PCR protocols--a comparative study. *Mol Cell Probes.* 18:263-9.
- Kottaridi C., Bolanaki E., Siafakas N. and Markoulatos P.** (2005) Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 53:113-9.
- Kottaridi C., Bolanaki E., Mamuris Z., Stathopoulos C., and Markoulatos P.** (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.*, 151:1117-1132.

- Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A. and Markoulatos P.** (2007) Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 58:407-12.
- Kopecka H., Brown B., and Pallansch M.** (1995) Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res.*, 38:125–136.
- Kozak M.** (1989) The scanning model for translation:an update. *J. Cell. Biol.*, 108:229-241.
- Krausslich H.G., Nicklin M.J., Toyoda H., Etchison D., and Wimmer E.** (1987) Poliovirus proteinase 2A induces cleavage of eucaryotic initiation factor 4F polypeptide p220. *J. Virol.*, 61:2711-2718.
- Kuge S., and Nomoto A.** (1987) Construction of viable deletion and insertion mutants of the Sabin strain of type 1 poliovirus:function of the 5' noncoding sequence in viral replication. *J. Virol.*, 61:1478-1487.
- Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B., Nei M.** (2001) MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 17:1244-5.
- Lamphear B.J., Kirchweger R., Skern T., Rhoads R.E.** (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* 270:21975-21983.
- Langford M.P., Kadi R.M., Ganley J.P., and Yin-Murphy M.** (1988) Inhibition of epidemic isolates of coxsackievirus type A 24 by recombinant and natural interferon alpha and interferon beta. *Intervirology*, 29:320–327.
- Lau R.C.** (1983) Coxsackie B virus infections in New Zealand patients with cardiac and non-cardiac diseases. *J. Med. Virol.*, 11:131-137.
- Ledinko N.** (1963) Genetic recombination with poliovirus type 1 Studies of crosses between a normal horse serum resistant mutant and several guanidine- resistant mutants of the same strain. *Virology*, 20:107–119

- Lee C.K., and Wimmer E.** (1988) Proteolytic processing of poliovirus polyprotein:elimination of 2A^{PRO} mediated alternative cleavage of polypeptide 3CD by in vitro mutagenesis. *Virology*, 166:405-414
- Lewis J.K., Bothner B., Smith T.J., and Siuzdak G.** (1998) Antiviral agent blocks breathing of the common cold virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:6774–6778.
- Lin T.A., Kong X., Haystead T.A., Pause A., Besham G., Sonenberg N and Lawrence J.C.Jr.** (1994) PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science*, 266:653–656.
- Liao S., and Racaniello V.** (1997) Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J. Virol.*, 71:9770–9777.
- Lin W., Zhao Q., Bartlam M., Ding Y., Li D., Chen Y., Bao H., Xie Q., and Rao Z.** (2002) Purification, crystallization and X-ray analysis of swine vesicular disease virus. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 58:1056-1058.
- Lindberg A.M., Andersson P., Savolainen C., Mulders M.N., and Hovi T.** (2003) Evolution of the genome of Human enterovirus B:incongruence between phylogenies of the VP1 and 3CD regions indicates frequent recombination within the species. *J. Gen. Virol.*, 84:1223– 1235.
- Lipskaya G.Y., Muzychenko A.R., Kutitova OK., Maslova S.V., Equestre M., Drozdov S.G., Perez Bercoff R., and Agol V.I.** (1991) Frequent isolation of intertypic poliovirus recombinants with serotype 2 specificity from vaccine-associated polio cases. *J. Med. Virol.*, 35:290–296.
- Liu H.M., Zheng D.P., Zhang L.B., Oberste M.S., Kew O.M., and Pallansch M.A.** (2003) Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J. Virol.*, 77:10994–11005.
- Lloyd R.E., Grubman M.J., and Ehrenfeld E.** (1988) Relationship of p220 cleavage during picornavirus infection to 2A proteinase sequencing. *J. Virol.*, 62:4216-4223.
- Lole K.S., Bollinger R.C., Paranjape R.S., Gadkari D., Kulkarni S.S., Novak N.G., Ingersoll R., Sheppard H.W., and Ray S.C.** (1999) Full length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.*, 73:152–160.

- Lomax N.B., and Yin F.H.** (1989) Evidence for the role of the P2 protein of human rhinovirus in its host range change. *J. Virol.*, 63:2396-2399.
- Lublin D.M., and Atkinson J.P.** (1989) Decay accelerating factor: biochemistry, molecular biology and function. *Annu. Rev. Immunol.*, 7:35-58.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J.** (2003a) Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.*, 77:10423-10431.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., Karganova G.G., Reznik V.I., and Hinkkanen A.E.** (2003b) Molecular epidemiology of enteroviruses causing uveitis and multisystem hemorrhagic disease of infants. *Virology*, 307:45-53.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Koroleva G.A., Ilonen J., and Hinkkanen A.E.** (2004) Recombination in uveitis-causing enterovirus strains. *J. Gen. Virol.*, 85:463-470.
- Lukashev A.N.** (2005a) Role of recombination in evolution of enteroviruses. *Rev. Med. Virol.*, 15:157-167.
- Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., and Ilonen J.** (2005b) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.*, 86:3281-3290.
- Macadam A.J., Arnold C., Howlett J., John A., Marsden S., Taffs F., Reeve P., Hamada N., Wareham K., and Almond J.** (1989) Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology*, 172:408-414.
- Magnius L.O., Saleh L.H., Vikerfors T., and Norder H.** (1988) A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J. Virol. Methods*, 20:73-82.
- Manjunath N., Balaya S., and Seth P.** (1982) Serologic survey for neutralizing antibodies against group B coxsackieviruses in normal population in Delhi area. *Indian J. Med. Res.*, 76:656-661.
- Mateu M.G.** (1995) Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res.*, 38:1-24.
- Melnick J.L., Rennick V., Hampil B., Schmidt N.J., and Ho H.H.** (1973) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test

procedures for the identification of field strains of 42 enteroviruses. *Bull World Health Organ.*, 48:263-268.

Melnick J.L., Schmidt N.J., Hampil B., and Ho H.H. (1977) Lyophilized combination pools of enterovirus equine antisera: preparation and test procedures for the identification of field strains of 19 group A coxsackievirus serotypes. *Intervirology*, 8:172-181.

Melnick J.L. (1996) "Fields Virology". 3rd Ed., PA:Lippincott/Raven, Philadelphia.

Melnick J.L. (1997). "Viral infections in humans: epidemiology and control". *Plenum Medical Book, New York*.

Mendelsohn C.L., Wimmer E., and Racaniello V.R. (1989) Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:855-865.

Merz A.J., and Wickner W.T. (2004) Trans-SNARE interactions elicit Ca²⁺ efflux from the yeast vacuole lumen. *J. Cell. Biol.*, 164:195-206.

Minor P.D., Schild G.C., Bootman J., Evans D.M., Ferguson M., Reeve P., Spitz M., Stanway G., Cann A.J., Hauptmann R., Clarke L.D., Mountford R.C., and Almond J.W. (1983) Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. *Nature*, 301:674-679.

Minor P.D., Pipkin P.A., Hockley D., Schild G.C., and Almond J.W. (1984) Monoclonal antibodies which block cellular receptors of poliovirus. *Virus Res.*, 1:203-212.

Minor P.D., John A., Ferguson M., and Icenogle J.P. (1986b) Antigenic and molecular evolution of the vaccine strain of type 3 poliovirus during the period of excretion by a primary vaccinee. *J. Gen. Virol.*, 67:693-706.

Moore M. (1982) Centers for Disease Control. Enteroviral disease in the United States, 1970-1979. *J. Infect. Dis.*, 146:103-108.

Morag A., Margalith M., Shuval H.I., and Fattal B. (1984) Acquisition of antibodies to various Coxsackie and Echo viruses and hepatitis A virus in agricultural communal settlements in Israel. *J. Med. Virol.*, 14:39-47.

- Morasco B.J., Sharma N., Parilla J., and Flanagan J.B.** (2003) Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.*, 77:5136-5144.
- Morens D.M., and Pallansch M.A.** (1995) "Human Enterovirus Infections". *ASM Press, Washington, D.C.*
- Morens D.M., Zweighaft R.M., and Bryan J.M.** (1979) Non-polio enterovirus disease in the United States, 1971-1975. *Int. J. Epidemiol.*, 8:49-54.
- Muckelbauer J.K., Kremer M., Minor I., Diana G., Dutko F.J., Groarke J., Pevear D.C., and Rossmann M.G.** (1995) The structure of coxsackievirus B3 at 3.5 Å resolution. *Structure*, 3:653-667.
- Muir P., and van Loon A.M.** (1997) Enterovirus infections of the central nervous system. *Intervirology*, 40:153-166.
- Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry, T., and Weissbrich, B.** (1998) Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:202-227.
- Mukundan P., and John T.J.** (1983) Prevalence and titres of neutralising antibodies to group B coxsackieviruses. *Indian J. Med. Res.*, 77:577-589.
- Mullins J.A., Khetsuriani N., Nix W.A., Oberste M.S., LaMonte A., Kilpatrick D.R., Dunn J., Langer J., McMinn P., Huang Q.S., Grimwood K., Huang C., and Pallansch M.A.** (2004) Emergence of echovirus type 13 as a prominent enterovirus. *Clin. Infect. Dis.*, 38:70-77.
- Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J.** (2001) Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA*, 7:1126-1141.
- Nobis P., Zibirre R., Meyer G., Kuhne J., Warnecke G., and Koch G.** (1985) Production of a monoclonal antibody against an epitope on HeLa cells that is the functional poliovirus binding site. *J. Gen. Virol.*, 66:2563-2569.
- Norder H., Bjerregaard L., and Magnius L.O.** (2001) Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing, *J. Med. Virol.*, 63:35-44.

- Norder H., Bjerregaard L., and Magnius L.O.** (2002) Open reading frame sequence of an Asian enterovirus 73 strain reveals that the prototype from California is recombinant. *J. Gen. Virol.*, 83:1721–1728.
- Novak J.E., and Kirkegaard K.** (1991) Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.*, 65:3384–3387.
- Nowak-Wegrzyn A., Phipatanakul W., Winkelstein J.A., Forman M.S., and Lederman H.M.** (2001) Successful treatment of enterovirus infection with the use of pleconaril in 2 infants with severe combined immunodeficiency. *Clin. Infect. Dis.*, 32:13–14.
- Nugent C.I., and Kirkegaard K.** (1995) RNA binding properties of poliovirus subviral particles. *J. Virol.*, 69:13–22.
- Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A.** (1998a) Specific detection of echoviruses 22 and 23 in cell culture supernatants by RT-PCR. *J. Med. Virol.*, 58:178–181.
- Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A.** (1998b) Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 59 end of the region encoding VP2. *Virus Res.*, 58:35–43.
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., and Pallansch M.A.** (1999a) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.*, 73:1941–1948.
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Brown B.A., and Pallansch M.A.** (1999b) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1288–1293.
- Oberste M.S., Maher K., Kennett M.L., Campbell J.J., Carpenter M.S., Schnurr D., and Pallansch M.A.** (1999c) Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J. Clin. Microbiol.*, 37:3928–3933.
- Oberste M.S., Maher K., Flemister M.R., Marchetti G., Kilpatrick D.R., and Pallansch M.A.** (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 38:1170–1174.

- Oberste M.S., Schnurr D., Maher K., Al-Busaidy S., and Pallansch M.A.** (2001) Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J. Gen. Virol.*, 82:409–416.
- Oberste M.S., Nix W.A., Maher K., and Pallansch M.A.** (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J. Clin. Virol.* 26:375–377.
- Oberste M.S., Michele S.M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Uddin M., Norder H., Lau C.S., Chomel J.J., Magnius L., and Pallansch M.A.** (2004a) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV 75. *J. Gen. Virol.*, 85:3205-3212.
- Oberste M.S., Penaranda S., and Pallansch M.A.** (2004b) RNA Recombination Plays a Major Role in Genomic Change during Circulation of Coxsackie B Viruses. *J. Virol.*, 78:2948-2955.
- Oberste M.S., Maher K., and Pallansch M.A.** (2004c) Evidence for frequent recombination within species Human Enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.*, 78:855–867.
- Oprisan G., Combiescu M., Guillot S., Caro V., Combiescu A., Delpyroux F., and Crainic R.** (2002) Natural genetic recombination between cocirculating heterotypic enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 83:2193– 2200.
- Palacios G., Casas I., Cisterna D., Trallero G., Tenorio A., and Freire C.** (2002) Molecular epidemiology of echovirus 30:temporal circulation and prevalence of single lineages. *J. Virol.*, 76:4940– 4949.
- Palacios G. and Oberste M.S.** (2005) Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol.* 11:424-33 Review.
- Pallansch M.A.** (2000). “Hunter’s Topical Medicine”. *W.B. Saunders, Strickland G.T., Philadelphia.*
- Pallansch M.A.** (2003). “Infectious Diseases”. *Williams and Wilkins, Lippincot, Philadelphia.*
- Palmenberg A.C.** (1982) In vitro synthesis and assembly of picornaviral capsid intermediate structures. *J. Virol.*, 44:900–906.

- Palmenberg A.C.** (1987) “Positive strand RNA viruses. UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology. New Series”. *vol. 54, Alan R. Liss, New York.*
- Palmenberg A.C.** (1989). “Molecular Aspects of Picornavirus Infection and Detection”. *American Society for Microbiology, Washington, D.C.*
- Parsley T.B., Towner J.S., Blyn L.B., Ehrenfeld E., and Semler B.L.** (1997) Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5′-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA, 3:1124–1134.*
- Pasch A., Kupper J.H., Wolde A., Kandolf R., and Selinka H.C.** (1999) Comparative analysis of virus-host cell interactions of haemagglutinating and non-haemagglutinating strains of coxsackievirus B3. *J. Gen. Virol., 80:3153-3158.*
- Paul A.V., van Boom J.H., Filipov D. and Wimmer E.** (1998) Protein primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature, 393:280-284.*
- Pause A., Belsham G.J., Gingras A.C., Donze O., Lin T.A., Lawrence J.C.Jr., Sonenberg N.** (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5′-cap function. *Nature, 371:762–767.*
- Pelletier J., Kaplan G., Racaniello V.R., and Sonenberg N.** (1988a) Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5′ noncoding region. *Mol. Cell. Biol., 8:1103-1112.*
- Pelletier J., Kaplan G., Racaniello V.R., and Sonenberg N.** (1988b) Translational efficiency of poliovirus mRNA: mapping inhibitory cis-acting elements within the 5′ noncoding region. *J. Virol., 62:2219-2227.*
- Perez L. and Carrasco L.** (1993) Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J Virol., 67:4543–4548.*
- Petersen J.F., Cherney M.M., Liebig H.D., Skern T., Kuechler E., and James M.N.** (1999) The structure of the 2A proteinase from a common cold virus: A proteinase responsible for the shut-off of host-cell protein synthesis. *EMBO J., 18:5463–5475.*
- Pilipenko E.V., Blinov V.M., Romanova L.I., Sinyakov A.N., Maslova S.V., and Agol V.I.** (1989) Conserved structural domains in the 5′-untranslated region of picornaviral genomes: an analysis of the segment controlling translation and neurovirulence. *Virology, 168:201-209.*

- Pollard S.R., Dunn G., Cammack N., Minor P.D., and Almond J.W.** (1989) Nucleotide sequence of a neurovirulent variant of the type 2 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.*, 63:4949-4951.
- Pöyry T., Kinnunen L., Hyypia T., Brown B., Horsnell C., Hovi T., and Stanway G.** (1996) Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J. Gen. Virol.*, 77:1699-1717.
- Pulli T., Koskimies P., and Hyypia T.** (1995) Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes. *Virology*, 212:30-38.
- Racaniello V.R., and Baltimore D.** (1981) Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 78:4887-4891.
- Ratka M., Lackmann M., Ueckermann C., Karlins U., and Koch G.** (1989) Poliovirus-associated protein kinase:destabilization of the virus capsid and stimulation of the phosphorylation reaction by Zn²⁺. *J. Virol.*, 63:3954-3960.
- Read S.J., and Kurtz J.B.** (1999) Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J. Clin. Microbiol.*, 37:1352-1355.
- Rico-Hesse R., Pallansch M.A., Nottay B.K., and Kew O.M.** (1987) Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*, 160:311-322.
- Rivera V.M., Welsh J.D., and Maizel J.V.** (1988) Comparative sequence analysis of the 5' noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology*, 165:42-50.
- Roivainen M., Hyypia T., Piirainen L., Kalkkinen N., Stanway G. and Hovi T.** (1991) RGD-dependent entry of coxsackievirus A9 into host cells and its bypass after cleavage of VP1 protein by intestinal proteases. *J Virol.*, 65:4735-40.
- Romanova L.I., Tolskaya E.A., Kolesnikova M.S., and Agol V.I.** (1980) Biochemical evidence for intertypic genetic recombination of polioviruses. *FEBS Lett.*, 118:109-112.
- Romanova L.I., Blinov V.M., Tolskaya E.A., Viktorova E.G., Kolesnikova M.S., Guseva E.A., and Agol V.I.** (1986) The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants:a model of recombination between RNA genomes. *Virology*, 155:202-213.

- Rombaut B., Vrijzen R., and Boeye A.** (1990) New evidence for the precursor role of 14 S subunits in poliovirus morphogenesis. *Virology*, 177:411–414.
- Rohll J.B., Moon D.H., Evans D.J., and Almond J.W.** (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J. Virol.*, 69:7835-7844.
- Romero J.R.** (1999) Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123:1161-1169.
- Rossmann M.G., Arnold E., Erickson J.W., Frankenberger E.A., Griffith J.P., Hecht H.J., Johnson J.E., Kamer G., Luo M., and Mosser A.G.** (1985) Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. *Nature*, 317:145-153.
- Rossmann M.G., and Palmenberg A.C.** (1988) Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology*, 164:373-382.
- Rossmann M.G.** (1989) The canyon hypothesis: Hiding the host cell receptor attachment site on a viral surface from immune surveillance. *J. Biol. Chem.* 264:14587–14590.
- Rotbart H.A.** (1990) Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 28:438-442.
- Rotbart H.A., and Kirkegaard K.** (1992) “Seminars in VIROLOGY”. *ASM Press, Washington, DC.*
- Rotbart H.A.** (1995) “Human Enterovirus Infections”. *ASM Press, Washington, DC.*
- Rotbart H.A., Brennan P.J., Fife K.H., Romero J.R., Griffin J.A., McKinlay M.A., and Hayden F.G.** (1998a) Enterovirus meningitis in adults. *Clin. Infect. Dis.*, 27:896–898.
- Ruoslahti E., and Pierschbacher M.D.** (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*, 238:491-497.
- Rueckert R.R.** (1985) “Virology”. *BN Fields, Raven press, New York, USA.*
- Ruiz-Jarabo C.M., Arias A., Baranowski E., Escarmis C., Domingo E.** (2000) Memory in viral quasispecies. *J. Virol.*, 74:3543-3547.

- Saitou N., and Nei M.** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.
- Santti J., Hyypia T., Kinnunen L., and Salminen M.** (1999) Evidence of recombination among enteroviruses. *J. Virol.*, 73:8741-8749.
- Santti J., Harvala H., Kinnunen L., and Hyypia T.** (2000) Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J. Gen. Virol.*, 81:1-12.
- Santhanam S., and Choudhury D.S.** (1984) Antibodies against coxsackie B2 virus in infants and children in Delhi. *J. Commun. Dis.*, 16(4):304-306.
- Savolainen C., Hovi T., and Mulders M.N.** (2001) Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major genotype. *Arch. Virol.*, 146:521-537.
- Schiff G.M., Sherwood J.R., Young E.C., and Mason L.J.** (1992) Prophylactic efficacy of WIN 54954 in prevention of experimental human coxsackievirus A21 infection and illness. *Antiviral Res.*, 17:92.
- Schiff G.M., and Sherwood J.R.** (2000) Clinical activity of pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A 21 respiratory infection. *J. Infect. Dis.*, 181:20-26.
- Selinka H.C., Wolde A., Sauter M., Kandolf R., and Klingel K.** (2004) Virus-receptor interactions of coxsackie B viruses and their putative influence on cardiotropism. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*, 193:127-131.
- Shafren D.R., Dorahy D.J., Ingham R.A., Burns G.F., and Barry RD.** (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J. Virol.*, 71:4736-4743.
- Shen Y., Igo M., Yalamanchili P., Berk A.J., and Dasgupta A.** (1996) DNA binding domain and subunit interactions of transcription factor IIIC revealed by dissection with poliovirus 3C protease. *Mol. Cell. Biol.*, 16:4163-4171.
- Sherry B., Mosser A.G., Colonno R.J., and Rueckert R.R.** (1986) Use of monoclonal antibodies to identify four neutralization immunogens on a common cold picornavirus, human rhinovirus 14. *J. Virol.*, 57:246-257.

- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., and Spyrou N.** (2000) Isolation of Polioviruses and Other Enteroviruses in South Greece Between 1994 and 1998. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:157-163.
- Siafakas N., Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Stanway G.** (2001) Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 15:87-95.
- Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., and Kourea-Kremastinou J.** (2002a) A reliable RT-PCR/RFLP assay for the molecular classification of enterovirus reference and wild type strains to either of the two genetic clusters on the basis of 5'-UTR. *Mol. Cell. Probes.*, 16:209-216.
- Siafakas N., Markoulatos P., and Stanway G.** (2002b) Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J. Mol. Evol.*, 55:638-652.
- Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., and Kourea-Kremastinou J.** (2003). Molecular subgrouping of Enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.*, 17:113-123.
- Sergiescu D., Horodniceanu F., Klein R., and Crainic R.** (1966) Genetic transfer of guanidine resistance from type 2 to type 1 poliovirus. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 18:231-243.
- Skinner M.A., Racaniello V.R., Dunn G., Cooper J., Minor P.D., and Almond J.W.** (1989) New model for the secondary structure of the 5' non-coding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data that also show that RNA secondary structure is important in neurovirulence. *J. Mol. Biol.*, 207:379-392.
- Smith T.J., Kremer M.J., Luo M., Vriend G., Arnold E., Kamer G., Rossmann M.G., McKinlay M.A., Diana G.D., and Otto M.J.** (1986) The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. *Science*, 233:1286-1293.
- Smith T.J., Chase E.S., Schmidt T.J., Olson N.H. and Baker T.S.** (1996) Neutralizing antibody to human rhinovirus 14 penetrates the receptor-binding canyon. *Nature*, 383:350-354.

- Sommergruber W., Casari G., Fessl F., Seipelt J., and Skern T.** (1994) The 2A proteinase of human rhinovirus is a zinc containing enzyme. *Virology*, 204:815–818.
- Sonenberg N., and Pelletier J.** (1989) Poliovirus translation: a paradigm for a novel initiation mechanism. *Bioessays*, 1:128-132
- Spiller O.B., Goodfellow I.G., Evans D.J., Hinchliffe S.J., and Morgan B.P.** (2002) Coxsackie B viruses that use human DAF as a receptor infect pig cells via pig CAR and do not use pig DAF. *J. Gen. Virol.*, 83:45-52.
- Springer T.A.** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346:425-434.
- Stanway G., Cann A.J., Hauptmann R., Hughes P., Clarke L.D., Mountford R.C., Minor P.D., Schild G.C., and Almond J.W.** (1983) The nucleotide sequence of poliovirus type 3 leon 12 a1b: comparison with poliovirus type 1. *Nucleic Acids Res.*, 11:5629-5643.
- Stanway G., Hughes P.J., Mountford R.C., Minor P.D., and Almond J.W.** (1984) The complete nucleotide sequence of a common cold virus: human rhinovirus 14. *Nucleic Acids Res.*, 12:7859-7815.
- Stanway G.** (1990) Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*, 71:2483-2501.
- Staunton D.E., Merluzzi V.J., Rothlein R., Barton R., Marlin S.D., and Springer T.A.** (1989) A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell*, 56:849–853.
- Staunton D.E., Dustin M.L., Erickson H.P., Springer T.A.** (1990) The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, 61:243-254.
- Strikas R.A., Anderson L.J., Parker R.A.** (1986) Temporal and geographic patterns of isolates of nonpolio enterovirus in the United States, 1970-1983. *J. Infect. Dis.*, 153:346-351.
- Svitkin Y.V., Maslova S.V., and Agol V.I.** (1985) The genomes of attenuated and virulent poliovirus strains differ in their in vitro translation efficiencies. *Virology*, 147:243-252.

- Swofford C.D., Kasckow J.W., and Scheller-Gilkey G.** (1996) Inderbitzin LB. Substance use: a powerful predictor of relapse in schizophrenia. *Schizophr. Res.*, 20:145-151.
- Tang R.S., Barton D.J., Flanagan J.B., and Kirkegaard K.** (1997) Poliovirus RNA recombination in cell-free extracts. *RNA*, 3:624-633.
- Thoelen I., Lemey P., van der Donck I., Beuselinck I., Lindberg A.M., and van Ranst M.** (2003) Molecular typing and epidemiology of enteroviruses identified from an outbreak of aseptic meningitis in Belgium during the summer of 2000. *J. Med. Virol.*, 70:420-429.
- Thoelen I., Moës E., Lemey P., Mostmans S., Wollants E., Lindberg A.M., Vandamme A., and van Ranst M.** (2004) Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human Enterovirus B species. *J. Clin. Microbiol.*, 42:963-971.
- Tobin G.J., Young D.C., and Flanagan J.B.** (1989) Self-catalyzed linkage of poliovirus terminal protein VPg to poliovirus RNA. *Cell*, 59:511-519.
- Tolskaya E.A., Romanova L.A., Kolesnikova M.S., and Agol V.I.** (1983) Intertypic recombination in poliovirus: genetic and biochemical studies. *Virology*, 124:121-132.
- Tolskaya E.A., Romanova L.I., Blinov V.M., Viktorova E.G., Sinyakov A.N., Kolesnikova M.S., and Agol VI.** (1987) Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: the primary structure and non-random distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. *Virology*, 161:54-61.
- Tolskaya E.A., Romanova I.I., Kolesnikova M.S., Ivannikova T.A., Smirnova E.A., Raikhlin N.T., and Agol V.I.** (1995) Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J. Virol.*, 69:1181-1189.
- Tomassini J.E., Graham D., DeWitt C.M., Lineberger D.W., Rodkey J.A., Colonna R.J.** (1989) cDNA cloning reveals that the major group rhinovirus receptor on HeLa cells is intercellular adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:4907-4911.
- Tomko R.P., Xu R., Philipson L.** (1997) HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:3352-3356

- Torgersen H., Skern T., and Blaas D.** (1989) Typing of human rhinoviruses based on sequence variations in the 5' non-coding region. *J. Gen. Virol.*, 70:3111-3116.
- Tosteson M.T., and Chow M.** (1997) Characterization of the ion channels formed by poliovirus in planar lipid membranes. *J. Virol.*, 71:507-511.
- Towner J.S., Ho T.V., and Semler B.L.** (1996) Determinants of membrane association for poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.*, 271:26810-16818.
- Toyoda H., Nicklin M.J.M., Murray M.T., Anderson C.W., Dunn J.J, Suder F.W., and Wimmer E.** (1986) A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*, 45:761-770.
- Trallero G., Casas I., Tenorio A., Echevarria J.E., Castellanos A., Lozano A., and Brena P.P.** (2000) Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). *Epidemiol. Infect.*, 124:497-506.
- Trono D., Andino R., and Baltimore D.** (1988) An RNA sequence of hundreds of nucleotides at the 5' end of poliovirus RNA is involved in allowing viral protein synthesis. *J. Virol.*, 62:2291-2299.
- Van Kuppeveld F.J., Galama J.M., Zoll J., van den Hurk P.J, and Melchers W.J.** (1996) Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. *J. Virol.*, 70:3876-3886.
- Van Kuppeveld F.J., Hoenderop J.G., Smeets R.L., Willems P.H., Dijkman H.B., Galama J.M., and Melchers W.J.** (1997) Coxsackievirus protein 2B modifies endoplasmic reticulum membrane and plasma membrane permeability and facilitates virus release. *EMBO J.*, 16:3519-3532.
- Van Kuppeveld F.J., Melchers W.J., Willems P.H., and Gadella T.W.J.** (2002) Homomultimerization of the coxsackievirus 2B protein in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J. Virol.*, 76:9446-9456.
- Van Vlijmen H.W., Curry S., Schaefer M., and Karplus M.** (1998) Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol.*, 275:295-308.
- Voss T., Meyer R., and Sommergruber W.** (1995) Spectroscopic characterization of rhinoviral protease 2A:Zn is essential for the structural integrity. *Protein Sci.*, 4:2526-2531.

- Wang X., and Bergelson J.M.** (1999) Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J. Virol.*, 3:2559-2562.
- Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., and Almond J.W.** (1998) Role for beta2- microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. *J. Virol.*, 72:5360–5365.
- Weidman M.K., Yalamanchili P., Tsai B.N.W. and Dasgupta A.** (2001) Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology*, 291:260–271.
- Weidman M.K., Sharma R., Raychaudhuri S., Kundu P., Tsai W., and Dasgupta A.** (2003) The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res.*, 95:75-85.
- Westrop G.D., Wareham K.A., Evans D.M., Dunn G., Minor P.D., Magrath D.I., Taffs F., Marsden S., Skinner M.A., Schild G.C., and Almond J.W.** (1989) Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.*, 63:1338-1344.
- Wenner H.A., Harmon P., Behbehani A.M., Rouhandeh H. and Kamitsuka P.S.** (1967) The antigenic heterogeneity of type 30 echoviruses. *Am J Epidemiol.*, 85: 240-9.
- White J.M., and Littman D.R.** (1989) Viral receptors of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, 56:725-728.
- Witwer C., Rauscher S., Hofacker I.L., and Stadler P.F.** (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acids Res.*, 29:5079-5089.
- World Health Organization.** (1996) “Polio lab network”, vol.2.
- Xiao C., Bator-Kelly C.M., Bowman V.D., Rieder E., He Y.N., Hebert B., Bella J., Baker T.S., Wimmer E., Kuhn R.J., and Rossmann M.G.** (2001) Interaction of coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1. *J. Virol.*, 75:2444-2451.
- Xiao C., Bator C.M., Rieder E., Chipman P.R., Craig A., Kuhn R.J., Wimmer E., and Rossmann M.G.** (2005) The crystal structure of coxsackievirus A21 and its interaction with ICAM-1. *Structure*, 13:1019-1033.

- Yalamanchili P., Harris K., Wimmer E. and Dasgupta A.** (1996) Inhibition of basal transcription by poliovirus:a virus-encoded protease (3C^{pro}) inhibits formation of TBP–TATA box complex in vitro. *J. Virol.*, 70:2922–2929.
- Yalamanchili P., Banerjee R. and Dasgupta A.** (1997a) Poliovirus-encoded protease 2A^{pro} cleaves the TATA-binding protein but does not inhibit host cell RNA polymerase II transcription in vitro. *J. Virol.*, 71:6881–6886.
- Yalamanchili P., Datta U. and Dasgupta A.** (1997b) Inhibition of host cell transcription by poliovirus:cleavage of transcription factor CREB by poliovirus-encoded protease 3C^{pro}. *J. Virol.*, 71:1220–1226.
- Yamashita K., Miyamura K., Yamadera S., Kato N., Akatsuka M., Inouye S., and Yamazaki S.** (1992) Enteroviral aseptic meningitis in Japan, 1981-1991. A report of the National Epidemiological Surveillance of Infectious Agents in Japan. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 45:151-161.
- Yin-Murphy M.** (1984) Acute hemorrhagic conjunctivitis. *Prog. Med. Virol.*, 29:23–44.
- Yin-Murphy M., Abdul Rahim N., Phoon M.C., Baharuddin-Ishak, and Howe J.** (1985) Early and rapid diagnosis of acute haemorrhagic conjunctivitis with tear specimens. *Bull World Health Organ.*, 63:705–709.
- Ypma-Wong M.F., Dewalt P.G., Johnson V.H., Lamb J.G., and Semler B.L.** (1988a) Protein 3CD is the major poliovirus proteinase responsible for cleavage of the P1 capsid precursor. *Virology*, 166:265-270.
- Ypma-Wong M.F., Filman D.J., Hogle J.M., and Semler B.L.** (1988b) Structural domains of the poliovirus polyprotein are major determinants for proteolytic cleavage at Gln-Gly pairs. *J. Biol. Chem.*, 263:17846-17856.
- Zell R., and Stelzner A.** (1997) Application of genome sequence information to the classification of bovine enteroviruses:The importance of 5' and 3' nontranslated regions. *Virus Res.*, 51:213-229.
- Zoll G.J., Melchers W.J., Kopecka H., Jambroes G., van der Poel H.J., and Galama J.M.** (1992) General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses:application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.*, 30:160-165.

ΔΙΕΥΘΥΝΣΕΙΣ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟΥ

http://www.brown.edu/Courses/Bio_160/Projects2000/Polio/PoliovirusPathogenesis.htm.

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/Picornaviridae/SequenceDatabase>

http://www.ratsteachmicro.com/Picorna_notes

<http://www.redpoll.pharmacy.ualberta.ca/~trent/right.htm>

<http://www.swbic.org/.../envirusat/module6/module6.html>

<http://www.unmc.edu/Pathology/Enteroviruslab/default.htm>

<http://www.vadscorner.com/outbreak.html>

http://www.Virology.net/Big_Virology/BVRNAPicorna.html

<http://www.virologyj.com/content/>

http://www.whozoo.org/mac/Music/Sars_Protease.htm

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΕΙΚΟΝΩΝ

<u>Εικόνα 1.</u> Φυλογενετικό δένδρο της οικογένειας των Picorna ιών.....	2
<u>Εικόνα 2.</u> Το ιικό σωματίο (virion) ενός Picorna ιού (Mentovirus) του γένους των καρδιοϊών.	3
<u>Εικόνα 3.</u> Κρυσταλλογραφική δομή με ακτίνες X διαφόρων Picorna ιών.	4
<u>Εικόνα 4.</u> Η καψιδική δομή του ιού Coxsackie B3.	5
<u>Εικόνα 5.</u> Το καψίδιο των Picorna ιών.....	6
<u>Εικόνα 6.</u> Τρισδιάστατη απεικόνιση των πρωτεϊνών του καψιδίου VP1, VP2, VP3 και VP4.....	7
<u>Εικόνα 7.</u> Η χαρακτηριστική δομή αύλακας των εντεροϊών.....	8
<u>Εικόνα 8.</u> Η τρισδιάστατη οργάνωση της 3C πρωτεάσης.....	15
<u>Εικόνα 9.</u> Σχηματισμός πόρων από ομοδιμερή 2B πρωτεϊνών.	20
<u>Εικόνα 10.</u> Το γονιδίωμα των εντεροϊών.....	23
<u>Εικόνα 11.</u> Σχηματική αναπαράσταση των 5' μη κωδικών περιοχών των μελών της οικογένειας Picornaviridae.....	28
<u>Εικόνα 12.</u> Το ιόσωμα προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα και υφίσταται τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούν την παραγωγή των Α σωματίων τα οποία είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει τη VP4 καψιδική πρωτεΐνη.....	37
<u>Εικόνα 13.</u> Στην 5' εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης, η 40S ριβοσωμική υπομονάδα αλληλεπιδρά με το mRNA μέσω του eIF3.....	39
<u>Εικόνα 14.</u> Πρωτεόλυση της ιϊκής πολυπρωτεΐνης.....	41
<u>Εικόνα 15.</u> Μοντέλο για τη σύνθεση του -RNA των εντεροϊών.....	43
<u>Εικόνα 16.</u> Μορφογένεση των picorna-ιών.....	44
<u>Εικόνα 17.</u> Οι δύο μηχανισμοί για τη ρύθμιση της ενεργότητας του eIF4F σε κύτταρα μολυσμένα με picorna-ιούς.	45
<u>Εικόνα 18.</u> Προτεινόμενο μοντέλο για την αναστολή της μεταγραφής του κυττάρου-ξενιστή.	46
<u>Εικόνα 19.</u> Η πορεία του ιού από το λεπτό έντερο μέχρι την αρχή της παράλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά την πρώτη μόλυνση.	48
<u>Εικόνα 20.</u> Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al.....	58
<u>Εικόνα 21.</u> Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyl et al.	59
<u>Εικόνα 22.</u> Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ της 5' NTR και του υπόλοιπου γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των εντεροϊών.....	62
<u>Εικόνα 23.</u> Πλάκα μικροτιτλοποίησης	77
<u>Εικόνα 24.</u> Πλάκα μικροεξουδετέρωσης με δεξαμενές αντιορών εντεροϊών.....	79
<u>Εικόνα 25.</u> Σχηματική απεικόνιση των περιοχών του γονιδιώματος	83

που πολλαπλασιάστηκαν μέσω ειδικά επιλεγμένων εκκινητών.....	88
<u>Εικόνα 26.</u> Μορφή χρωματογραφήματος.....	90
<u>Εικόνα 27</u> Αποτελέσματα αναζήτησης Blast μετά από την εισαγωγή της γενετικής αλληλουχίας του στελέχους <i>Human Echovirus 30 isolate Kar</i> στο ειδικό παράθυρο δεδομένων.....	90
<u>Εικόνα 28</u> Τοποθέτηση αλληλουχίας σε μορφή fasta στο ειδικό παράθυρο δεδομένων του προγράμματος Blast.....	97
<u>Εικόνα 29.</u> Παράθυρο εργασίας του προγράμματος Mega.....	98
<u>Εικόνα 30.</u> Πίνακας αποτελεσμάτων από τον υπολογισμό της μέσης νουκλεοτιδικής απόστασης μεταξύ κλινικών στελεχών στην 3D περιοχή.....	100
<u>Εικόνα 31.</u> Γράφημα μορφής φυλογενετικού δέντρου του προγράμματος Simplot.....	101
<u>Εικόνα 32.</u> Επιλογή της εξεταζόμενης αλληλουχίας (query sequence) από ένα σύνολο αλληλουχιών που πρόκειται να αναλυθούν ως προς πιθανό ανασυνδυασμό με το πρόγραμμα Simplot.....	101
<u>Εικόνα 33.</u> Γραφική αναπαράσταση του ποσοστού ομοιότητας της αλληλουχίας μεταξύ κλινικών στελεχών.....	101
<u>Εικόνα 34.</u> Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο τμήμα του γονιδίου VP1 nt. 2554-2895, (5' VP1).	109
<u>Εικόνα 35.</u> Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο τμήμα του γονιδίου VP1nt. 2985-3325, (3' VP1).....	110
<u>Εικόνα 36.</u> Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο γονίδιο 2A. Τα επιδημικά στελέχη είναι ευδιάκριτα ομαδοποιημένα με εξαίρεση το στέλεχος <i>Paraz</i>	115
<u>Εικόνα 37.</u> Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων στο γονίδιο 2B.....	116
<u>Εικόνα 38.</u> Στοιχίση πρωτεϊνικών ακολουθιών (alignment) για 98 κατάλοιπα της (5') VP1 καμινδικής πρωτεΐνης και για ολόκληρες τις 2A και 2B πρωτεΐνες.....	117
<u>Εικόνα 39.</u> Φυλογενετικό δένδρο κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες κλινικών στελεχών Echo ιών και αντιπροσωπευτικών προτύπων ολόκληρης της γενωμικής περιοχή 2C (α) και 563 nt του 5' άκρου του γονιδίου 3D.....	122
<u>Εικόνα 40.</u> Γραφική απεικόνιση της ομολογίας 2 επιδημικών στελεχών προερχόμενων από την Ελλάδα συγκριτικά με στέλεχος το οποίο προέρχεται από τη Μολδαβία.....	123
<u>Εικόνα 41.</u> Φυλογενετικό δένδρο του τμήματος του γονιδίου VP1 nt.2985-3325 κατασκευασμένο από στοιχισμένες αλληλουχίες των κλινικών στελεχών Echo ιών οροτύπου 30 της παρούσας διατριβής και αντιπροσωπευτικών των γονοτύπων I και II Echo 30 στελεχών προερχόμενων από την τράπεζα αλληλουχιών GenBank.....	131

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

<u>Πίνακας 1.</u> Οι κυτταρικοί υποδοχείς των ricorna-ιών.	30
<u>Πίνακας 2.</u> Στελέχη αναφοράς των Echo ιών.....	67
<u>Πίνακας 3.</u> Κλινικά στελέχη που μελετήθηκαν.	69
<u>Πίνακας 4.</u> Πίνακας ταυτοποίησης εντεροϊών με την μέθοδο της μικρο-εξουδετέρωσης.....	80
<u>Πίνακας 5.</u> Ονομασία, αλληλουχίες, πολικότητα και ακριβής θέση του γονιδιώματος, στην οποία στοχεύουν τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.....	103
<u>Πίνακας 6.</u> Συνολικός αριθμός στελεχών αναφοράς και κλινικών δειγμάτων που ενισχύθηκαν επιτυχώς.....	104
<u>Πίνακας 7.</u> Ορότυποι echo ιών που έδωσαν αρνητικό αποτέλεσμα στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	104
<u>Πίνακας 8.</u> Συγκριτικά αποτελέσματα ταυτοποίησης κλινικών Echo ιών.....	107
<u>Πίνακας 9.</u> Μέση εκατοστιαία ομολογία μεταξύ των κλινικών στελεχών Echo ιών σε δύο διαφορετικά τμήματα της VP1 περιοχής.....	108
<u>Πίνακας 10.</u> Μέση εκατοστιαία απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών οροτυπικών ομάδων των κλινικών στελεχών Echo ιών σε τρεις διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματός τους.....	113
<u>Πίνακας 11.</u> Μέση εκατοστιαία απόκλιση εντός των διαφορετικών οροτυπικών ομάδων των κλινικών στελεχών Echo ιών σε τρεις διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματός τους.	114
<u>Πίνακας 12.</u> Μέση εκατοστιαία νουκλεοτιδική διαφορά μεταξύ των κλινικών στελεχών και αντιπροσωπευτικών πρότυπων στελεχών στα γονίδια 2C και 3D.....	121

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα ερυθρού της φαινόλης 0,4%
Διάλυμα NaHCO₃ 7,5%
GM (Hank's Growth Medium)
MM (Hank's Meintenance medium)
GM (Eagle's growth medium)
MM (Eagle's maintenance medium)
PBS ελεύθερο ασβεστίου ή μαγνησίου
Διάλυμα Trypsine / Versene
Διάλυμα Τρυψίνης
Διάλυμα Versene
Διάλυμα Θειοκυανούχου Γουανιδίνης
Διάλυμα TBE 1x

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Εκκινητικά ολιγονουκλεοτίδια (Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)
Τυχαίοι εκκινητές (random primers) (d(N)₉, Takara Biomedical group, Shiga, Japan)
Αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV (Promega Corporation Madison WI, USA)
Αναστολέας ριβονουκλεασών, RNase Inhibitor (HT Biotechnology, UK)
Αποστειρωμένο νερό, ελεύθερο νουκλεασών (Sigma Aldrich, St Louis MO)
Taq DNA πολυμεράση (Promega Corporation Madison WI, USA)
dNTPs (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK)
Μάρτυρας μοριακού βάρους (GIBCO BRL, Life Technologies Paisley, UK)
Χρωστική (κυανό της βρωμοφαινόλης-bromophenol blue) (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK)
Αγαρόζη (GIBCO BRL, Life Technologies Paisley, UK)
Βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml (GIBCO BRL, Life Technologies Paisley, UK)

ΚΙΤ

Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel)

ΟΡΓΑΝΑ

Θερμικός κυκλοποιητής Techne Progene Thermal Cycler
Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (FOTO/PHORESIS I, FOTODYNE, Hartland WI)
Kodak digital camera

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ