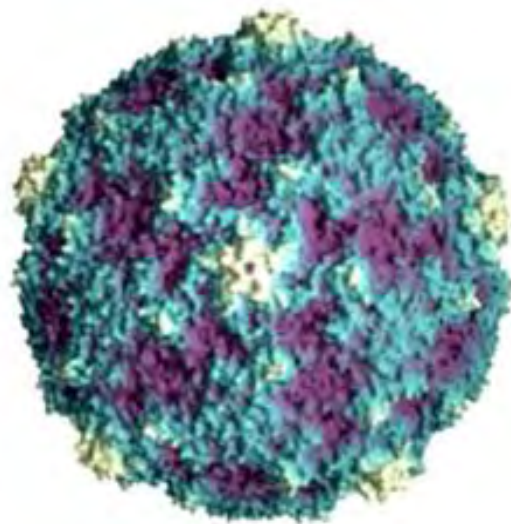


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-
ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»

Παπαδή Γεωργία

Δημιουργία «PCR μικροσυστοιχιών» για την
ανίχνευση και μοριακό χαρακτηρισμό των
ΕCHO ιών



Λάρισα 2011

**Δημιουργία «PCR μικροσυστοιχιών» για την ανίχνευση και
μοριακό χαρακτηρισμό των ECHO ιών**

Επιβλέπων καθηγητής

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Τριμελής επιτροπή

Μαρκουλάτος Παναγιώτης

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μόσιαλος Δημήτριος

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με το τέλος αυτής της εργασίας, τελειώνει για μένα ένας ακόμη κύκλος σπουδών, από τον οποίο πήρα πολλά. Γνώσεις, εμπειρίες, φιλίες. Και νιώθω γεμάτη, παράλληλα ανακουφισμένη και με όρεξη για νέες προκλήσεις. Για το λόγο αυτό, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τους ανθρώπους που συνέβαλαν, με οποιονδήποτε τρόπο, στη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Αρχικά θέλω να ευχαριστήσω τον κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου άλλη μια φορά, για την κατανόηση, τη βοήθεια, το ήθος του και την έμπνευση που μου έδωσε όλα αυτά τα χρόνια. Επίσης τους κυρίους Μαμούρη Ζήση και Μόσιαλο Δημήτρη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή και τη γενική προσφορά τους κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Βίκυ Πλιάκα και την κ. Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου για την πολύτιμη βοήθεια τους, τη στήριξη και την άριστη συνεργασία όπως και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την καλή συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον.

Ένα «ευχαριστώ» είναι λίγο για τους γονείς μου, Διονύση και Σούλα, και τον αδερφό μου Δήμο. Με στήριξαν σε κάθε μου απόφαση και κάθε δυσκολία. Τους ευχαριστώ για την υπομονή τους και τις θυσίες που έχουν κάνει σε όλο αυτό το δύσκολο ταξίδι της σταδιοδρομίας μου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου, για την κατανόηση, τη συμπαράσταση σε κάθε δύσκολη στιγμή αλλά και για τις όμορφες στιγμές που μου έχουν χαρίσει.

Στους γονείς μου, Διονύση και Σούλα
και στον αγαπημένο μου αδερφό, Δήμο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Echo ιοί, οι οποίοι είναι συνηθισμένοι παράγοντες παθογένειας, κυρίως σε παιδιά, είναι τυπικά μέλη του γένους των Εντεροϊών της οικογένειας των Picornavirales. Είναι μικροί μη ελυτροφόροι ιοί, το καψίδιο των οποίων αποτελείται από 60 αντίγραφα τεσσάρων μη γλυκοσυλιωμένων πρωτεϊνών, που οργανώνονται σε ένα εικοσάεδρο (VP1, VP2, VP3 και VP 4). Το γονιδίωμα τους είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας, το οποίο κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη, από την πρωτεόλυση της οποίας προκύπτουν οι δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες. Η γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους, όπως και των υπόλοιπων Εντεροϊών, επιτυγχάνεται πλέον με την εφαρμογή των σύγχρονων μοριακών μεθόδων RT-PCR, στοχεύοντας και ενισχύοντας τμήματα σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση μιας ομάδας εκκινητικών μορίων τα οποία στοχεύουν σε διάσπαρτες περιοχές και καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος, με σκοπό τη γρήγορη ανίχνευση των Echo ιών και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους γονιδιώματος οποιουδήποτε στελέχους, με σημαντικές εφαρμογές στη διάγνωση των Echo ιών. Τα έξι ζεύγη εκκινητών που προέκυψαν στοχεύουν στις περιοχές 5'UTR, VP4, VP1, 2A, 2B, 2C, 3A και 3D. Ελέγχθηκαν για την καταλληλότητα και την ειδικότητά τους σε όλα τα πρότυπα στελέχη Echo και σε πέντε κλινικά στελέχη, με αρκετά ικανοποιητικά αποτελέσματα. Με την συνδυασμένη εφαρμογή τους, ενισχύεται ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος σε διάφορες περιοχές, η αλληλούχιση των οποίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σχεδιασμό νέων εκκινητών με σκοπό την ενίσχυση, ανίχνευση, και αλληλούχιση ολόκληρου σχεδόν του γονιδιώματος οποιουδήποτε στελέχους Echo ιού.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορία

1.2 Ταξινόμηση

1.3 Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος των Εντεροϊών

1.3.1 5-μη μεταφραζόμενη περιοχή – 5-UTR

1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

1.3.2.1 Δομική περιοχή

1.3.2.2 Λειτουργική περιοχή

1.3.3 3-μη μεταφραζόμενη περιοχή - 3-UTR

1.4 Κύκλος ζωής των Εντεροϊών

1.4.1 Υποδοχείς των Echo ιών

1.4.2 Μετάφραση του ιικού RNA

1.4.3 Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

1.4.4 Αντιγραφή του ιικού RNA

1.4.5 Καψιδίωση – Σχηματισμός των ιικών σωματιδίων

1.5 Εξέλιξη των Εντεροϊών

1.5.1 Μεταλλάξεις

1.5.2 Ανασυνδυασμοί

1.5.2.1 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού

1.6 Ορολογικές σχέσεις και μεταβλητότητα

1.7 Επιδημιολογία

1.7.1 Γεωγραφική και εποχιακή κατανομή

1.7.2 Μετάδοση

1.8 Παθογένεια και τροπισμός στους ιστούς

1.9 Κλινικές εκδηλώσεις

1.10 Ανοσοαπόκριση

1.11 Πρόληψη και έλεγχος

1.12 Εργαστηριακή διάγνωση

1.13 Σκοπός

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 2.1 Πρότυπα και κλινικά στελέχη
- 2.2 Προγράμματα βιοπληροφορικής
- 2.3 Κυτταροκαλλιέργειες
 - 2.3.1 Απόψυξη κυττάρων
 - 2.3.2 Αναδιπλασιασμός κυττάρων
 - 2.3.3 Κατάψυξη κυττάρων
 - 2.3.4 Διαλύματα
- 2.4 Μόλυνση κυτταρικών σειρών
- 2.5 Εκχύλιση του ιικού RNA
- 2.6 Εκκινητές
- 2.7 Αντίστροφη μεταγραφή-RT
- 2.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης-PCR
- 2.9 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αγαρόζης

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

- 3.1 Αποτελέσματα PCR – Πρότυπα στελέχη
- 3.2 Αποτελέσματα PCR – Κλινικά στελέχη

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορία

Οι Echo ιοί ανακαλύφθηκαν τυχαία κατά τη διάρκεια επιδημιολογικών μελετών πολιομυελίτιδας. Το 1951 έγινε η πρώτη καταγραφή απομόνωσης Echo ιών, από κόπρανα ασυμπτωματικών ασθενών. Καθορίστηκαν αρχικά σαν μια ομάδα picorna ιών οι οποίοι προκαλούσαν κυτταροπαθογόνο δράση (CPE) σε κυτταροκαλλιέργειες αλλά ήταν γενικά μη παθογόνοι σε νεογνά ποντικών. Διακρίθηκαν έτσι από τους Coxsackie ιούς, μια άλλη υποομάδα εντεροϊών που είναι παθογόνοι σε νεογέννητα ποντίκια, και από τους polio ιούς λόγω της διαφορετικής τους αντιγονικότητας. Ονομάστηκαν αρχικά «ορφανοί ιοί» (echo: *enteric cytopathogenic human orphan*), λόγω του ότι δεν σχετίζονταν με κάποια γνωστή ανθρώπινη ασθένεια. Αν και αποτελούν τους πιο συχνά απομονωμένους εντεροϊούς, παραμένουν η λιγότερο γνωστή και χαρακτηρισμένη υποομάδα (Yin-Murphy M, Almond JW, 1996, Korecka Helena, 1999).

1.2 Ταξινόμηση

Οι Echo ιοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών, της οικογένειας των picorna ιών, η οποία αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μικρών, μη ελυτροφόρων RNA-ιών θετικής πολικότητας και περιλαμβάνει αρκετά παθογόνα στελέχη για τον άνθρωπο και για άλλα ήδη θηλαστικών.

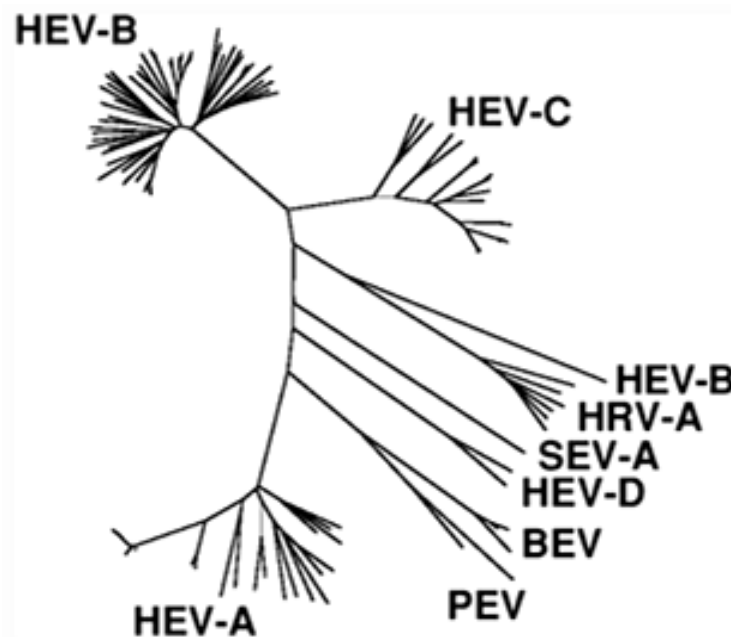
Η οικογένεια των Picorna ιών περιλαμβάνει 230 οροτύπους, οι οποίοι διακρίνονται σε 9 γένη: τους εντεροϊούς (enteroviruses), τους ρινοϊούς (rhinoviruses), τους καρδιοϊούς (cardioviruses), τους αφθοϊούς (aphthoviruses), τους ιούς της Ηπατίτιδας Α (hepatoviruses), τους parecho-ιοί (parechoviruses), τους ιούς Β της ρινίτιδας των ιπποειδών (equine rhinitis B viruses – erboviruses), τους kobuviruses και τους teschoviruses (King et al., 2000). Η ομαδοποίηση τους γίνεται με βάση τη διαφοροποίηση που παρουσιάζουν στα αντιγονικά χαρακτηριστικά τους, τα όργανα τα οποία προσβάλλουν, την ποικιλία των ξενιστών τους, καθώς επίσης και στις διάφορες φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως η ιδανική θερμοκρασία πολλαπλασιασμού και η επιτρεπτή οξύτητα του περιβάλλοντός τους (pH).

Το γένος των εντεροϊών αποτελείται από 80 αντιγονικά διακριτούς ορότυπους, οι οποίοι με βάση την παθογένειά τους κατηγοριοποιούνται σε 8 είδη, 4 από τα οποία παρουσιάζουν παθογένεια στον άνθρωπο: οι Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), οι Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), οι Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και οι Echo ιοί (E, ορότυποι 1-33). Αυτό το σύστημα ταξινόμησης όμως καταργήθηκε όταν άρχισαν να ανακαλύπτονται ιοί αντιγονικά όμοιοι με τους Echo, οι οποίοι όμως προκαλούσαν ασθένειες σε ποντίκια και ανθρώπους. Η αρίθμηση των νέων εντεροϊών που απομονώνονταν ξεκινούσε από τον Εντεροϊό 68 (EV68). Παρά τη σημαντικότητα των αντιγονικών ιδιοτήτων, η ανάπτυξη των μοριακών μεθόδων ταυτοποίησης οδήγησε στην επανεκτίμηση του παλιού συστήματος ταξινόμησης και την ανάπτυξη ενός νέου συστήματος, σύμφωνα με το οποίο οι Εντεροϊοί χωρίζονται σε 8 είδη (King et al., 2000), πέντε από τα οποία παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια. Οι Πολιοϊοί και οι Ανθρώπινοι Εντεροϊοί A-D. Μετά από μελέτες που απέδειξαν τη στενή φυλογενετική σχέση των Πολιοϊών με τους εντεροϊούς της ομάδας C (Brown et al., 2003) οι Πολιοϊοί εντάχθηκαν στην ομάδα αυτή. Οι Ανθρώπινοι Εντεροϊοί (Human enteroviruses, HEV) ταξινομούνται πλέον σε τέσσερις ομάδες: i) HEV-A, ii) HEV-B, iii) HEV-C, iv) HEV-D (**Πίνακας 1.1**) (Frauquet et al., 2005, King et al., 2000). Η ταξινόμηση των εντεροϊών συνεχώς τροποποιείται λόγω της συνεχούς εύρεσης νέων οροτύπων.

Οι Echo ιοί αποτελούν την μεγαλύτερη υποομάδα των εντεροϊών και είναι οι πιο συχνά απομονωμένοι ιοί από κλινικά δείγματα. Ανήκουν στην ομάδα Β των ανθρώπινων εντεροϊών και έχουν αναγνωριστεί 28 ανοσολογικά διακριτοί ορότυποι Echo [1-7, 9-11, 24, 29-33] (Pallansch and Roos, 2007, Frauquet et al., 2005).

Είδη	Ορότυποι
Human Enterovirus A	Coxsackieviruses A2-A8, A10, A12, A14, A16, Enterovirus 71, 76, 89-92
Human Enterovirus B	Coxsackieviruses A9, B1-B6, Echoviruses 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 Enterovirus 69, 73-75, 77-88, 93, 97, 98, 100, 101
Human Enterovirus C	Coxsackieviruses A1, A11, A13, A15, A17-22, A24, Enterovirus 95, 96, 99, 102 Poliovirus 1-3
Human Enterovirus D	Enteroviruses 68, 70, 94

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση του γένους των εντεροϊών.



Εικόνα 1.1 Δενδρόγραμμα του γένους των Εντεροϊών (Pallansch and Roos, 2007)

1.3 Δομή και οργάνωση του γονιδιώματος

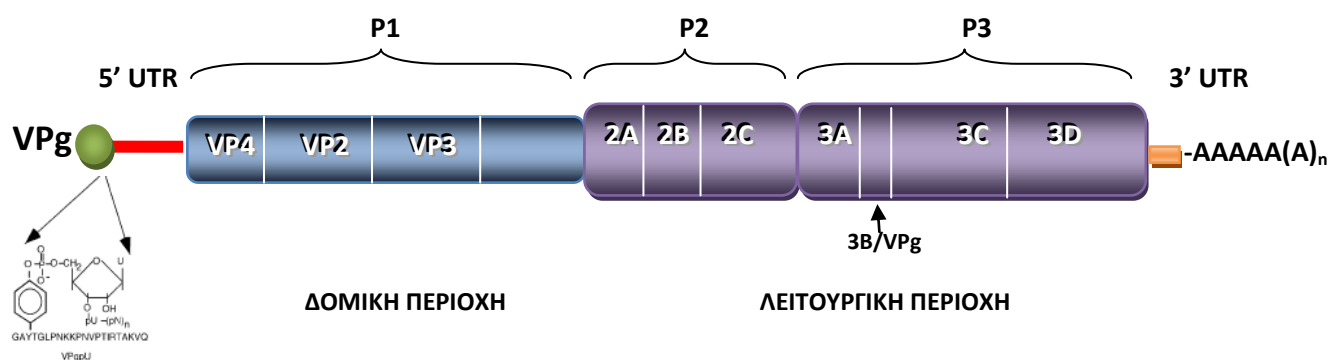
Το γονιδίωμα των Εντεροϊών, είναι ένα μονοκιστρονικό μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7500 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο του με μια μικρή, ικκή πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, την VPg, η οποία φαίνεται να συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό του γενώματος και στην συγκρότηση των ιϊκών σωματιδίων. Το 3' άκρο φέρει μια πολυ(A) ουρά μήκους 60 νουκλεοτιδίων η οποία διαδραματίζει έναν ρόλο στην σταθερότητα του RNA και την μολυσματικότητα του ιού. Έχει μια μακριά μη μεταφραζόμενη αλληλουχία στην 5' περιοχή με υψηλά διατηρημένες δομές σημαντικές για την έναρξη της αντιγραφής και της μετάφρασης. Το μεγάλο ενιαίο ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, η οποία υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από ικές πρωτεάσες για την παραγωγή δομικών και μη- δομικών πρωτεϊνών. Στο 3' άκρο υπάρχει μια μικρή (70-100 νουκλεοτιδίων) μη μεταφραζόμενη περιοχή (UTR), στην οποία σχηματίζεται μια δομή ψευδοκόμβου (Korecka 1999).

Η επιλογή του RNA αντί του DNA ως μόριο αποθήκευσης της γενετικής πληροφορίας, έχει αρκετά μειονεκτήματα. Το RNA είναι χημικά ασταθέστερο από το DNA, ακόμα και σε φυσιολογικό PH και κατά την είσοδο του στο κύτταρο, είναι

πιο ευαίσθητο προς αποικοδόμηση ή τροποποίηση από τα διάφορα κυτταρικά ένζυμα. Επιπλέον, τα λάθη που συμβαίνουν τυχαία κατά την αντιγραφή του γενώματος με ρυθμό 10^{-4} ανά προστιθέμενο νουκλεοτίδιο, δεν μπορούν να επιδιορθωθούν, καθώς οι RNA ιοί δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του κυττάρου. Συνεπώς, οι RNA ιοί πρέπει να επιβιώνουν με υψηλούς ρυθμούς μεταλλαξιγένεσης. Η επιβίωση όλων των RNA ιών, σε τέτοιες συνθήκες, επιτυγχάνεται με τον περιορισμό του μεγέθους του γενωμάτος τους, το οποίο σε συνδυασμό με τον υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, δίνει το πλεονέκτημα της γρήγορης αντιγραφής και προσαρμογής του ιού σε ένα νέο περιβάλλον (πχ ανθεκτικότητα σε ένα φάρμακο). Το μειονέκτημα που προκύπτει, είναι ότι πρέπει να ζουν κάτω από συνθήκες μεγάλης γενετικής αυστηρότητας, έχουν δηλαδή περιορισμένη ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών (Pfister et al. 1999).

Σήμερα, η αλληλουχία του γονιδιώματος των Echo ιών, όπως και όλων των Εντεροϊών, είναι γνωστή και διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο από τις διεθνείς τράπεζες δεδομένων (Obestre et al., 2004).

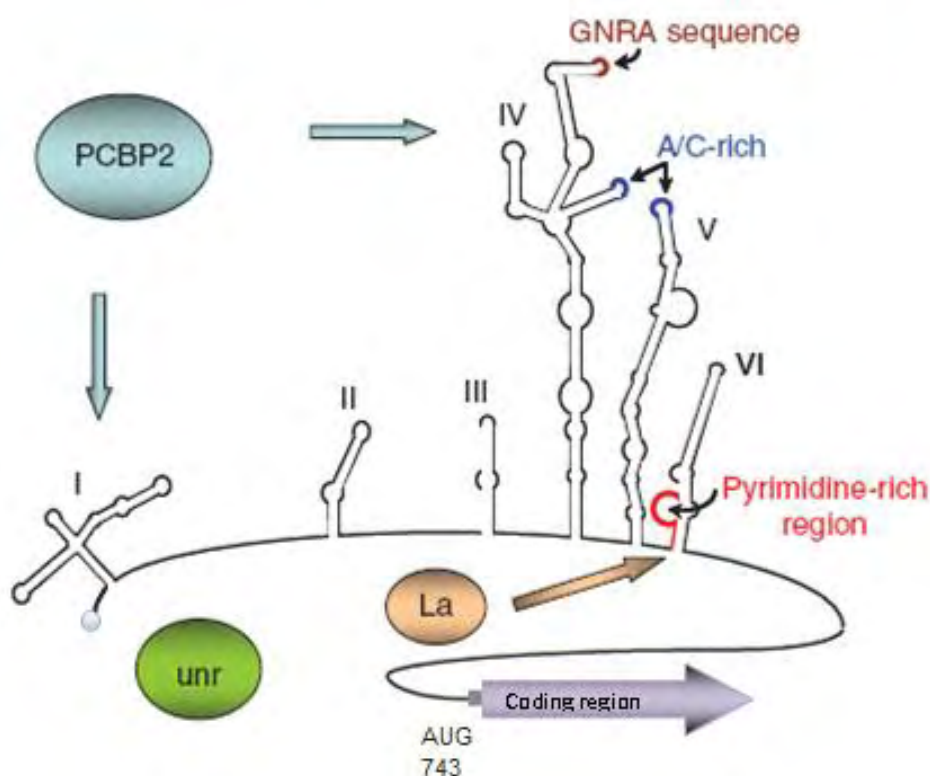
Το γονιδίωμα των Εντεροϊών είναι οργανωμένο σε τρεις κύριες περιοχές: την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' untranslated region-5'UTR, 750nt), το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame-ORF) και την 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' untranslated region-3'UTR, 70nt). Στο 5' άκρο είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg (Virion Protein, genome linked) και στο 3' άκρο βρίσκεται η πολυ(Α) ουρά (**Εικόνα 1.2**).



Εικόνα 1.2. Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών. Στο 5' άκρο της 5' UTR είναι προσδεμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιούμενη από τον ίδιο τον ιό και στο 3' άκρο της 3' UTR βρίσκεται η πολυΑ ουρά. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

1.3.1 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή - 5' UTR

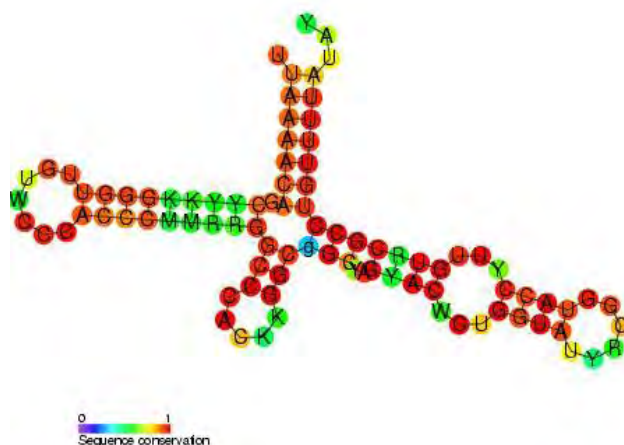
Η 5'UTR είναι μια περιοχή περίπου 750 νουκλεοτιδίων (8-12% του γενώματος) η οποία διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο, γεγονός που φαίνεται από την υψηλά διατηρημένη δομή της, μεταξύ των διαφόρων οροτύπων των Εντεροϊών. Ο ρόλος της συνδέεται άμεσα με την αλληλουχία της. Η μεγάλη περιεκτικότητα σε νουκλεοτίδια G-C, συγκριτικά με το υπόλοιπο γονιδίωμα, υποδηλώνει την ύπαρξη δευτεροταγούς δομής (Stanway et al., 1984). Τα συντηρημένα στοιχεία δευτεροταγών RNA δομών που περιέχει διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις λειτουργίες της μετάφρασης και αντιγραφής του ιού. Περιλαμβάνει 7 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VII) και χωρίζεται σε 3 περιοχές: στο cloverleaf (I) και στο IRES (Internal ribosome entry site) που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI και μια λιγότερο διατηρημένη αλληλουχία 154 νουκλεοτιδίων η οποία βρίσκεται μεταξύ της δομής IRES και του ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου (Wimmer et al., 1993). **(Εικόνα 1.3)**



Εικόνα 1.3. Δευτεροταγής δομή της 5'UTR περιοχής του γενώματος των εντεροϊών. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES. Έξω από το στοιχείο IRES προ το 3' άκρο της 5' UTR βρίσκεται το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης.

Το cloverleaf είναι ένα *cis-acting* γενετικό στοιχείο 88 νουκλεοτιδίων, με δομή τριφυλλιού, το οποίο σχηματίζεται από 4 δομές μίσχου-θηλιάς (**Εικόνα 1.4**). Το cloverleaf διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ιού σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε με κυτταρικές, είτε με ιικές πρωτεΐνες, με αποτέλεσμα την σταθεροποίηση του ιικού RNA, καθώς και την κυκλοποίηση του, που είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και την αντιγραφή του ιού. Το cloverleaf δρα επίσης και σαν μοριακός διακόπτης συντονίζοντας τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιικού γενώματος στην αντιγραφή (Semler and Ertel, 2008, Melchers et al., 2006).

Τα 5 δομικά RNA στοιχεία (II-VI) της 5'-UTR περιοχής αποτελούν το IRES, μια δομή 400 νουκλεοτιδίων η οποία περιλαμβάνει, μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες. Το IRES είναι απαραίτητο στοιχείο για την έναρξη της μετάφρασης, καθώς προσδένονται στο εσωτερικό του τα ριβοσώματα, οι μεταφραστικοί παράγοντες και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες διεγείρουν την ιική μετάφραση (Sharma et al., 2004, Semler and Ertel, 2008). Αποτελεί επίσης τον κύριο παράγοντα για τον τροπισμό και την παθογένεια των ιών (Kauder and Racaniello, 2004) Η υπερμεταβλητή περιοχή η οποία ακολουθεί το IRES, φέρει πολλά κωδικόνια AUG και το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης (Witwer et al., 2001)



Εικόνα 1.4: Δομή του *cis-acting* γενετικού στοιχείου cloverleaf

1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης

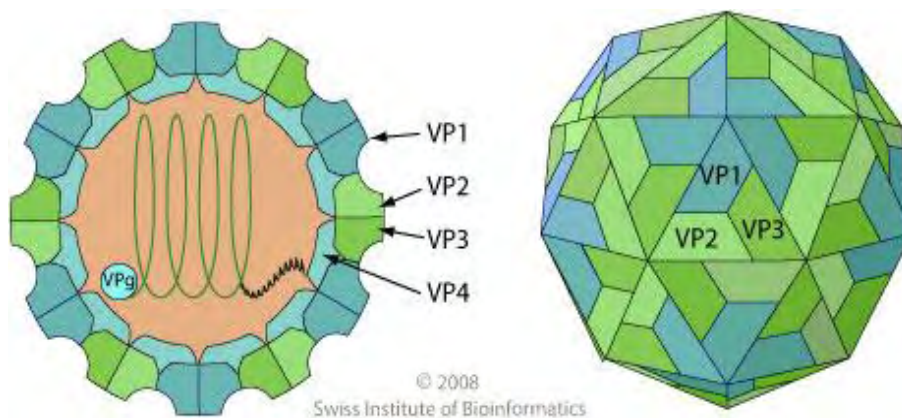
Το γονιδίωμα των Εντεροϊών, όπως και όλων των ιών RNA θετικής πολικότητας, είναι από μόνο του μολυσματικό μόλις μπει στο κύτταρο ξενιστή, καθώς μεταφράζεται απευθείας για την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αντιγραφή του. Το μονοκιστρονικό ιικό RNA, κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη περίπου 250 kDa, η οποία αποτελείται από 2 περιοχές, τη δομική και τη λειτουργική. Μετά από πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης προκύπτουν οι ώριμες δομικές (VP1, VP2, VP3, VP4) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) πρωτεΐνες του ιού καθώς και ενδιάμεσες ικές πρωτεΐνες όπως οι VP0, 2BC, 3AB και 3CD (Racaniello 2007).

1.3.2.1 Δομική περιοχή

Δομή καψιδίου και ιδιότητες δομικών πρωτεϊνών

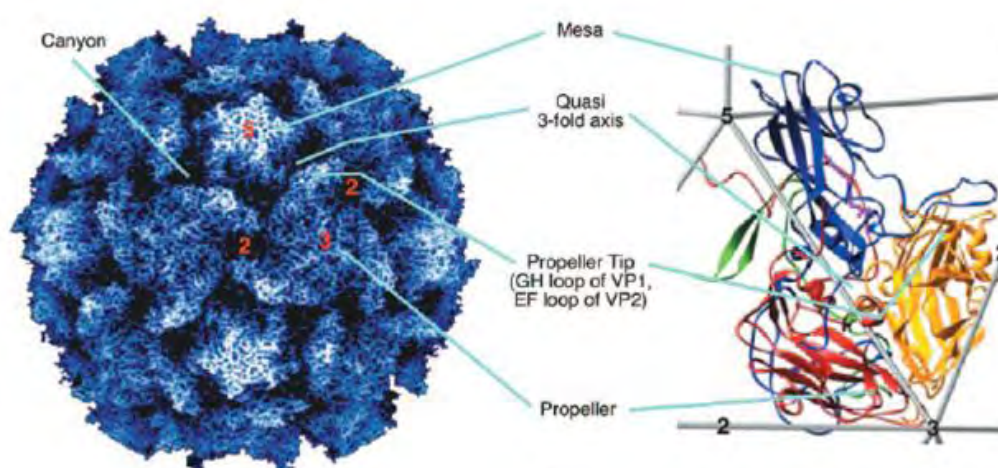
Το γονιδίωμα των Echo ιών περιβάλλεται από ένα σχετικά μικρό (24-28nm), μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο, το οποίο αποτελείται από 60 ασύμμετρα πρωτομερή. Κάθε πρωτομερές αποτελείται από ένα αντίγραφο των καψιδιακών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες προκύπτουν από πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης. Η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου πρωτεολύεται και δημιουργούνται τα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3, VP1). Από την συσσωμάτωση των πρωτομερών σχηματίζονται τα πενταμερή [(VP0, VP3, VP1)₅], δώδεκα από τα οποία συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το «προκαψίδιο» [(VP0, VP3, VP1)₅]₁₂. Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA «πακετάρεται» στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2. **(Εικόνα 1.5)**

Το ώριμο ιικό σωματίδιο χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα. Εμφανίζει ανθεκτικότητα σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS, σε πρωτεολυτικά ένζυμα και σε όξινο pH (~3), ιδιότητα που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού στο έντερο όπου κυριαρχεί το όξινο περιβάλλον. (Pfister et al. 1999).



Εικόνα 1.5: Αναπαράσταση της δομής του ιικού καψιδίου. Στο εσωτερικό φαίνεται το ιικό RNA με την πολύ-Α ουρά στο 3' άκρο και την πρωτεΐνη VPg στο 5' άκρο.

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Τα πρωτομερή συνδέονται μεταξύ τους γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας και δημιουργούν τα πενταμερή ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής και ο διμερής άξονας συμμετρίας. Συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας (Blondel et al. 1998, Pfister et al., 1999) (**Εικόνα 1.6**). Οι VP1, VP2 και VP3 πρωτεΐνες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η VP4, που είναι η μικρότερη από τις καψιδιακές πρωτεΐνες, βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. (Racaniello 2007).



Εικόνα 1.6: Ατομικό μοντέλο της δομής του καψιδίου των εντεροϊών (αριστερά). Αναπαράσταση ενός πρωτομερούς (δεξιά). Φαίνονται οι πρωτεΐνες VP1 (μπλε), VP2 (κίτρινο), VP3 (κόκκινο), και VP4 (πράσινο) που σχηματίζουν το εικοσάεδρο. Οι άξονες συμμετρίας, πενταμερής, τριμερής και διμερής, επισημαίνονται με αριθμούς. (Bubeck et al., 2005)

Οι πρωτεΐνες του καψιδίου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος και την αμινοξική τους αλληλουχία. Ωστόσο, οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση. Παρουσιάζουν ένα κοινό δομικό μοτίβο, το οποίο είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων. Αντίθετα, η VP4 φαίνεται να έχει μια λιγότερο αυστηρά καθορισμένη διαμόρφωση (Hogle, 2002).

Οι κλώνοι των β-βαρελίων συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη και προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου. Αυτές οι αμινοξικές θηλιές αποτελούν τις κύριες δομές των αντιγονικών θέσεων του ιού (N- Ags). Γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, στο εξωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται μια διαμόρφωση αύλακας γνωστή και ως *canyon* που σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2 και VP3 καψιδιακών πρωτεϊνών. Η αύλακα πιστεύεται πως αποτελεί τη θέση πρόσδεσης των υποδοχέων των κυττάρων ξενιστών (Colston & Racaniello 1994, Belnap et al., 2000, He et al., 2000, Minor 2000).

Στο εσωτερικό της, φέρει κατάλληλες περιοχές οι οποίες συνδέονται με συγκεκριμένα τμήματα του κυτταρικού υποδοχέα, επιτρέποντας έτσι την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο. Ο πολύ σημαντικός ρόλος των σημείων προσκόλλησης καθώς και η εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή τους με τους κυτταρικούς υποδοχείς δικαιολογούν την εξελικτική τους σταθερότητα, η οποία όμως τα καθιστά ευπαθή στα αντισώματα. Ωστόσο, προστατεύονται από την άμυνα του οργανισμού ξενιστή, λόγω της θέσης τους στο εσωτερικό της αύλακας (Stanway G., 1990). Αντίθετα, περιοχές του ιικού καψιδίου που έχουν μικρή λειτουργική σημασία για τον ιό, παραμένουν στερεοδομικά απροστάτευτες στην περιφέρεια της αύλακας και λειτουργούν ως επίτοποι. Η αποφυγή της ανοσολογικής απάντησης επιτυγχάνεται με την υπερμεταβλητότητα των περιοχών αυτών, με αποτέλεσμα την εξέλιξη νέων οροτύπων.

Στη βάση της αύλακας, στο εσωτερικό του β-βαρελίου της VP1 υπάρχει μια υδρόφοβη περιοχή στην οποία υπάρχει ένα λιπιδικό μόριο σφινγოსίνης, το οποίο πιστεύεται ότι ελέγχει την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές μεταβολές κατά την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με σκοπό την απελευθέρωση του ιικού γονιδιώματος στο κυτταρικό περιβάλλον και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου (Filman et al., 1989). Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλεύονται πολλές αντι-ιικές φαρμακευτικές ουσίες οι οποίες προκαλούν μια αλλαγή στην στερεοδιάταξη της θέσης αυτής με σκοπό την παρεμπόδιση της δέσμευσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα.

Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα του καψιδίου σημειώνονται μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών. Ειδικότερα, γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας τα αμινοτελικά άκρα 5 μορίων της VP3 δημιουργούν ένα σχηματισμό β-κυλίνδρου. Η συγκεκριμένη δομή περιβάλλεται από 5 β-πτυχωτά φύλλα τριών κλώνων το καθένα, που σχηματίζονται από τα αμινοτελικά άκρα των VP4 και VP1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών δομών συντονίζονται μέσω του μυριστικού οξέος που βρίσκεται προσδεμένο στην VP4 (Chow et al., 1987). Η λειτουργική αυτή διαφοροποίηση του αμινοτελικού άκρου της VP4 συμβάλλει επίσης στην προσκόλληση του ιού στους υποδοχείς του ξενιστή και στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον. Σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος στον ξενιστή παίζει επίσης η δυνατότητα φωσφορυλίωσης των πρωτεϊνών VP2 και VP4 από κυτταρικές κινάσες, με την αποσταθεροποίηση του καψιδίου. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται μέσω της δομής ενός β-βαρελίου 7 κλώνων το οποίο συντίθεται από 4 β-κλώνους της δομής β-βαρελίου της VP3 και 1 β-κλώνο που προέρχεται από το αμινοτελικό άκρο της VP1, ο οποίος εσωκλείει 2 β-κλώνους που προέρχονται από το αμινοτελικό άκρο της VP2 πρωτεΐνης του γειτονικού πενταμερούς (Colston & Racaniello 1994). Τέλος, πιστεύεται ότι το αμινοτελικό άκρο της VP1 συμμετέχει στην καψιδίωση του ιικού RNA (Kirkegaard, 1990).

1.3.2.2 Λειτουργική περιοχή

Στο 3' άκρο του γονιδιώματος των εντεροϊών, βρίσκονται οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των λειτουργικών πρωτεϊνών (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) καθώς και των λειτουργικών πρόδρομων μορίων των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD), που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές λειτουργίες του ιού. Συγκεκριμένα, εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, στην επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης, στο σταμάτημα των κυτταρικών λειτουργιών, στην αλλαγή διαμόρφωσης των κυτταρικών μεμβρανών και στη δημιουργία κυστιδίων.

Ιδιότητες των λειτουργικών πρωτεϊνών

Η πρωτεΐνη 2A είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης η οποία υδρολύει πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ τυροσίνης (Tyr) και γλυκίνης (Gly). Καταλύει το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 της ιικής πολυπρωτεΐνης, διαχωρίζοντας έτσι τις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου από τις λειτουργικές πρωτεΐνες (Sommergruber et al., 1989, Toyoda et al., 1986). Επίσης, ευθύνεται για την

αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης του κυττάρου ξενιστή, προκαλώντας τη διάσπαση του αμινοτελικού άκρου των παραγόντων eIF4GI και eIF4GII, καθώς και του καρβοξυτελικού άκρου της PABP (Ventoso et al., 1998). Η αναστολή της παραγωγής πρωτεϊνών απαραίτητων για τη βιωσιμότητα του κυττάρου, οδηγεί στην ενεργοποίηση του μονοπατιού της απόπτωσης μέσω της κασπάσης 3 (Calandria et al., 2004). Μια ακόμη λειτουργία της 2A είναι η σταθεροποίηση του ιικού RNA, μέσω πρωτεολυτικής τροποποίησης κάποιας κυτταρικής πρωτεΐνης, η οποία προσδένεται απευθείας στο cloverleaf του ιικού RNA αποτρέποντας την αποδόμηση του από τις ριβονουκλεάσες. Με αυτόν τον τρόπο διεγείρεται περαιτέρω η ιική μετάφραση (Jurgens et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 2B Εντοπίζεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στο σύμπλεγμα Golgi και δρα σαν πολυμερές, μορφή απαραίτητη για την ιική αντιγραφή (Cusonati et al., 1998). Αυξάνει την διαπερατότητα των μεμβρανών, με αποτέλεσμα, την παρεμπόδιση της μεταφοράς γλυκοπρωτεϊνών από το σύμπλεγμα Golgi στην κυτταρική επιφάνεια, την αλλαγή στη διαμόρφωση των ενδοκυττάρων μεμβρανών και της πλασματικής μεμβράνης, την αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωση Ca^{2+} και την επαγωγή της απόπτωσης (Madan et al., 2008).

Η πρόδρομη πρωτεΐνη 2BC παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα αύξησης της διαπερατότητας των μεμβρανών σε σχέση με την πρωτεΐνη 2B. Η 2BC εντοπίζεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και η σημαντικότερή ιδιότητα της είναι ότι προκαλεί την αναδιάταξη των μεμβρανών και τη δημιουργία κυστιδίων τα οποία συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα και αποτελούν θέσεις όπου επιτελείται η ιική αντιγραφή. (Rust et al., 2001, Doedens & Kirkegaard 1995).

Η πρωτεΐνη 2C είναι σε υψηλό βαθμό συντηρημένη στην οικογένεια των Picorna ιών. Παρουσιάζει δραστικότητα ATPάσης που είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γενώματος (Phister et al., 1999, Wimmer et al., 1999). Είναι προσδεσμένη σε μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και συμβάλει στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής (Bienz et al., 1990). Επίσης, παίζει σημαντικό ρόλο στην καψιδίωση του ιϊκού RNA και αναστέλλει την πρωτεολυτική ικανότητα των 3C και 3CD πρωτεασών. Τέλος η 2C παίζει σημαντικό ρόλο στην έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου ενώ η πρόσδεσή της στο 3' cloverleaf του αρνητικής πολικότητας κλώνου προάγει την εκκίνηση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας κλώνου (Banerjee et al., 2001).

Η πρωτεΐνη 3A αποτελεί μέρος του συμπλόκου αντιγραφής. Προσδένεται στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου και στρατολογεί το σύμπλεγμα πρωτεϊνών GBF1/Arf1, το οποίο επάγει αλλαγές στις μεμβράνες και τον σχηματισμό

κυστιδίων αντιγραφής του ιού (Belon et al., 2007, Strauss et al., 2003). Η 3A σταματάει την πρωτεϊνική κυκλοφορία από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σύμπλεγμα Golgi καθελώνοντάς τα σύμπλοκα μεταφοράς πρωτεϊνών στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου. Έτσι δρα και κατά της απόπτωσης του κυττάρου καθώς πρωτεϊνικά μόρια που σχετίζονται με την απόπτωση, δεν φτάνουν ποτέ στην κυτταρική επιφάνεια (Kondratova et al., 2005). Εκτός από τον ρόλο στην πρόσδεση σε μεμβράνες, η αμινοτελική περιοχή της 3A είναι παίζει σημαντικό ρόλο και στη σύνθεση του θετικής πολικότητας κλώνου καθώς και στη σωστή επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Towner et al., 2003).

Η πρόδρομη πρωτεΐνη 3AB είναι και αυτή μέλος του συμπλόκου αντιγραφής. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη συναρμολόγηση του συμπλόκου αντιγραφής του ιού και προσδένει την ιική 3D πολυμεράση, διεγείροντας έτσι τη δραστηριότητα επιμήκυνσης της αλυσίδας του RNA (Fujita et al., 2007). Επίσης προσδένει το λειτουργικό ενδιάμεσο 3CD και διεγείρει την αυτοκατάλυσή του σε 3C και 3D. Μια ακόμη σημαντική ιδιότητα της 3AB είναι ότι παίζει το ρόλο μορίου συνοδού (chaperon). Συγκεκριμένα, διπλώνει το ιικό RNA στην ευνοικότερη θερμοδυναμικά διαμόρφωση, «ξεδιπλώνει» σύνθετες δευτεροταγείς RNA δομές προκειμένου να προσδεθεί η ιική πολυμεράση και διαχωρίζει τους κλώνους θετικής και αρνητικής πολικότητας κατά τη δημιουργία του αντιγραφικού ενδιάμεσου. Επίσης προάγει και τον ανασυνδυασμό τοποθετώντας ατελώς νεοσυντιθέμενα μόρια σε διαφορετικό καλούπι προκειμένου να ολοκληρωθεί η σύνθεσή τους (DeStefano et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 3B (VPg) είναι μια μικρή πρωτεΐνη 22 αμινοξέων και βρίσκεται προσδεσμένη στο 5' άκρο του ιϊκού γενώματος, μέσω ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ του υδροξυλίου του καταλοίπου τυροσίνης στη θέση 3 και της φωσφορικής ομάδας της ουρακίλης του ιϊκού γενώματος. Στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, η VPg συναντάται με την μορφή VPgUpU. Η ουριδιλιωμένη αυτή μορφή χρησιμεύει σαν εκκινητικό μόριο κατά την ιική αντιγραφή (Lyle et al., 2002). Τα αμινοξέα 14, 17 και 20 της VPg παίζουν σημαντικό ρόλο κατά την ουριδιλίωσή της από την 3D ιική πολυμεράση (Schein et al., 2006).

Η πρωτεΐνη 3C, είναι μια πρωτεάση κυστεΐνης και υδρολύει δεσμούς μεταξύ γλουταμίνης και γλυκίνης. Η 3C μαζί με το πρόδρομό της μόριο 3CD, είναι υπεύθυνες για την πρωτεολυτική επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης (Marcotte et al., 2007). Η 3C στα αρχικά στάδια της μόλυνσης διεγείρει την ιική μετάφραση με 2 διαφορετικές δράσεις. Αποκόπτει το καρβοξυτελικό άκρο της κυτταρικής πρωτεΐνης La, το οποίο περιέχει αλληλουχία τοποθέτησης της La στον πυρήνα, με αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης La στο κυτταρόπλασμα, η οποία

διεγείρει την ιική μετάφραση, προσδενόμενη στο IRES. Επίσης, η 3C αποκόπτει την πρωτεΐνη PABP μπλοκάροντας με αυτόν τον τρόπο την κυτταρική μετάφραση (Kuyumcu-Martinez et al., 2004). Τέλος, η 3C αποκόπτει την PTB (Polypyrimidine Tract Binding Protein) η οποία προάγει την ιική μετάφραση, ανοίγοντας έτσι τον δρόμο για την εκκίνηση της ιικής αντιγραφής (Back et al., 2002). Και οι δύο πρωτεάσες 3C και 2A αναστέλλουν την κυτταρική μεταγραφή και μετάφραση. (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

Η πρωτεΐνη 3CD παρουσιάζει ισχυρότερη δραστικότητα πρωτεάσης από την 3C, αλλά δεν παρουσιάζει δραστικότητα πολυμεράσης (Marcotte et al., 2007). Η 3CD διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ιική αντιγραφή. Ειδικότερα, συμβάλλει στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής «στρατολογώντας» το σύμπλοκο πρωτεϊνών BIG1, BIG2/Arf στις μεμβράνες του ενδοπλασματικού δικτύου (Belon et al., 2007). Επίσης, μέσω του κοψίματος του καρβοξυτελικού άκρου της PCBP2 προκαλεί το τέλος της ιικής μετάφρασης και σηματοδοτεί την εκκίνηση της ιικής αντιγραφής (Perera et al., 2007). Η 3CD διαθέτει ικανότητες πρόσδεσης RNA με συνέπεια η πρόσδεσή της στο cloverleaf και στο Cis Response Element (CRE) να διεγείρει την αντιγραφή και την ουριδιλίωση της VPg αντίστοιχα (Paul et al., 2000). Τέλος, η 3CD εξαιτίας μιας αλληλουχίας πυρηνικής τοποθέτησης (Nuclear Localisation Signal) που υπάρχει στο 3D τμήμα της, εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου και αυτοκαταλύεται σε 3C και 3D. Στο εσωτερικό του πυρήνα η 3C πλέον, πρωτεολύει μια σειρά μεταγραφικών παραγόντων, σταματώντας με αυτόν τον τρόπο τη μεταγραφική μηχανή του κυττάρου (Weidmann et al., 2003).

Η πρωτεΐνη 3D αποτελεί την RNA πολυμεράση των picorna ιών. Έχει τη δομή χεριού και αποτελείται από τις περιοχές του αντίχειρα, της παλάμης και των τεσσάρων δακτύλων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των καταλοίπων φαινυλαλανινών 30 και 34 του δείκτη και των υδροφοβικών περιοχών του αντίχειρα, σταθεροποιούν τη 3D (Hansen et al., 1997). Το ενεργό κέντρο της 3D βρίσκεται στην περιοχή της παλάμης και αποτελείται από τα αμινοξέα γλυκίνη 327, ασπαραγινικό 328 και ασπαραγινικό 329. Η 3D^{pol} είναι το κύριο ένζυμο που χρησιμοποιεί ο ιός κατά την αντιγραφή του. Έχει όμως 4 διαφορετικές δράσεις: μπορεί να συνθέτει RNA χρησιμοποιώντας σαν εκκινητικό μόριο την VPg πρωτεΐνη, έχει την ικανότητα να παράγει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA, έχει δραστηριότητα ελικάσης που ξεδιπλώνει τα σημεία όπου το RNA έχει δημιουργήσει διπλή έλικα κατά το στάδιο επιμήκυνσης της αντιγραφής και τέλος, είναι ικανή να προσθέτει την αδενυλιωμένη ουρά στο 3' άκρο του RNA και να συμβάλει έτσι στην ολοκλήρωση της σύνθεσης του θετικής πολικότητας ιικού RNA (Pfister et al., 1999).

1.3.3 3'-μη μεταφραζόμενη περιοχή – 3'-UTR

Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3'-UTR) αποτελείται από περίπου 70 νουκλεοτίδια και σχηματίζει μια δομή ψευδοκόμβου. Στο τέλος της η 3'-UTR φέρει μια πολυ(A) ουρά, η οποία σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά mRNA, κωδικοποιείται γενετικά από τον ίδιο τον ιό. Η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του ιικού RNA, στην αντιγραφή του ιού και τη μολυσματικότητα (Rohll et al., 1995, Korecka 1999).

Η αλληλεπίδραση της 3' UTR με το IRES διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ιικής μετάφρασης. Έχει αποδειχθεί ότι η 3CD σε σύμπλοκο με την 3AB καθώς και μια πρωτεΐνη του κυττάρου ξενιστή μεγέθους 34-36 kDa, αλληλεπιδρούν με την 3'UTR (Todd et al. 1995). Η πρόσδεση κυτταρικών παραγόντων στην 3' UTR φέρνει την πολυ(A)ουρά κοντά στην 3D διεγείροντας με αυτόν τον τρόπο την εκκίνηση του κλώνου αρνητικής πολικότητας κατά την ιική αντιγραφή. Μεταλλάξεις οι οποίες καθιστούν ασθενέστερη την πρόσδεση της 3' UTR με τον κυτταρικό παράγοντα, έχουν επιβλαβή αποτελέσματα στον ιικό πολλαπλασιασμό. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση αυτή φαίνεται να είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιού, πιθανότατα στο επίπεδο σύνθεσης του RNA κλώνου αρνητικής πολικότητας (Herold and Andino, 2001). Ωστόσο, η 3' UTR δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου (Dobrikova et al., 2003).

Η πολυ(A) ουρά των Echo ιών έχει μήκος περίπου 60 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στις διαδικασίες της αντιγραφής, μέσω μιας RNA δευτεροταγούς δομής θηλιάς (Jacobson et al., 1993), και της μετάφρασης του ιικού γενώματος (Racaniello 2007). Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της PABP στην πολυ(A) ουρά έχει σαν αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του ιικού γενώματος που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Silvestri et al., 2006).

1.4 Κύκλος ζωής των εντεροϊών

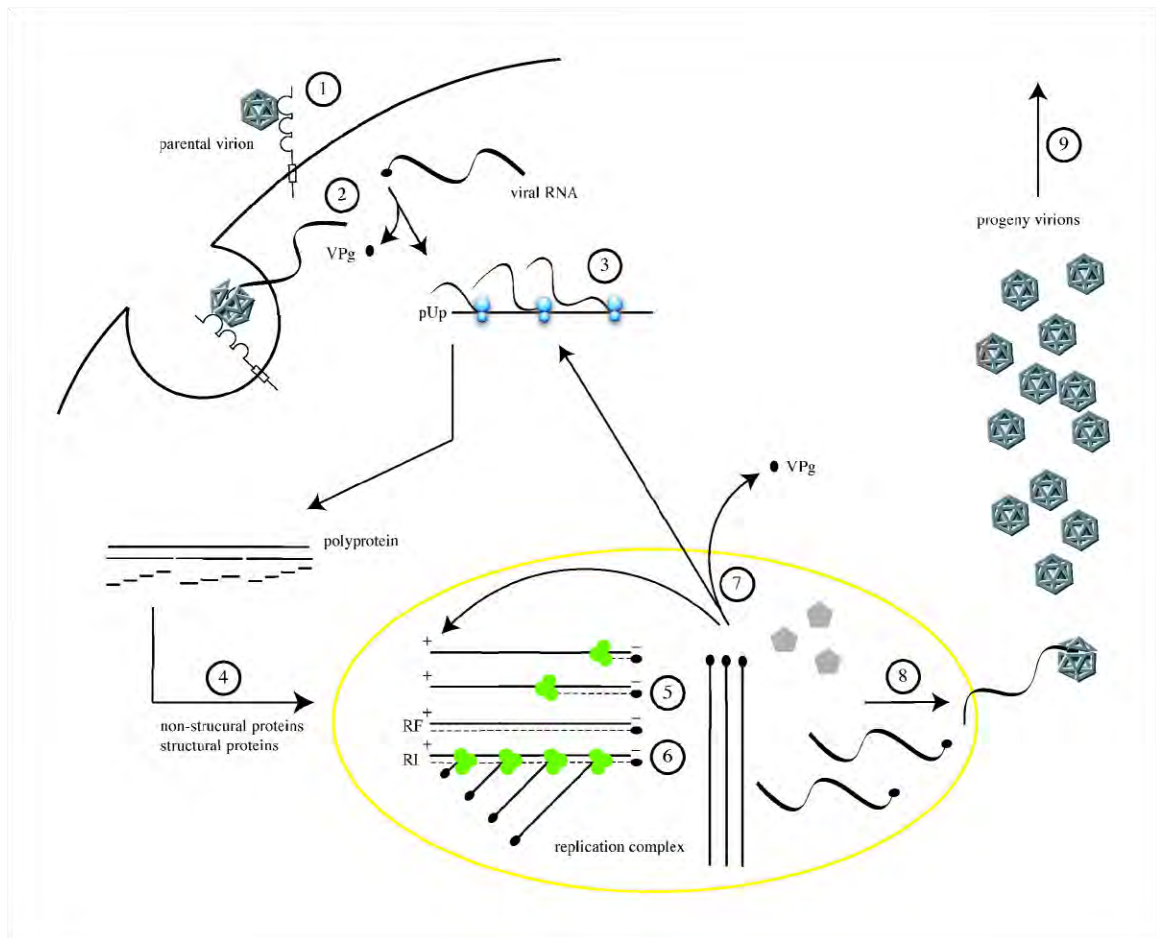
Ο κύκλος ζωής των Echo ιών είναι όμοιος με τον κύκλο ζωής όλων των εντεροϊών και αρχίζει με την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή και την είσοδο του ιικού γενώματος στο εσωτερικό του κυττάρου. Στο κυτταρόπλασμα, η VPg πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη στην 5'-UTR περιοχή του ιικού γενώματος αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου ξενιστή.

Ακολουθεί η μετάφραση του ιικού γενώματος σε μία πολυπρωτεΐνη, από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Η πολυπρωτεΐνη υφίσταται πρωτεολυτική διάσπαση από τρεις ικές πρωτεάσες ($2A^{pro}$, $3C^{pro}$ και $3CD^{pro}$) ώστε να παραχθούν οι λειτουργικές ικές πρωτεΐνες. Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από το IRES γενετικό στοιχείο ενώ η διαδικασία της πρωτεόλυσης από εξειδικευμένες αμινοξικές αλληλουχίες που είναι δίπλα στα σημεία διάσπασης. Η πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου ξενιστή αναστέλλεται από τη δράση της $2A^{pro}$ που επάγει τη διάσπαση του παράγοντα eIF-4G, ενώ αναστέλλεται και η μεταγραφή του κυττάρου ξενιστή από την $3C^{pro}$.

Η αντιγραφή του RNA λαμβάνει χώρα σε μεμβρανικά κυστίδια, ο σχηματισμός των οποίων προάγεται από τις 2BC και 3C ικές πρωτεΐνες. Η έναρξη της σύνθεσης του RNA από την $3D^{pol}$ απαιτεί την ουριδυλιωμένη VPg ική πρωτεΐνη ως εκκινητή. Το θετικής πολικότητας RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού αρνητικής πολικότητας κλώνου, παράγοντας ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). Από τον αρνητικής πολικότητας κλώνο, συντίθενται πολλοί κλώνοι θετικής πολικότητας παράγοντας ένα αντιγραφικό ενδιάμεσο (replicative intermediate, RI).

Τα νεοσυντιθέμενα θετικής πολικότητας μόρια RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εκμαγείο για i) την αντιγραφή και παραγωγή νέων μορίων RNA θετικής πολικότητας, ii) την πρωτεϊνοσύνθεση και iii) την καψιδίωση για την παραγωγή μολυσματικών ικών σωματιδίων, αφού συνδεθεί στο 5' άκρο του η πρωτεΐνη VPg.

Την καψιδίωση του RNA ακολουθεί η αντίδραση ωρίμανσης του καψιδίου η οποία συμβαίνει με την αυτοκαταλυτική διάσπαση της πρωτεΐνης VP0 σε VP2 και VP4 και έχει σαν αποτέλεσμα τη μετατροπή του προ-ιού σε ένα ώριμο μολυσματικό ικό σωματίδιο. Τα ώριμα μολυσματικά σωματίδια απελευθερώνονται με τη λύση του κυττάρου (**Εικόνα 1.7**) (Pfister et al., 1999, De Jesus NH, 2007).



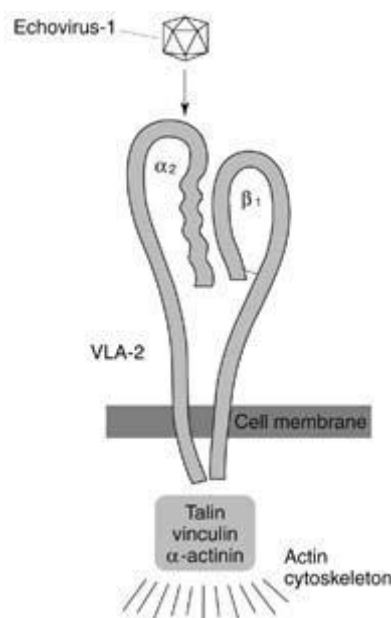
Εικόνα 1.7 : Ο κύκλος ζωής των εντεροϊών. (1) Ο ιός προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια, μέσω του υποδοχέα του. (2) Ο υποδοχέας μεσολαβεί στην αποσταθεροποίηση του ιικού καψιδίου και το ιικό RNA εξέρχεται από το καψίδιο και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. (3) Η ιική πρωτεΐνη VPg αποκόπτεται από μια φωσφοδιεστεράση του κυττάρου και ακολουθεί η μετάφραση του ιικού RNA από τα ριβοσώματα του κυττάρου. (4) Η πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης αποδίδει τις ώριμες δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. (5) Το θετικής πολικότητας RNA λειτουργεί σαν εκμαγείο για τη σύνθεση του συμπληρωματικού αρνητικής πολικότητας κλώνου, παράγοντας ένα δίκλωνο μόριο RNA (replicative form, RF). (6) Η έναρξη της σύνθεσης πολλών κλώνων θετικής πολικότητας από έναν αρνητικής πολικότητας κλώνο παράγει το αντιγραφικό ενδιάμεσο (RI). (7) Τα νεοσυντιθέμενα θετικής πολικότητας μόρια RNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εκμαγείο για τη μετάφραση, για την αντιγραφή ή (8) για να υποστούν καψιδίωση και να προκαλέσουν τη διάσπαση ωρίμανσης της VP0, μέσω της οποίας παράγονται νέα ιικά σωματίδια. (9) Με τη λύση του κυττάρου απελευθερώνονται τα μολυσματικά ιικά σωματίδια. (De Jesus NH, 2007)

1.4.1 Υποδοχείς των Echo ιών

Οι σημαντικότεροι καθοριστικοί παράγοντες της έναρξης της μόλυνσης από κάποιον ιό, είναι διάφορα μόρια της επιφάνειας των κυττάρων που λειτουργούν ως υποδοχείς. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία υποδοχέων στους Picorna ιούς αλλά και ανάμεσα στα μέλη του γένους των εντεροϊών. Έχουν βρεθεί δύο τύποι υποδοχέων για τους Echo ιούς, η ιντεγκρίνη VLA-2 και ο παράγοντας επιτάχυνσης της αλλοίωσης, DAF (Human Decay Accelerating Factor), CD55.

Η ιντεγκρίνη VLA-2 (Very Late Antigen, CD49b/CD29), είναι μια ετεροδιμερής γλυκοπρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας, η οποία συντίθεται από μια $\alpha 2$ υπομονάδα 150kDa και μια $\beta 1$ υπομονάδα 130kDa (**Εικόνα 1.8**). Η λειτουργία της είναι η προσκόλληση των κυττάρων στην εξωκυττάρια θεμέλια ουσία. Μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση του κυττάρου με τις πρωτεΐνες της θεμέλιας ουσίας, κολλαγόνο και λαμινίνη, οι οποίες είναι οι φυσικοί προσδέτες της (Hemler 1990). Ταυτόχρονα συμβάλλει στην ενδοκυτταρική επικοινωνία με στοιχεία του κυτταροσκελετού (Hynes, 1987), με ενδοκυττάριους συνδέτες την ταλίνη, τη βινκουλίνη και την α -ακτίνη (Ellices et al., 1989).

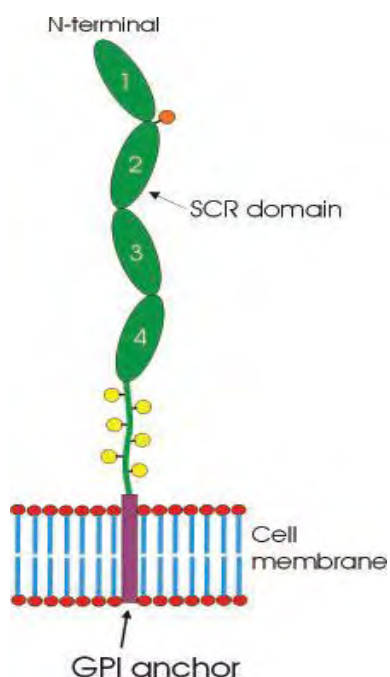
Η VLA-2 ιντεγκρίνη, έχει επίσης ταυτοποιηθεί ως ο υποδοχέας του Echo ιού τύπου 1, μέσω του οποίου προσκολλάται στο κύτταρο ξενιστή και αρχίζει τη μόλυνση του (Bergelson et al., 1992, Bergelson et al., 1993). Στην $\alpha 2$ υπομονάδα, υπάρχει μια δομή I (inserted) 200 αμινοξέων, πάνω στην οποία προσδένονται τόσο το κολλαγόνο, όσο και ο Echo1 ιός (Bergelson et al., 1994, Kamata et al., 1994). Ωστόσο, οι θέσεις πρόσδεσης είναι διαφορετικές και οι αλληλεπιδράσεις με το κολλαγόνο και τον Echo1 ιό ρυθμίζονται με διαφορετικούς μηχανισμούς (Bergelson et al., 1993). Ο Echo1 ιός, για την είσοδό του στο κύτταρο βασίζεται στην ενεργοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία εξαρτώνται από την συναρμολόγηση της $\alpha 2\beta 1$, αλλά, αντίθετα με άλλους προσδέτες, δεν απαιτεί την ενεργοποιημένη διαμόρφωση της ιντεγκρίνης (Jokinen et al., 2010).



Εικόνα 1.8: Ιντεγκρίνη VLA2 – Υποδοχέας του Echo ιού τύπου 1.

Πολλοί ορότυποι των Echo ιών (3, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 21, 24, 25, 29, 30, 33) χρησιμοποιούν τον DAF (CD55) ως κυτταρικό υποδοχέα (Bergelson et al., 1994, Ward et al., 1994, Powell et al., 1998). Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδilo-ινοσιτόλης και βρίσκεται στην επιφάνεια των περισσότερων κυττάρων, προστατεύοντας τα από την επίθεση από το ίδιο το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ο DAF είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών που ρυθμίζουν την ενεργοποίηση του συμπληρώματος με την πρόσδεση και την επιτάχυνση της αποικοδόμησης των κονβερτασών, των κεντρικών ενζύμων ενίσχυσης του καταρράκτη του συμπληρώματος (Brodbeck et al., 1996, Kuttner-Kondo et al., 2007, Kuttner-Kondo et al., 2001, Medof et al., 1987, Lublin et al., 1989).

Η λειτουργική, εξωκυτταρική περιοχή του DAF αποτελείται από τέσσερις μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (short consensus repeats, SCR1, -2, -3, και -4), 60aa η κάθε μια, ακολουθούμενες από μια περιοχή 97aa O-γλυκοσυλιωμένη, πλούσια σε σερίνη και θρεονίνη, το οποίο είναι συνδεδεμένο στην πλασματική μεμβράνη μέσω μιας άγκυρας γλυκοσυλιωμένης φωσφατίδilo-ινοσιτόλης (**Εικόνα 1.9**) (Lublin et al., 1989, Kuttner-Kondo, et al., 1996). Ολόκληρο το μόριο DAF είναι σχετικά άκαμπτο, και έχει τη διαμόρφωση μιας εκτεταμένης ράβδου με τις διαστάσεις 160 x 50 x 30 Å (Lukacik et al., 2004).



Εικόνα 1.9: Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του DAF. (He et al., 2002)

Κάθε SCR περιοχή είναι διπλωμένη σε μια β δομή που σταθεροποιείται από δισουλφιδικές γέφυρες. Οι δομές των SCR2 και -3 περιοχών και οι κρυσταλλικές δομές των SCR3 και -4 περιοχών όπως και τον ολόκληρο ο ανθρώπινος DAF έχουν καθοριστεί (Lukacik et al., 2004, Uhrinova et al., 2003, Williams et al., 2003).

Οι Echo ιοί που χρησιμοποιούν τον DAF ως υποδοχέα, προσδένονται στην SCR3 περιοχή και κάποιοι από αυτούς αλληλεπιδρούν επιπρόσθετα με την SCR2 ή/και την SCR4. Από μόνη της όμως η πρόσδεση στον DAF δεν είναι αρκετή για την έναρξη ενός παραγωγικού για τον ιό μολυσματικού κύκλου (Shafren et al., 1997).

Η δομή του συμπλέγματος Echo7 με τον DAF καθορίστηκε με ανάλυση κρυομικροσκοπίας, η οποία έδειξε ότι οι περιοχές σύνδεσης τοποθετούνται κοντά στον 2^ο άξονα συμμετρίας του εικοσάεδρου, στην υπερμεταβλητή περιοχή της VP2 ακριβώς έξω από το «νότιο» άκρο της αύλακας, καθώς επίσης και σε υπερμεταβλητή περιοχή της VP3, σε αντίθεση με άλλα συμπλέγματα εντεροϊών όπου η αύλακα είναι η θέση πρόσδεσης του υποδοχέα.

Αυτή η θέση πρόσδεσης δείχνει ότι ο DAF έχει διαφορετικό ρόλο στην είσοδο του ιού στο κύτταρο σε σχέση με τους υποδοχείς ανοσοσφαιρίνης. Είναι σημαντικός για την πρόσδεση των ιικών σωματιδίων στο κύτταρο ξενιστή, αλλά πιθανόν όχι για την έναρξη αποσυναρμολόγηση, όπως στους υποδοχείς που συνδέονται στην αύλακα. Έτσι ο μηχανισμός εισόδου στο κύτταρο διαφέρει για τους εντεροϊούς που προσδένονται στον DAF (He et al., 2002).

Επιπλέον, ο DAF δεν μπορεί να μετατρέψει τα ιικά σωματίδια σε σωματίδια A και η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα είναι αντιστρεπτή (Powel et al., 1998). Επομένως, ένας δεύτερος υποδοχέας ίσως είναι απαραίτητος για την αλληλεπίδραση με την αύλακα και αποσυναρμολόγηση του ιικού καψιδίου (He et al., 2002).

1.4.2 Μετάφραση του ιικού RNA

Όταν το θετικής πολικότητας ιικό RNA εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, δεν μπορεί να αντιγραφεί απ' ευθείας, καθώς κανένα ιικό ένζυμο δεν μεταφέρεται στο κύτταρο και δεν υπάρχει κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση. Επομένως πρέπει να προηγηθεί η μετάφραση των ιικών γονιδίων. Αρχικά, η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA απομακρύνεται από μια κυτταρική φωσφοδιεστεράση (VPg-Unlinkase) και το RNA μεταφράζεται απευθείας από τα ριβοσώματα του κυττάρου σε μια πολυπρωτεΐνη (Gulevich et al., 2001, Ambros et al., 1980).

Στη μετάφραση του ιικού RNA συμμετέχει ένα γενετικό στοιχείο της 5'UTR περιοχής του ιικού γενώματος, γνωστό ως IRES (internal ribosome entry site) το οποίο φαίνεται να είναι απαραίτητο για την σωστή πρόσδεση των ριβοσωμάτων. Το στοιχείο IRES αποτελείται από υψηλά διατηρημένες δευτεροταγείς δομές RNA και περιέχει μια χαρακτηριστική περιοχή ολιγοπυριμιδίνης η οποία ακολουθείται από ένα πολύ συντηρημένο σιωπηλό κωδικόνιο AUG στο 3' άκρο (μοτίβο Y_n-X_m-AUG , Y =πυριμιδίνη, $n=6-8$, X =οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και $m=18-20$ νουκλεοτίδια) (Pfister et al. 1999, Ehrenfeld E. και Semler B. L. 1995). Το ενεργό κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται περίπου 100nt καθοδικά του IRES (Wimmer et al.1993).

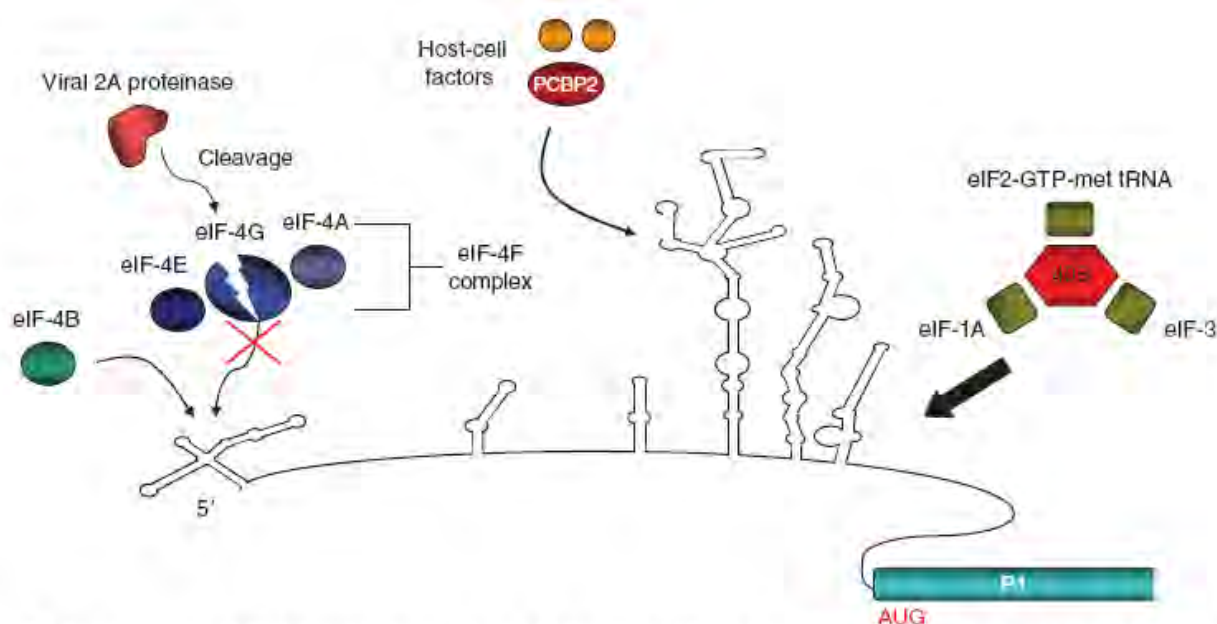
Κατά την έναρξη της μετάφρασης, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S κατευθύνεται στην περιοχή του IRES που περιέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG, πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για τη μετάφραση του ιικού RNA είναι απαραίτητοι σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIFs) των ευκαρυωτικών κυττάρων, με εξαίρεση τον eIF4E ο οποίος προσδένεται στην καλύπτρα cap των ευκαρυωτικών mRNAs (Ochs K. et al., 2002). **(Εικόνα 1.10).**

Στην cap- εξαρτώμενη μετάφραση των κυτταρικών mRNA οι παράγοντες eIFG1, eIF4E και ο eIF4A συναρμολογούν το σύμπλοκο eIF4F το οποίο αλληλεπιδρά με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S μέσω του eIF3 για να σχηματίσει το σύμπλοκο 43S. Στη συνέχεια το σύμπλοκο 43S προσδένεται στο 5'cap του mRNA και δημιουργείται το σύμπλοκο 48S το οποίο κινείται με κατεύθυνση 5→3 μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο. Κατά τη μετάφραση του ιικού RNA ο παράγοντας eIF4G αλληλεπιδρά απευθείας με το RNA και συνδέεται με τον eIF4A προάγοντας την δημιουργία του 48S συμπλόκου. Αφού συνδεθεί η μικρή υπομονάδα στο RNA κινείται με κατεύθυνση 5'→3' μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο (Prevot et al., 2003).

Στο στοιχείο IRES, εκτός από τους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, προσδένονται και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, οι οποίες ενισχύουν τη

μετάφραση, ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ της μετάφρασης και της αντιγραφής του ιϊκού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί παράγοντες ITAFs ειδικοί για τα στοιχεία IRES, τέσσερις από τους οποίους είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: η πρωτεΐνη PTB (polypyrimidine tract-binding protein) των 57kDa η οποία προσδένεται στην πολυπυριμιδική περιοχή, η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP2 [poly(rC)-binding protein2] 39 kDa, το αυτοαντιγόνο La 52kDa και η Unr (Upstream of N-Ras). Ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅ μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Kerstin Ochs et al.2002, Murray et al, 2001, Costa-Mattioli et al, 2004, Boussadia et al., 2003).Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς από μόνες τους για την έναρξη της μετάφρασης (Hunt S.L., 1999), εκτός από την Unr η οποία είναι πράγματι αναγκαία σ' αυτή τη διαδικασία (Boussadia et al., 2003).

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται τελικά σε μια πολυπρωτεΐνη, η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ιικές πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C και 3CD, προκειμένου να δημιουργηθούν οι λειτουργικές ιικές πρωτεΐνες.

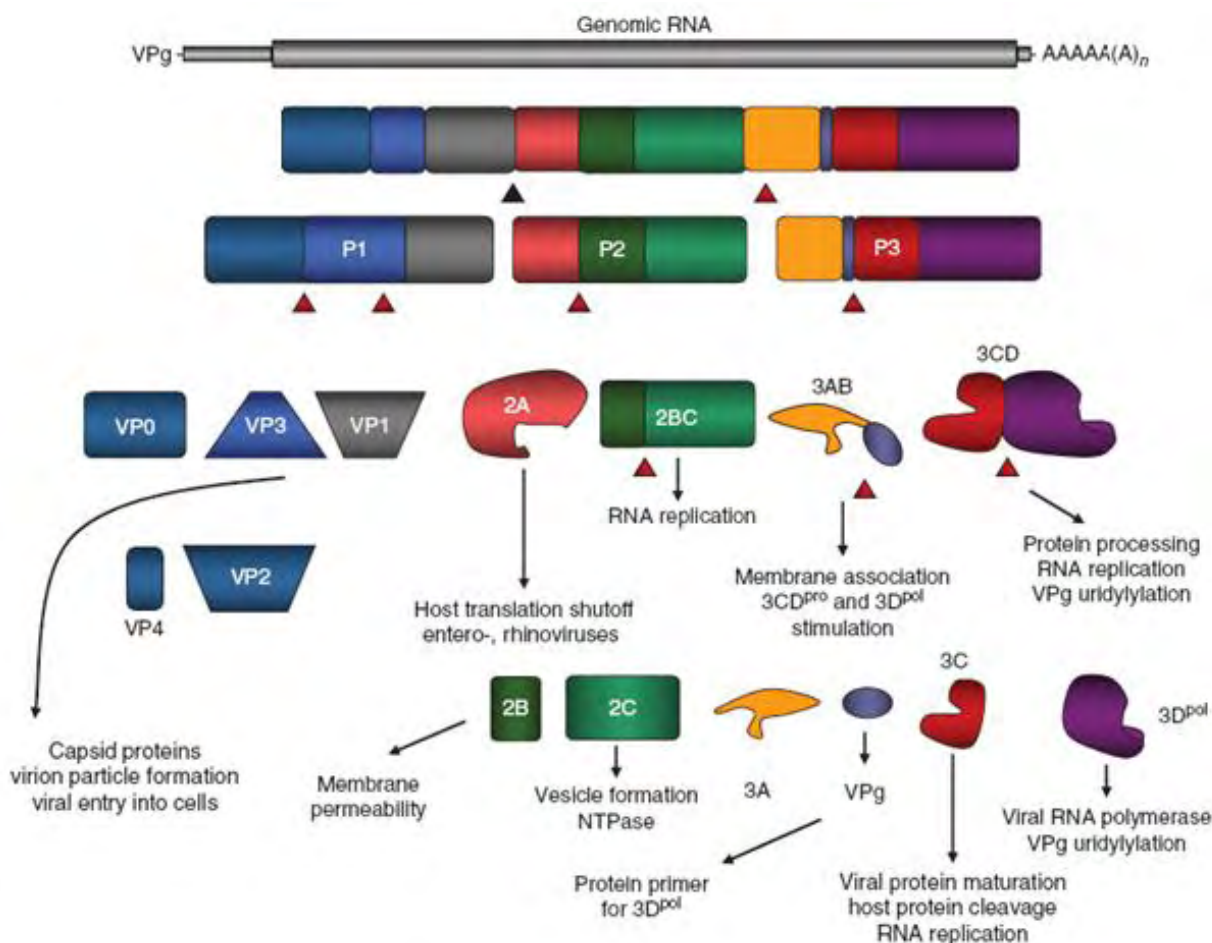


Εικόνα 1.10: Ιικοί και κυτταρικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην cap-ανεξάρτητη RNA μετάφραση των Εντεροϊών. (Semler and Ertel, 2008)

1.4.3 Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης

Το σύνολο των ιικών πρωτεϊνών, προκύπτουν από την πρωτεόλυση της ασταθούς πολυπρωτεΐνης 250kDa, η οποία κωδικοποιείται από το μονοκιστρονικό γονιδίωμα των εντεροϊών. Η πρωτεόλυση επιτελείται από πρωτεάσες που κωδικοποιούνται από το ίδιο το ιικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη αποτελείται από τρία πρόδρομα πολυπεπτίδια, P1, P2, P3. Τα προϊόντα του πρόδρομου πολυπεπτιδίου P1 είναι οι δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4, του P2 οι πρωτεΐνες 2A^{pro} (πρωτεάση) 2B και 2C^{ATPase}, και του P3 οι πρωτεΐνες 3A, 3B^{VPg} και η 3D^{pol} (RNA πολυμεράση). Σε ενδιάμεσα στάδια δημιουργούνται πρόδρομα μόρια των παραπάνω μη δομικών πρωτεϊνών, όπως τα 2BC, 3AB και 3CD^{pro}, τα οποία έχουν διαφορετικές λειτουργίες από τις αντίστοιχες ώριμες πρωτεΐνες (Agol et al., 1999, Wimmer et al., 1993). Η διάσπαση της ιικής πολυπρωτεΐνης ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (**Εικόνα 1.11**)

Το αρχικό στάδιο της πρωτεόλυσης περιλαμβάνει τη cis-διάσπαση του δεσμού



Εικόνα 1.11: Επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης. Καθώς η πολυπρωτεΐνη μεταφράζεται, η αυτοκατάλυση από τις ιικές πρωτεάσες 2A ή 3C/3CD έχει σαν αποτέλεσμα τα πρόδρομα μόρια P1, P2, P3, από τα οποία προκύπτουν οι δομικές (P1) και μη δομικές (P2 και P3) πρωτεΐνες. Τα τρίγωνα αντιστοιχούν στις θέσεις πρωτεόλυσης από τις ιικές πρωτεάσες (2A: Μαύρο, 3C/3CD: Κόκκινο) (Semler and Ertel, 2008)

(Thr-Gly) ή Phe-Gly) στο N-τελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης από την 2A^{pro} με αποτέλεσμα την αποκοπή της πρόδρομης πρωτεΐνης P1, διαχωρίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες. Στο δεύτερο στάδιο, μέσω cis-διάσπασης από την 3CD^{pro}, απελευθερώνεται η P3 από το πρόδρομο πολυπεπτίδιο P2-P3. Ακολουθεί μια σειρά αντιδράσεων trans-διάσπασης από την 3CD^{pro} και απελευθερώνονται, από τις πρόδρομες μορφές τους, οι μη δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3. Η τελευταία αντίδραση πρωτεόλυσης, είναι η διάσπαση της VP0 στις VP2 και VP4 μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού. Αποτελεί και το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του καψιδίου και πραγματοποιείται κατά τη συναρμολόγηση των ιικών σωματιδίων. (Pfister et al., 1999, Agol et al., 1999, Semler and Ertel, 2008)

1.4.4 Αντιγραφή του ιικού RNA

Όπως όλοι οι RNA ιοί, οι εντεροϊοί κωδικοποιούν μια RNA εξαρτόμενη RNA πολυμεράση η οποία συνθέτει ειδικά RNA με εκμαγείο ένα ιικό RNA, το οποίο απελευθερώνεται από το καψίδιο στο κυτταρόπλασμα χωρίς ιικές πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, η μεταγραφή της κωδικής περιοχής πρέπει να προηγηθεί της αντιγραφής, έτσι ώστε να παραχθεί η 3D πολυμεράση και οι άλλες ιικές πρωτεΐνες της αντιγραφής (Semler and Ertel, 2008)

Μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γενώματος και την έκφραση των ιικών γονιδίων, το θετικής πολικότητας RNA των εντεροϊών χρησιμοποιείται για τον αυτοδιπλασιασμό του, δηλαδή για την δημιουργία νέων μορίων RNA με την ίδια πολικότητα. Απαραίτητη είναι η παρεμβολή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA με αντίθετη πολικότητα, το οποίο χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας της θυγατρικής γενιάς. (Kirkegaard et al 1999, D.J. Barton 2003).

Η διαδικασία της αντιγραφής, ξεκινά, με την ολοκλήρωση της μετάφρασης, μετά την απομάκρυνση των ριβοσωμάτων από το RNA. Λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Απαραίτητη είναι η δημιουργία ενός συμπλόκου αντιγραφής στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των κυστιδίων, το οποίο αποτελείται από ιικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Επίσης μέρος του συμπλόκου αντιγραφής αποτελεί και το ιικό RNA, το οποίο περιέχει cis-acting γενετικά στοιχεία

απαραίτητα για την σύνθεση του (-)RNA, όπως η δομή “cloverleaf” που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή (Egger et al., 2000, Egger et al., 2002, Semler and Ertel, 2008).

Η έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου RNA, απαιτεί την κυκλοποίηση του γενώματος, η οποία επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ιικών και κυτταρικών παραγόντων. Σχηματίζεται μια «γέφυρα πρωτεϊνών» μεταξύ των PCBP2 και 3CD που είναι συνδεδεμένες στο cloverleaf και των PABP και 3CD που είναι συνδεδεμένες στην πολυ(Α)ουρά και την 3'UTR αντίστοιχα (Lyons et al., 2001, Semler and Ertel, 2008) .

Η μετάφραση και η αντιγραφή, δεν μπορούν να συμβαίνουν ταυτόχρονα σε ένα μόριο RNA. Με την κυκλοποίηση του, εμποδίζεται η πρόσβαση των κυτταρικών ριβοσωμάτων στο RNA, επάγοντας έτσι την μετάβαση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al. 1993, Semler and Ertel, 2008). Επιπλέον, αυτός ο μηχανισμός αντιγραφής εξασφαλίζει ότι μόνο τα πλήρους μήκους RNA θα αποτελέσουν εκμαγεία για την 3D^{pol}.

Η δομή cloverleaf της 5'UTR παίζει σημαντικό ρόλο καθώς στη θηλιά D σχηματίζεται ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο που αποτελείται από τη ιική πρωτεΐνη 3CD καθώς και την κυτταρική πρωτεΐνη PCBP, το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση θετικών και αρνητικών αλυσίδων RNA. Το σύμπλοκο αυτό αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη 3AB, η οποία περιέχει υδρόφοβες περιοχές μέσω των οποίων συνδέεται σε κυτταροπλασματικές μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή (Towner et al., 2006).

Στη συνέχεια, η 3CD πρωτεάση, καταλύει την πρωτεόλυση της 3AB, σε 3A και VPg καθώς και την διάσπασή της σε 3C^{pro} και 3D^{pol} (Murray & Barton 2003). Στην επιφάνεια της 3D, η VPg, η πολυ(Α) ουρά και UTP-Mg²⁺ προσδένονται σε κατάλληλη διαμόρφωση, τέτοια ώστε να καταλύεται η ουριδιλίωσή της VPg σε VPgrUpU, με εκμαγείο την πολυ(Α) ουρά (Schein et al., 2006).

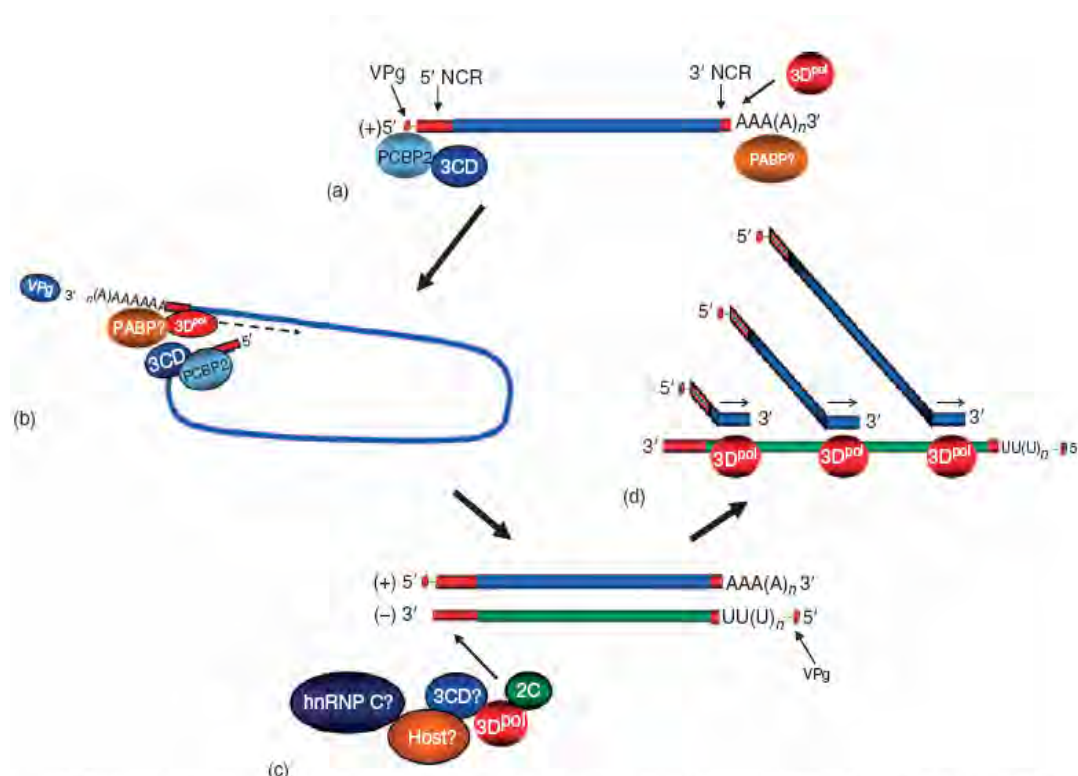
Το ουριδιλιωμένη VPg (VPgrUpU) προσδένεται στην 3' πολύ(Α) ουρά και χρησιμοποιείται από την 3D^{pol} σαν εκκινητήριο μόριο για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Μετά το τέλος της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου δημιουργείται ένα δίκλωνο μόριο RNA γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο RF (replicative form). (Semler and Ertel, 2008).

Εκτός από τη δομή cloverleaf και την πολύ(Α) ουρά, μια εσωτερική RNA αλληλουχία, γνωστή ως CRE, είναι επίσης απαραίτητη για τον κύκλο αντιγραφής. Είναι ένα cis-acting δομικό στοιχείο το οποίο βρίσκεται στην 2C γενωμική περιοχή

και σχηματίζει μια μικρή (50-100nt) δομή φουρκέτας, με μια διατηρημένη AAACAC αλληλουχία.

Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου, η VPg ουριδιλιώνεται σε VPgrUpU, μέσω της πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή μίσχου του CRE και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Το CRE χρησιμοποιείται από την 3D πολυμεράση σαν εκμαγείο για την ουριδιλίωση τη VPg σε VPgrUpU. Κατόπιν, η VPgrUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητής για την σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας από την 3D πολυμεράση με εκμαγείο το RNA(-).

Εχει βρεθεί ότι παράγονται 20 με 50 αντίγραφα θετικής πολικότητας ανά ένα μόριο αρνητικής πολικότητας. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ασύμμετρης αντιγραφής κατά την οποία είναι εφικτή η ταυτόχρονη σύνθεση πολλαπλών κλώνων RNA(+) από έναν μόνο κλώνο RNA(-). Αυτό το μερικώς δίκλωνο RNA σύμπλεγμα, λέγεται αντιγραφικό ενδιάμεσο RI (Murray & Barton, 2003, Semler and Ertel, 2008) (**Εικόνα 1.12**).



Εικόνα 1.12 Μοντέλο του μηχανισμού αντιγραφής του RNA γενώματος των Εντεροϊών. (Semler and Ertel, 2008).

1.4.5 Καψιδίωση – Σχηματισμός των ιικών σωματιδίων

Ο σχηματισμός του καψιδίου έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς είναι σχετικά απλό και τα ενδιάμεσα μόρια μπορούν εύκολα να ανιχνευτούν στα μολυσμένα κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της P1 πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι δομές β-βαρελίου, και ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις της επιφάνειας των δομών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων (Racaniello R. Vincent, 2007)

Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιικού γενώματος στο κύτταρο, δημιουργούνται τα ιικά σωματίδια. Η αντιγραφή του RNA και η καψιδίωση φαίνεται να είναι συζευγμένες διαδικασίες καθώς επιτελούνται και οι δυο πάνω στα ίδια επαγόμενα από τον ιό μεμβρανικά κυστίδια (Ansardi et al., 1996).

Στο πρώτο στάδιο δημιουργίας του ιικού καψιδίου, το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπτίδιο διασπάται από την 3CD^{pro} στις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και δημιουργούν το καψιδιακό 5S πρωτομερές. Τα 5S πρωτομερή, συναρμολογούνται σε 14S πενταμερή (VP0-3-1)₅, η παρουσία των οποίων απαιτείται για την καψιδίωση του ιικού RNA (Verliden et al., 2000). Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή ενώνονται και δημιουργούν το 75S προκαψίδιο, το οποίο με την είσοδο του RNA μετατρέπεται σε προϊκό σωματίδιο (Ansardi et al., 1994, Racaniello R. Vincent, 2007).

Σύμφωνα με ένα από τα μοντέλα σχηματισμού του καψιδίου, το νεοσυντιθέμενο ιικό RNA εισέρχεται μέσω ενός πόρου στα άδεια καψίδια για τον σχηματισμό του προϊοσώματος 150s, στο οποίο η καψιδιακή πρωτεΐνη VP0 δεν έχει διαχωριστεί (Jacobson et al., 1968) . Σύμφωνα με ένα άλλο μοντέλο, τα πενταμερή συναρμολογούνται γύρω από το ιικό RNA για να σχηματίσουν το προ-ιόσωμα (Nugent and Kirkegaard, 1995)

Αυτό το πρώιμο ιικό σωματίδιο δεν είναι σταθερός σχηματισμός εξαιτίας της έλλειψης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών στο εσωτερικό του καψιδίου. Κατά τη διάρκεια του τελευταίου σταδίου της καψιδίωσης, πραγματοποιείται αυτοκαταλυτικά η αντίδραση ωρίμανσης, η οποία είναι απαραίτητη για τη σταθερότητα και τη μολυσματικότητα του ιού (Curry et al., 1997). Το κατάλοιπο της ιστιδίνης 195 της VP2 πρωτεΐνης πιστεύεται ότι καταλύει την υδρόλυση της VP0 σε VP2 και VP4 (maturation cleavage) οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην δημιουργία των σταθερών, ώριμων ιικών σωματιδίων (Hindiyeh et al., 1999).

1.5 Εξέλιξη των εντεροϊών

Οι Echo ιοί, όπως και όλοι οι εντεροϊοί, μπορούν να εξελιχθούν εκτενώς κατά την αντιγραφή τους στο ανθρώπινο έντερο, όπως απεικονίζεται στη γρήγορη εξέλιξή τους κατά τη διάρκεια των επιδημιών σε ανθρώπινους πληθυσμούς. Αυτοί ίσως είναι οι πιο μεταβλητοί εντεροϊοί, με 28 διαφορετικούς οροτύπους. Το γονιδίωμα τους χαρακτηρίζεται από μεγάλη προσαρμοστικότητα και γρήγορη εξέλιξη. Εκτός από τη σταδιακή εξέλιξη λόγω της συσσώρευσης σημειακών μεταλλάξεων, ο RNA ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών ιών μπορεί επίσης να συμβάλει στην ποικιλότητα. (Kopecka Helena, 1999)

1.5.1 Μεταλλάξεις

Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ($4,5 \times 10^{-4}$ μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους εντεροϊούς το οποίο αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των λυτικών RNA ιών (Wimmer et al. 1993). Οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λάθους της ιικής RNA πολυμεράσης ($3D^{pol}$) και την έλλειψη επιδιορθωτικής ικανότητας της, η οποία υπολογίζεται ότι ενσωματώνει $4,5 \times 10^{-4}$ νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής, δηλαδή 1 λάθος νουκλεοτίδιο ανά 2222 βάσεις, λόγω της απουσίας μηχανισμών ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής και επιδιόρθωσης (Ward et al., 1992, Rodriguez-Wells et al., 2001). Αυτό έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των εντεροϊών ώστε να έχουν μικρό γένωμα και να αντιγράφονται κοντά στο όριο της καταστροφής λόγω πολλών μεταλλάξεων. Υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενοτύπων και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη). Ένα άγριο στέλεχος ορίζεται σαν quasi-species όταν ο πληθυσμός του δεν έχει μια μοναδική αλληλουχία αλλά έχει μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo et al., 1985). Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους εντεροϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον. Υπάρχουν κυρίως δυο μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων και επομένως των quasi-species, η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή (Garvilin et al., 2000).

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, με την μεγαλύτερη ποικιλομορφία να εμφανίζεται στις περιοχές οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό του ιικού καψιδίου και δέχονται αντιγονική πίεση. Από τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις

πιθανόν γιατί συμμετέχει στη δημιουργία των περισσότερων αντιγονικών θέσεων, γι' αυτό δέχεται την μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή, με αποτέλεσμα την τάση δημιουργίας ποικιλόμορφων οροτύπων και την ικανότητα του ιού να διαφύγει την αναγνώριση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ικών ενζύμων.

Ιδιαίτερα μεταβλητή είναι επίσης η 5' UTR περιοχή με εξαίρεση τα cis δραστικά γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή, το cloverleaf και CRE, και στην ιική μετάφραση, το IRES. Σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής τους (Georgescu et al 1997, Friedrich 2000, Martin and Minor 2002).

Η αλληλουχία, που κωδικοποιεί για τις μη δομικές πρωτεΐνες φαίνεται να είναι πιο συντηρημένη (Muir et al., 1998). Μελέτες που έχουν γίνει σε εντεροϊούς οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμά τους αποτελεί μια συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα απ' αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα (μονάδα εξέλιξης), δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα (Lukashev et al., 2003).

1.5.2 Ανασυνδυασμοί

Οι ανασυνδυασμοί μαζί με τις μεταλλάξεις κατευθύνουν την εξέλιξη των ιών. Ο γενετικός ανασυνδυασμός όμως, αποτελεί ένα πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης από τις μεταλλάξεις, γιατί μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός (Guillot et al., 2000).

Η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με συχνότητα ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή. Επίσης, η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών. Ο King το 1988 υπολόγισε ότι το 10-20% των ιικών γενωμάτων υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού (Duggal et al. 1997).

Μέχρι πρόσφατα, το ερευνητικό ενδιαφέρον ήταν επικεντρωμένο στους Πολιοϊούς, με αποτέλεσμα να έχουν γίνει λίγες μελέτες που αφορούν στην επιδημιολογία και τη γενετική των υπόλοιπων εντεροϊών. Με την εξάλειψη της πολιομυελίτιδας το ενδιαφέρον στράφηκε προς τους εντεροϊούς.

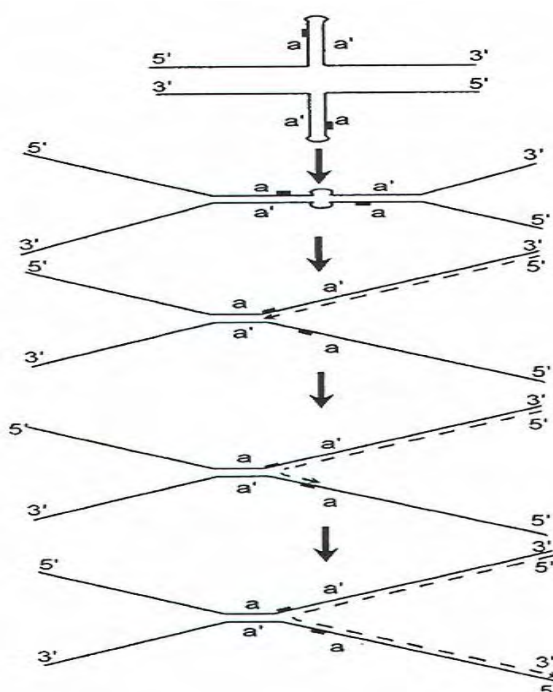
Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας και η μελέτη των γονιδιωμάτων πρότυπων στελεχών εντεροϊών, έδειξε γεγονότα ανασυνδυασμού στις μη καψιδιακές περιοχές του γονιδιώματος. Μελέτη ολόκληρου του γονιδιώματος 24 πρότυπων στελεχών εντεροϊών (Santti et al., 1999), έδειξε ότι ο ανασυνδυασμός έπαιξε σημαντικό ρόλο στην μακροεξελικτική ιστορία του γένους των εντεροϊών. Όσον αφορά τους Echo ιούς, υποστηρίχτηκε ότι το πρότυπο στέλεχος Echo 9 Hill, προήλθε από τον ανασυνδυασμό των πρότυπων στελεχών Echo 18 Metcalf και Echo 9 Barty (Andersson et al., 2002). Η πλήρης γενωμική ανάλυση όλων των πρότυπων στελεχών του είδους HEV-B (Oberste et al., 2004), παρέχει αρκετές αποδείξεις τυχαίου ανασυνδυασμού μεταξύ των διαφορετικών μελών. Γεγονότα ανασυνδυασμού έχουν επίσης βρεθεί και σε κυκλοφορούντα στελέχη εντεροϊών (Santti et al., 2000, Lukashev et al., 2004, Chua et al., 2001). Πιο πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι γεγονότα ανασυνδυασμού συμβαίνουν και μεταξύ στελεχών που κυκλοφορούν σε έναν πληθυσμό την ίδια χρονική περίοδο (Bolanaki et al., 2007, Kottaridi et al., 2007, Mirand et al., 2007).

1.5.2.1 Μηχανισμοί ανασυνδυασμού

Έχουν προταθεί 2 μηχανισμοί γενετικού ανασυνδυασμού : i) ο αντιγραφικός μηχανισμός ή μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard & Baltimore 1986) και ii) ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

Μηχανισμός αλλαγής μήτρας: Κατά την ιική αντιγραφή, η ιική πολυμεράση 3D χρησιμοποιεί σαν καλούπι για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού επάγοντας τη δημιουργία με αυτόν τον τρόπο ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστού ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση μπορεί να συναντήσει κάποιο «εμπόδιο», με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της ίδιας, καθώς και του νεοσυντιθέμενου RNA κλώνου αρνητικής πολικότητας, από τον θετικής πολικότητας κλώνο που χρησιμοποιείται σαν καλούπι (Kirkegaard & Baltimore, 1986). Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Pilipenko et al., 1995). Η αποδέσμευση της ιικής πολυμεράσης σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο αρνητικό κλώνο οδηγεί στην δέσμευσή της ιικής πολυμεράσης,

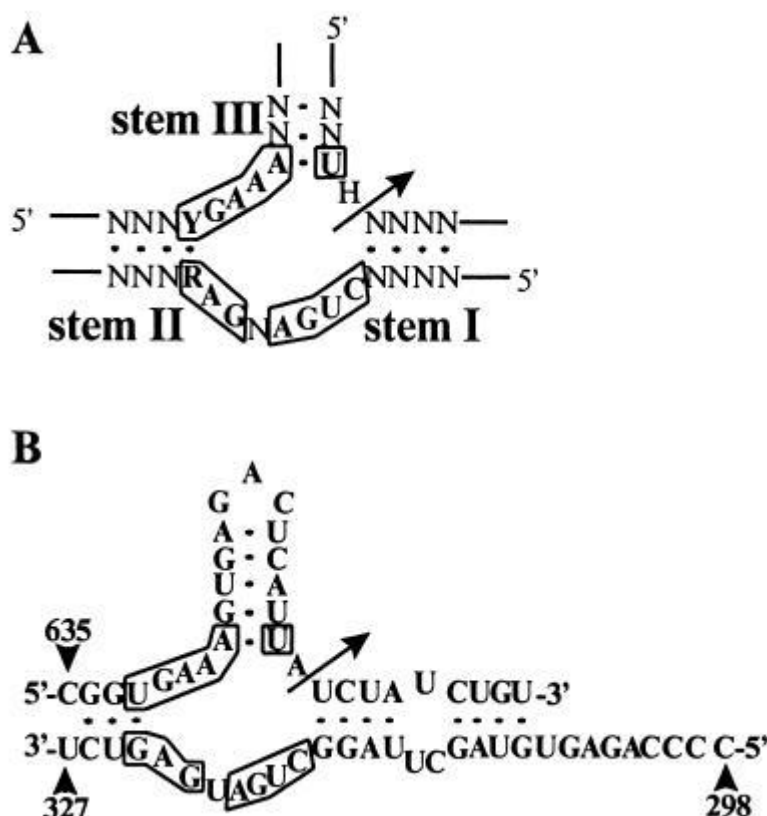
καθώς και του ημιτελούς αρνητικού κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Αν η μετάβαση από τον ένα κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδυασμός είναι *ομόλογος* αν όμως δεν είναι ακριβής ο ανασυνδυασμός είναι *μη ομόλογος* και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών (Kirkegaard and Baltimore 1986). Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού (**Εικόνα 1.13**) (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).



Εικόνα 1.13: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας κατά τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA

Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης: Ο μηχανισμός αυτός είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση των δύο ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός, με το 3' άκρο του άλλου μορίου. Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι χημικοί μηχανισμοί για το συγκεκριμένο τύπο αναδιάταξης. Σύμφωνα με τον πρώτο, οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των δύο διαφορετικών μορίων δέχονται επίθεση από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο μόριο H_2O με αποτέλεσμα τη διάσπασή τους και την έκθεση των 5' και 3' άκρων τους. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω

ενεργοποίησης της 5' φωσφορικής ομάδας. Στο δεύτερο χημικό μηχανισμό, ένας φωσφοδιεστερικός δεσμός σε κάθε ανασυνδυαζόμενο μόριο δέχεται επίθεση από το παρακείμενο 2' OH, το οποίο παίζει το ρόλο του εσωτερικού νουκλεόφιλου. Το αποτέλεσμα σε κάθε μόριο είναι η παραγωγή ενός άκρου που περιέχει ένα κυκλικό 2', 3' φωσφορικό ενδιάμεσο και ενός 5' άκρου που φέρει OH. Στη συνέχεια τα 5' και 3' άκρα από τα διαφορετικά μόρια RNA ενώνονται μέσω αντίδρασης τρανσεστεροποίησης (**Εικόνα 1.14**) (Gmyl et al., 1999).



Εικόνα 1.14 : Μηχανισμός ανασυνδυασμού μέσω ρήξης και επανένωσης, που περιλαμβάνει τη συμμετοχή μιας hammerhead-like ριβοενζυμικής δραστηριότητας. Τα περιγεγραμμένα νουκλεοτίδια αποτελούν συντηρημένες θέσεις. Η θέση τομής φαίνεται με βέλος (Gmyl et al., 1999).

1.6 Ορολογικές σχέσεις και μεταβλητότητα

Ο προσδιορισμός των οροτύπων των Echo ιών βασίζεται στην οροεξουδετέρωση με μονοκλωνικά αντισώματα που αναπτύχθηκαν ενάντια στα πρωτότυπα στελέχη των ιών, συνήθως σε αυτά που απομονώθηκαν πρώτα. Γενικά, υπάρχει μεγάλη αντιγονική ποικιλιότητα στους Εντεροϊούς. Φαίνεται όμως ότι ο αντίκτυπος των παραλλαγών στους Echo ιούς είναι μεγαλύτερος σε σχέση με άλλους εντεροϊούς. Μια πιθανή εξήγηση μπορεί να είναι ότι οι Echo ιοί εμφανίζονται ευρέως στους ανθρώπινους πληθυσμούς και παραμένουν στο περιβάλλον, αν και η παρουσία τους υποτιμάται πιθανώς επειδή προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων και στην πλειοψηφία τους οι μολύνσεις είναι ασυμπτωματικές. Το σημαντικότερο πρόβλημα που αντιμετωπίζεται με τους ανθρώπινους ορούς συχνά αφορά στις διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλους οροτύπους. Λόγω της αντιγονικής ποικιλιότητας που παρατηρείται σε έναν ορότυπο, η επιλογή ενός προτύπου στελέχους για την παραγωγή αντιορού για διαγνωστικούς σκοπούς είναι ανεπαρκής καθώς συχνά απομονώνονται πολλές αντιγονικές παραλλαγές του ίδιου οροτύπου από κλινικά δείγματα. Περίπου το 10% δεν μπορεί να προσδιοριστεί με ορούς που παράγονται έναντι των πρότυπων στελεχών. (Korecka Helena, 1999)

1.7 Επιδημιολογία

1.7.1 Γεωγραφική και εποχιακή κατανομή

Οι Echo ιοί κυκλοφορούν παγκοσμίως σε όλες τις γεωγραφικές περιοχές. Σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, απομονώνονται κυρίως κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και των πρώτων φθινοπωρινών μηνών, συνήθως σαν κυκλικές επιδημίες με συγκριτικά μικρές διάρκειες. Σε τροπικές και ημιτροπικές περιοχές, η κυκλοφορία τείνει να είναι ενδημική, καθώς η μετάδοση και η μόλυνση συμβαίνουν καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, με μεγαλύτερη συχνότητα κατά την περίοδο βροχοπτώσεων.

Σύμφωνα με στοιχεία που δημοσιεύτηκαν από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) για την περίοδο 1975 έως 1983, από τις σχεδόν 60000 αναφορές που έγιναν για μη-πολιο εντεροϊούς, οι Echo ιοί αποτελούσαν το 64%. Οι Echo ιοί συνεχίζουν σαφώς να είναι μια σημαντική αιτία σοβαρής νοσηρότητας και θνησιμότητας παγκοσμίως. Οι κυρίαρχοι ορότυποι έχουν αλλάξει από το 1983; Διάφορες επιδημίες Echo30 έχουν αναφερθεί στις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Ιαπωνία μεταξύ

του 1990 και του 1992. Με την επιδημία Echo3 στην Κίνα το 1985, μολύνθηκε το 20% του πληθυσμού στην επαρχία Guizhou, με ποσοστό θνητότητας 12%. Πιο πρόσφατα, έχουν αναφερθεί επιδημίες Echo13 και Echo30 στη Γερμανία το 1995 (Hauri et al., 2005) και Echo13 στη Λιθουανία και το Ισραήλ (Narkeviciute et al., 2004, Somekh et al., 2003). Μια επιδημία Echo11 αναφέρθηκε επίσης σε νεογνά στην Taiwan (Chen et al., 2005).

Ο λόγος που συγκεκριμένοι ορότυποι εμφανίζονται και εξαφανίζονται και οι παράγοντες που υπαγορεύουν ενδημική ή επιδημική συμπεριφορά δεν είναι κατανοητοί. Μια υπόθεση είναι ότι κάποια επιδημικά στελέχη, όπως ο Echo9, μπορούν να εξαπλώνονται γρήγορα σε έναν κρίσιμο αριθμό ευαίσθητων ατόμων στον πληθυσμό, και έτσι η μετάδοση είναι συνεχής, ενώ εκείνα τα ενδημικά στελέχη που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια αρκετών ετών ίσως είναι λιγότερο μεταδοτικά.

Η μελέτη της επιδημιολογίας των εντεροϊών έχει ενισχυθεί πρόσφατα με την εφαρμογή των μοριακών μεθόδων γενετικής, μέσω των οποίων μπορεί να γίνει άμεση ταυτοποίηση των στελεχών Εντεροϊών που σχετίζονται με συγκεκριμένες επιδημικές εξάρσεις (Kopecka 1999, Quinonez 2008).

1.7.2 Μετάδοση

Ο άνθρωπος είναι ο μόνος γνωστός ξενιστής των Echo ιών και επομένως η στενή ανθρώπινη επαφή φαίνεται να είναι ο κύριος τρόπος διάδοσης. Η περίοδος επώασης είναι δύσκολο να προσδιοριστεί λόγω του ότι τόσο τα υγιή όσο και τα άτομα που έχουν συμπτώματα, μεταδίδουν τον ιό. Η επώαση πιστεύεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 2 ημερών και 2 εβδομάδων. Ο ιός μπορεί να διασπείρεται από την ανώτερη αναπνευστική οδό για 1-3 εβδομάδες και από τα κόπρανα για περισσότερο από 8 εβδομάδες μετά από την αρχική μόλυνση. Σε σπάνιες περιπτώσεις επίμονης μόλυνσης, οι ιοί μπορούν να διασπείρονται για αρκετά έτη.

Εκτός από την κοπρο-στοματική οδό μετάδοσης, άλλοι τρόποι είναι το νερό, τα τρόφιμα, ο εμβολιασμός, το αίμα και η κάθετη μετάδοση από τη μητέρα στο έμβρυο. Η μετάδοση από το νερό μπορεί να θεωρηθεί ως επέκταση της κοπρο-στοματικής μετάδοσης όπου ο ενδιαμέσος φορέας είναι το νερό. Όπως όλοι οι εντεροϊοί, οι Echo είναι ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές συνθήκες και σε υγρά του γαστρικού σωλήνα. Αν λοιπόν βρεθούν σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες (χαμηλή θερμοκρασία, ουδέτερο pH, παρουσία οργανικής ουσίας) μπορούν να επιζήσουν για πολύ μεγάλες περιόδους. Οι Echo ιοί συναντώνται σε επιφανειακά

και τα υπόγεια νερά, και σε πισίνες, ακόμα και μετά από τη χλωρίωση. Μπορούν να απομονωθούν από ακατέργαστα ή εν μέρει μαγειρευμένα μαλάκια. Αν και οι περισσότερες νεογνικές μολύνσεις με Echo ιούς προέρχονται άμεσα από τη μητέρα, μερικές μολύνσεις μεταδίδονται ενδονοσοκομειακά. Η αερομεταφερόμενη μετάδοση δεν είναι σημαντική σε μολύνσεις με Echo ιούς (Kopecka Helena, 1999).

1.8 Παθογένεια και τροπισμός στους ιστούς

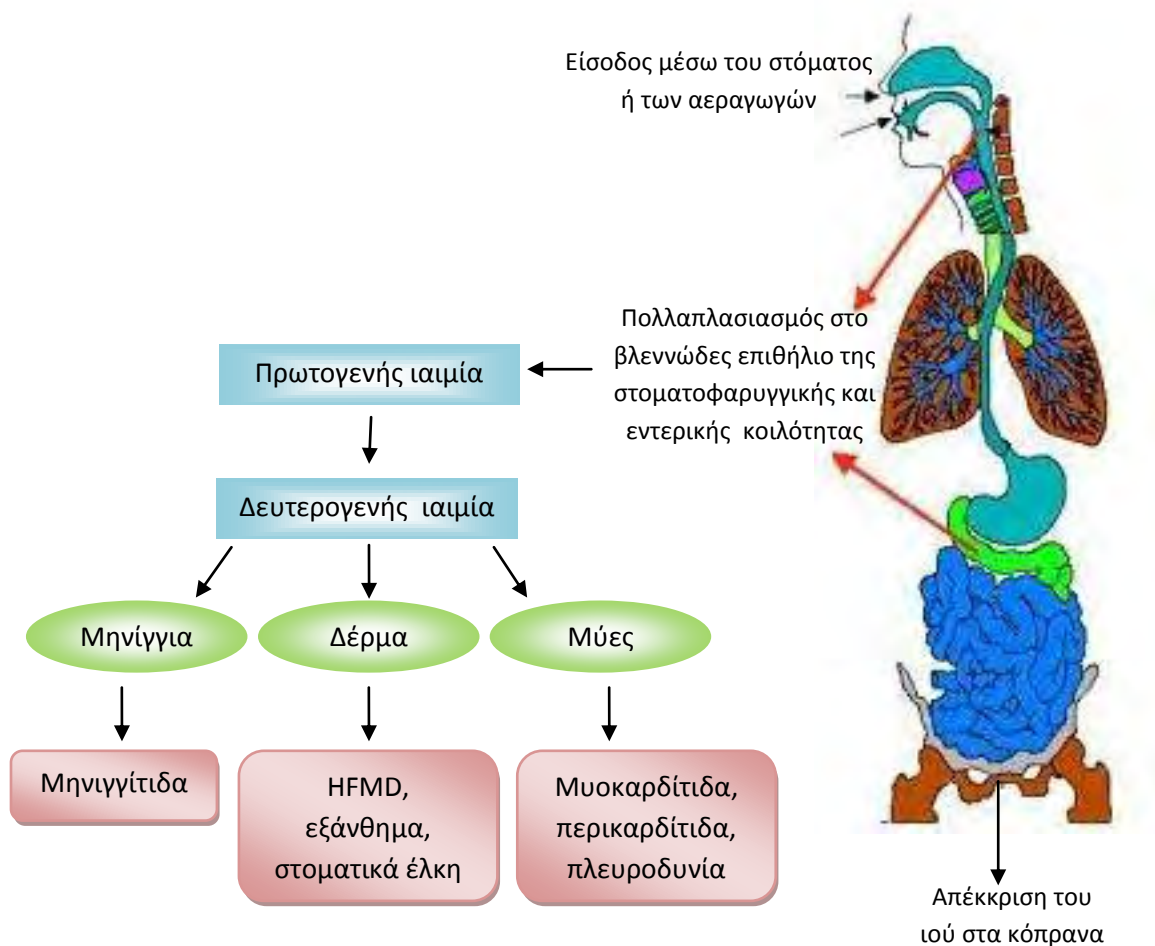
Οι Echo ιοί, όπως και οι άλλοι εντεροϊοί, πολλαπλασιάζονται σε όλο το γαστρεντερικό σωλήνα, όπου γίνεται η αρχική αποίκιση. Ο ιός μεταφέρεται από την στοματοφαρυγγική κοιλότητα και από το έντερο σε άλλα όργανα (**Εικόνα 1.15**).

Περιορισμένη αντιγραφή του ιού πραγματοποιείται αρχικά στην στοματοφαρυγγική κοιλότητα, με εξάπλωση στους περιφερικούς λεμφαδένες. Ακολουθεί η διέλευση μέσω του στομάχου και η εγκαθίδρυση στο κατώτερο τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, όπου ο ιός δεσμεύεται σε συγκεκριμένους υποδοχείς των κυττάρων του εντέρου. Ο ιός διαπερνά το εντερικό επιθήλιο, όπου γίνεται εκτενέστερος πολλαπλασιασμός, χωρίς όμως την πρόκληση κυτταρικών βλαβών και φτάνει στις πλάκες του Peyer. Η αντιγραφή, στον λεμφοειδή ιστό είναι ανιχνεύσιμη 1-3 ημέρες μετά από την κατάποση του ιού. Μια πρωτογενής ιαιμία, αναπτύσσεται την τρίτη ημέρα, ακολουθούμενη από τη διάδοση σε πολλές δευτερογενείς θέσεις μόλυνσης, συμπεριλαμβανομένου του ΚΝΣ, το συκώτι, τον σπλήνα, τον μυελό των οστών, την καρδιά και τους πνεύμονες. Επιπρόσθετος πολλαπλασιασμός σ' αυτές τις θέσεις προκαλεί την κύρια ιαιμία, η οποία έχει σαν αποτελέσματα στη διάδοση στα όργανα στόχους, όπως τα μηνίγγια, την καρδιά και το δέρμα. Σε αυτούς τους ιστούς, παρατηρείται νέκρωση και φλεγμονώδεις βλάβες, ενώ ιστοπαθολογικά τραύματα γενικά δεν παρατηρούνται στο έντερο και στους λεμφοειδείς ιστούς κατά τη διάρκεια των πρώιμων αντιγραφικών γεγονότων. Η κύρια ιαιμία συμπίπτει με την έναρξη της κλινικής ασθένειας, συνήθως 4-6 ημέρες μετά την έκθεση. Η καθυστερημένη εμφάνιση συμπτωμάτων ασθένειας του ΚΝΣ υποδηλώνει ότι η ιική εξάπλωση μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια τόσο της δευτερογενούς όσο και της κύριας ιαιμίας.

Οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές. Εντούτοις, μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα διάφορων κλινικών ασθενειών, που περιλαμβάνουν άσηπτη μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα, χαλαρή παράλυση, εξάνθημα, στοματικά έλκη, μυοκαρδίτιδα, πλευροδυνία, ηπατίτιδα, συμπτώματα του ανώτερου αναπνευστικού, κ.α.

Λόγω της γενετικής ετερογένειας του ιικού πληθυσμού και της εξελικτικής πίεσης μπορεί να δημιουργηθούν ιικά στελέχη με αλλαγμένες παθογόνες ιδιότητες όπως η μολυσματικότητα, η ιστο-ειδικότητα και το εύρος του ξενιστή, οι οποίες μπορεί να αυξήσουν την μολυσματικότητα και να προκαλέσουν σύνδρομα που συνήθως δεν συνδέονται με τα πρότυπα στελέχη των ιών. Εναλλακτικά, μπορούν να προκύψουν εξασθενημένα ιικά μεταλλάγματα.

Οι περισσότεροι Echo ιοί στερούνται της ιδιότητας να παρουσιάζουν παθογένεια σε ποντίκια. Εντούτοις, από διάφορα στελέχη μπορούν να δημιουργηθούν μεταλλάγματα τα οποία παρουσιάζουν παράλυση σε νεογνήτα ποντίκια (Korecka Helena, 1999, Quinonez 2008).



Εικόνα 1.15: Παθογένεια των Echo ιών

1.9 Κλινικές εκδηλώσεις από τη μόλυνση με Echo

Η πλειοψηφία των μολύνσεων από Echo ιούς είναι ασυμπτωματικές ή έχουν σαν αποτέλεσμα μια αδιαφοροποίητη πυρετώδη ασθένεια. Όταν η ασθένεια εμφανίζεται, το φάσμα και η δριμύτητα των κλινικών εκδηλώσεων ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία και την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, τον ορότυπο, ακόμα και το ενδοτυπικό ιικό στέλεχος. Ενώ ποικίλα ευδιάκριτα κλινικά σύνδρομα προκαλούνται από τη μόλυνση με Echo ιούς, μερικές εκδηλώσεις συνδέονται με πολλούς οροτύπους (Πίνακας 1.2).

Οι Echo ιοί μαζί με τους Coxsackie ιούς προκαλούν περισσότερο από το 90% των περιπτώσεων άσηπτης μηνιγγίτιδας. Νήπια ηλικίας κάτω των 3 μηνών έχουν τα υψηλότερα ποσοστά άσηπτης μηνιγγίτιδας. Φαρυγγίτιδα και άλλα συμπτώματα μόλυνσης της ανώτερης αναπνευστικής οδού παρουσιάζονται συχνά κατά τη διάρκεια της μηνιγγίτιδας. Συμπτώματα εγκεφαλίτιδας περιπλέκουν μερικές φορές την πορεία της άσηπτης μηνιγγίτιδας. Σε μόλυνση από Echo ιό που αποκτήθηκε κατά τη γέννηση, η εγκεφαλίτιδα μπορεί να είναι μια εκδήλωση γενικευμένης ιικής μόλυνσης. Οι περισσότεροι ασθενείς με εγκεφαλίτιδα, προερχόμενη από Echo ιό, μετά τη νεογνική περίοδο αναρρώνουν πλήρως.

Ωστόσο, έχει αναφερθεί μια περίπτωση θανάτου από εγκεφαλίτιδα από Echo ιό τύπου 9. Σποραδικές περιπτώσεις χαλαρής παράλυσης έχουν συνδεθεί με διάφορους τύπους Echo ιών, συχνότερα τύπου 2, 6, 7, 9, 11 και 16. Η ασθένεια είναι γενικά ηπιότερη από την πολιομυελίτιδα και η παράλυση συνήθως δεν είναι μόνιμη. Το σύνδρομο Guillain—Barre έχει αναφερθεί σε έναν μικρό αριθμό ασθενών που μολύνονται με Echo τύπου 6.

Οι Echo ιοί προκαλούν επίσης ποικίλα εξανθήματα. Έχουν μικρή νοσηρότητα, αλλά συμβάλουν στην επικράτηση των Echo ιών στην κοινότητα. Καλοκαιρινές εξάρσεις με στοματικά έλκη έχουν συνδεθεί με μόλυνση από Echo ιούς τύπου 3, 6, 9, 16, 17, 25 και 30, αλλά και άλλους τύπους. Οι Echo ιοί τύπου 1, 6, 9, 16 και 19 εμπλέκονται μερικές φορές στην πλευροδυνία. Κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού, η νόσος του ανώτερου αναπνευστικού συνδέεται συχνά με μόλυνση με Echo ιό τύπου 11. Ο Echo 9 έχει συνδεθεί με μυοπερικαρδίτιδα λόγω της παρουσίας μολυσματικών ιών ή ιικών αντιγόνων στο μυοκάρδιο ή το περικαρδιακό υγρό.

Τα νεογνά είναι ιδιαίτερα επιρρεπή σε ασθένειες που προκαλούνται από Echo και Coxsackie ιούς. Ο Echo 11 συνδέεται πολύ συχνά με σοβαρή, συστηματική νεογνική μόλυνση. Η γενικευμένη ασθένεια από εντεροϊούς σε νεογέννητα εμφανίζεται συνήθως με μυοκαρδίτιδα ή οξεία ηπατική ανεπάρκεια. Ο ορότυπος 11

είναι υπεύθυνος για τις περισσότερες περιπτώσεις οξείας ηπατικής ανεπάρκειας αλλά και άλλοι ορότυποι (4, 6, 7, 9, 12, 14, 19, 21 and 31) είναι επίσης υπεύθυνοι για σοβαρές μορφές ηπατίτιδας σε νεογνά. Υπάρχουν διάφορες αναφορές περιπτώσεων θανατηφόρας πνευμονίας στις πρώτες ημέρες της ζωής σε νεογέννητα, προκαλούμενης από Echo ιούς τύπου 6, 9 και 11. Οι περισσότερες περιπτώσεις επίμονης, και μερικές φορές θανατηφόρας, μόλυνσης του κεντρικού νευρικού συστήματος σε παιδιά με κληρονομική ή επίκτητη αγαμασφαιριναιμία συνδέεται κυρίως με τον Echo11 (Korecka Helena, 1999).

Κλινικά συμπτώματα μόλυνσης με Echo ιούς	
Ασυμπτωματική μόλυνση	Οι περισσότεροι Echo ιοί
Άσηπτη μηνιγγίτιδα	Όλοι οι τύποι (εκτός από 24, 26, 29, 32)
Εγκεφαλίτιδα	Τύποι 2, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 25
Παράλυση	Τύποι 2, 4, 6, 7, 9, 11, 14, 16, 30
Εξάνθημα	Κυρίως οι τύποι 9 και 16 αλλά και άλλοι τύποι
Μυοπερικαρδίτιδα	Τύπος 9
Γενικευμένη ασθένεια σε νεογέννητα	Τύποι 4, 6, 7, 9, 11, 12, 14, 19, 21, 25, 31
Νεογνική διάρροια	Τύποι 11, 14, 18
Διάρροια	Διάφοροι τύποι
Αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο	Τύπος 22
Μυοσίτιδα	Τύπος 9, 11
Σύνδρομο Guillain-Barré	Τύπος 6
Χρόνια μηνιγγοεγκεφαλίτιδα σε Αγαμασφαιριναιμία	Τύποι 2, 3, 5, 9, 11, 19, 24, 25, 30, 33
Μολυσματική λεμφοκυττάρωση	Τύπος 25

Πίνακας 1.2: Κλινικά συμπτώματα μόλυνσης με Echo ιούς (Modlin JF 1990)

1.10 Ανοσοαπόκριση

Σαν συνεπεία της μόλυνσης με Echo ιούς εμφανίζονται αντισώματα ειδικά για κάθε ορότυπο. Αναπτύσσονται αμέσως μετά από τη μόλυνση και παραμένουν για πολλούς μήνες ή έτη, ανάλογα με τη δριμύτητα της μόλυνσης. Η ανοσία στη μόλυνση είναι ειδική για κάθε ορότυπο και η πρόκληση ασθένειας εξαρτάται όχι μόνο από την παρουσία, αλλά και από τη συγκέντρωση, των ειδικών αντισωμάτων.

Στον ορό, τόσο τα IgM όσο και τα IgG αντισώματα παράγονται από 1-3 ημέρες μετά τη μόλυνση με Echo ιό. Τα IgM αντισώματα υπερισχύουν κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα και εξαφανίζονται σταδιακά. Τα IgG αντισώματα παραμένουν στον ορό εφόρου ζωής μετά από φυσική μόλυνση με αυτούς τους ιούς. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η λειτουργία των μακροφάγων μπορεί επίσης να είναι ένα κρίσιμο συστατικό στην ανοσοαπόκριση σε μόλυνση με εντεροϊούς. Ανοσολογικοί μηχανισμοί οι οποίοι περιλαμβάνουν και τα αντισώματα λειτουργούν τόσο στο πεπτικό σύστημα για να αποτρέψουν την εγκαθίδρυση της λοίμωξης του ιού όσο και στο αίμα για να αποτρέψουν τη διάδοση στα όργανα στόχους. Ενώ τα αντισώματα, μπορούν να διαμορφώσουν την πορεία της μόλυνσης, μπορεί να μην προλάβουν τη μόλυνση πριν αυτή διαδοθεί. Η ορολογική διασταυρούμενη αντίδραση ανάμεσα στους Echo ή άλλα μέλη των ανθρώπινων εντεροϊών μπορούν να αποτελέσουν πρόβλημα στον έλεγχο της μόλυνσης.

Οι μολύνσεις με Echo ιούς είναι αρκετά επικίνδυνες σε άτομα με ανεπάρκεια στη χυμική ή κυτταρική ανοσία. Έχουν αναφερθεί κάποιες επίμονες ή θανατηφόρες μολύνσεις από Echo ιούς σε άτομα με ανοσοανεπάρκεια. Στους περισσότερους από τους ασθενείς η κύρια ανεπάρκεια αφορούσε τη λειτουργία των Β κυττάρων που σχετίζονται με τη χυμική ανοσία. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων δεν ήταν δυνατή η εξάλειψη του ιού από το κεντρικό νευρικό σύστημά. (Korecka Helena, 1999)

1.11 Πρόληψη και έλεγχος

Οι Echo ιοί είναι οι συχνότερα αντιπροσωπευόμενοι εντεροϊοί σε σοβαρές ή ήπιες ασθένειες σε μικρά παιδιά. Παρά τη συχνότητα και τη δριμύτητα της μόλυνσής τους, αυτοί οι ιοί είναι οι λιγότερο κατανοητοί ανάμεσα στους *ricorna* ιούς. Τα μόνα διαθέσιμα εμβόλια για Εντεροϊούς αυτή τη στιγμή είναι ενάντια στους τρεις ορότυπους των πολιοϊών. Η εφαρμογή τους για σχεδόν 40 χρόνια έχει οδηγήσει στην επίτευξη του στόχου της παγκόσμιας εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας. Εντούτοις, δεν υπάρχουν εμβόλια ενάντια σε άλλους εντεροϊούς. Λαμβάνοντας υπόψη το μεγάλο αριθμό διαφορετικών οροτύπων echo ιών, είναι δύσκολο να σχεδιαστούν εμβόλια ενάντια σε όλους. Μια καλύτερη κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος και της λειτουργίας του, καθώς επίσης και των μηχανισμών της ταχείας εξέλιξης και της μεταβλητότητάς τους, θα βοηθούσε πολύ στο σχεδιασμό αντι-ικών παραγόντων, όπου οι ζωτικές λειτουργίες του ιού θα αποτελούσαν στόχο. Οι μελέτες των κυτταρικών υποδοχέων είναι μεγάλης σπουδαιότητας για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων ενός ιού με το κύτταρο ξενιστή του, και έτσι η πιθανή παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης ιού - κυττάρων. Η καλύτερη κατανόηση του εντοπισμού της δομικής διαμόρφωσης των επιτόπων είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ανασυνδυασμένων εμβολίων. Η εφαρμογή γρήγορων, ευαίσθητων και εξειδικευμένων διαγνωστικών εργαλείων μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση Echo ιών σε κλινικά δείγματα και περιβαλλοντικά δείγματα είναι σημαντική για τον επιδημιολογικό έλεγχο. Η παρακολούθηση πρόσφατα απομονωμένων στελεχών είναι επίσης μεγάλης σπουδαιότητας, καθώς μπορεί να προκύψουν ιοί με νέες παθολογικές ιδιότητες, όπως ο νευροτροπισμός και ο καρδιοτροπισμός. Η μελέτη της ανθεκτικότητας των Echo ιών στο περιβάλλον γενικά και στο κλινικό περιβάλλον ειδικότερα, είναι σημαντική για την επιδημιολογία και για τον κίνδυνο σοβαρών επιπτώσεων σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Τα ερχόμενα έτη θα οδηγήσουν σίγουρα σε νέες και σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα Echo ιών να προκαλέσουν αυτό-ανοσία και χρόνια μόλυνση.

Η εκρίζωση της πολιομυελίτιδας μέσω του εμβολιασμού ήταν ένας στόχος του WHO που έχει σχεδόν επιτευχθεί. Εντούτοις, διάφορες περιπτώσεις παραλυτικής μηνιγγο-εγκεφαλίτιδας οφειλόμενες σε άλλους εντεροϊούς εκτός των πολιοϊών θα συνεχίσουν να υπάρχουν. Η ακριβής διάγνωση τέτοιων μολύνσεων είναι επιτακτική προκειμένου να ληφθούν τα σωστά επιδημιολογικά στοιχεία για να καταδείξουν το ρόλο των Echo ιών εκτός των πολιοϊών σε αυτές τις κλινικές εκδηλώσεις. (Korecka Helena, 1999)

1.12 Εργαστηριακή διάγνωση

Η διάγνωση της μόλυνσης με εντεροϊούς και ο χαρακτηρισμός τους μπορεί να είναι πολύπλοκη διαδικασία, είτε λόγω περιορισμών των διαγνωστικών μεθόδων είτε λόγω των βιολογικών και επιδημιολογικών χαρακτηριστικών των εντεροϊών. Η δυσκολία οφείλεται στο γεγονός ότι οι εντεροϊοί μπορούν να βρίσκονται στο αναπνευστικό και γαστρεντερικό σύστημα τόσο υγιών όσο και ασθενών ατόμων με μεγάλη ποικιλία στην κλινική εικόνα καθώς οι μολύνσεις είναι συνήθως ασυμπτωματικές ή παρουσιάζουν ήπια συμπτώματα. Λόγω της ομοιότητας των συμπτωμάτων που προκαλούνται από διαφορετικούς τύπους εντεροϊών, υπάρχει ανάγκη όχι μόνο διάγνωσης αλλά και ταυτοποίησης τους. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται τόσο παραδοσιακές τεχνικές, όπως η απομόνωση του ιού, η οροταυτοποίηση και η ανίχνευση αντισωμάτων, όσο και μοριακές τεχνικές. (Pallansch and Roos, 2007, Muir et al., 1998, Siafakas et al., 2001) .

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργειες και την εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης με ειδικούς αντι-ορούς.

Τα βιολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του ιού, περιλαμβάνουν το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), φαρυγγικά επιχρίσματα και δείγματα που προέρχονται από το πεπτικό σύστημα όπως πρωκτικά επιχρίσματα ή δείγματα κοπράνων, τα οποία αποτελούν το πιο αξιόπιστο υλικό για την ανίχνευση εντεροϊών. Η ιική καλλιέργεια από ENY αποτελεί συνηθισμένη μέθοδο σε περιπτώσεις άσηπτης μηνιγγίτιδας (Minor et al., 2000). Η απομόνωση των εντεροϊών από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης (Shulman et al, 1997, Dagan et al., 1985). Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν δάκρυα (Yin-Murphy et al., 1985), ή εκκρίματα του επιπεφυκότος χιτώνα (Yin-Murphy et al., 1984), σε περιπτώσεις οξείας αιμορραγικής επιπεφυκίτιδας. Σε περιπτώσεις θανάτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν δείγματα αυτοψίας εγκεφάλου ή νωτιαίου μυελού. Η απομόνωση από λύματα και άλλα περιβαλλοντικά δείγματα μπορεί να είναι χρήσιμη σε περιβαλλοντικές μελέτες (Minor et al., 2000).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την απομόνωση εντεροϊών, είναι η χρήση κυτταρικών σειρών. Η ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών όμως, δεν μπορεί να γίνει στον ίδιο τύπο κυττάρων. Κατά συνέπεια, η χρήση πολλαπλών κυτταρικών σειρών αυξάνει την παραγωγή και ενισχύει την πιθανότητα και ταχύτητα της ικής απομόνωσης (Chonmaitree et al., 1988, Korecka 1999).

Αρχέγονα ανθρώπινα κύτταρα, κύτταρα πιθήκου και καλλιέργειες ιστού πρωτεύοντων είναι τα πιο κατάλληλα συστήματα για την απομόνωση των echo ιών. Αυτά περιλαμβάνουν, την κυτταρική σειρά RD από κύτταρα του ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος, την κυτταρική σειρά Hep-2 από κύτταρα του επιδερμικού καρκινώματος, την κυτταρική σειρά HEK από ινοβλάστες ανθρώπινου εμβρυϊκού νεφρού, την κυτταρική σειρά Vero από νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πίθηκο. Επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν ανθρωπίνοι διπλοειδείς ινοβλάστες (MRC-5), BGM (Buffalo green monkey kidney) κύτταρα, MK (rhesus monkey kidney) κύτταρα, ανθρώπινα αμνιακά κύτταρα και άλλες συνεχείς κυτταρικές σειρές (HeLa, KB) που μπορεί να είναι λιγότερο ευαίσθητες, αν και τα διαφορετικά κύτταρα ποικίλλουν στην ευαισθησία τους διαφορετικούς echoviruses (Korecka 1999).

Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση μπορεί να είναι εμφανής μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE) μέσα σε λίγες μέρες. Τα κύτταρα στρογγυλοποιούνται και συρρικνώνονται πριν αποκολληθούν από την επιφάνεια ανάπτυξης της καλλιέργειας. Εντούτοις, οι εντεροϊοί δεν μπορούν να διακριθούν με την ανάπτυξη σε κυτταροκαλλιέργειες, καθώς όλοι προκαλούν όμοια κυτταροπαθογόνο δράση. (Minor et al., 2000)

Κάποια από τα στελέχη των Echo ιών, έχουν την ικανότητα να προκαλούν συγκόλληση σε ερυθροκύτταρα ομάδας O. Η παρουσία αιμοσυγκολλητικής δράσης βοηθάει στη μείωση του αριθμού των πιθανοτήτων σε μια προσπάθεια ταυτοποίησης στελεχών εντεροϊών. Τέλος, κάποιοι από τους εντεροϊούς, μπορούν να απομονωθούν σε ποντίκια. Ωστόσο, αυτός ο τρόπος δεν είναι κατάλληλος για τους Echo ιούς και τους πολιοϊούς. (Minor et al., 2000).

Μετά την απομόνωση του εντεροϊού, ακολουθεί η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιγόνο για κάθε ορότυπο. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται συνδυασμοί εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων εντεροϊών. Συγκεκριμένα, το προς ανάλυση δείγμα επωάζεται με κάθε διαφορετικό μίγμα αντιγόνου και ενοφθαλμίζεται σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και αξιολογούνται τα αποτελέσματα (Melnik et al., 1973).

Για την ταυτοποίηση ορισμένων τύπων εντεροϊών χρησιμοποιούνται και άλλες λιγότερο χρονοβόρες μέθοδοι όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιγόνο ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυδύναμο και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιγόνο και ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο.

Μέσω της ορολογικής διάγνωσης, μπορούμε να έχουμε ένδειξη πρόσφατης λοίμωξης από εντεροϊό, αφού τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού (Melnick J.L., 2001). Ο έλεγχος αυτός γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφου αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Το ανθρώπινο ανοσολογικό σύστημα αντιδρά στη λοίμωξη από εντεροϊό με την δημιουργία αντισωμάτων τα οποία ενεργούν έναντι ειδικών και κοινών επιτόπων. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε επιδημιολογικές μελέτες και έχει μεγάλη ευαισθησία στη διάγνωση λοίμωξης από εντεροϊούς, όμως δεν μπορεί να διακρίνει τους διάφορους οροτύπους. (Bell et al., 1986, Magnius et al., 1988)

Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στην κλινική βιολογία, έχει αλλάξει σημαντικά και τις μεθόδους διάγνωσης. Λόγω του πλεονεκτήματος της ταχύτητας, πολλές *μοριακές μέθοδοι* έχουν αντικαταστήσει τις παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης των εντεροϊών (Pallansch and Roos, 2007).

Η πρώτη μοριακή μέθοδος ανίχνευσης εντεροϊών που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *in situ* υβριδοποίηση με την χρήση cDNA ανιχνευτών. Η μέθοδος αυτή παρέχει χρήσιμες πληροφορίες για την κατανομή της λοίμωξης από εντεροϊούς στα διάφορα κύτταρα, όμως δεν είναι αρκετά ευαίσθητη για την διάγνωση εντεροϊών από κλινικά δείγματα κοπράνων, εγκεφαλονωτιαίου και περικαρδικού υγρού, ούτε για την ταυτοποίηση διαφορετικών οροτύπων καθώς οι cDNA ανιχνευτές μπορούν να ανιχνεύσουν το γενετικό υλικό μιας ευρείας ομάδας εντεροϊών.

Η ανάπτυξη της τεχνικής RT – PCR (Αντίστροφης Μεταγραφής – Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση ιικού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα (Kessler et al., 1997, Olive et al., 1990, Rotbart et al. 1994). Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν στις διατηρημένες περιοχές του ιικού γενώματος (Romero J.R., 1999), όπως η 5' UTR, είναι δυνατή η ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η ανάπτυξή τους σε κυτταροκαλλιέργεια (Rotbart H.A., 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). Η μέθοδος αυτή χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ταχύτητα στην έκδοση των αποτελεσμάτων και γι' αυτό το λόγο αποτελεί σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η αδυναμία ταυτοποίησης του οροτύπου του εντεροϊού. Συνεπώς, για την ταυτοποίηση του ιού απαιτείται κάποια μέθοδος συμπληρωματική της RT-PCR. Αυτή μπορεί να είναι η

ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR από περιοριστικές ενδονουκλεάσες (RFLP) (Siafakas et al., 2002 ; Siafakas et al., 2003).

Εκτός από την διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, η RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών στελεχών με την χρήση ειδικών ζευγών εκκινητικών μορίων που το καθένα αναγνωρίζει ένα συγκεκριμένο στέλεχος. Έχουν βρεθεί οι αλληλουχίες που προσδιορίζουν τις αντιγονικές ιδιότητες των ιών και έτσι σχεδιάστηκαν εκκινητικά μόρια που στοχεύουν σε αυτές. (Melnick J.L., 2001).

Η RT-PCR χρησιμοποιείται ευρέως για τη μοριακή τυποποίηση των εντεροϊών, ακολουθούμενη από τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του ιικού γενώματος. Συγκεκριμένα, ενισχύεται το γονιδίου της VP1 καψιδιακής πρωτεΐνης, η οποία είναι η πλέον εκτεθειμένη στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος και φαίνεται να αντιστοιχεί στον ορότυπο του κάθε στελέχους. Με σκοπό την ενίσχυση όλων των διαφορετικών οροτύπων των εντεροϊών, χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκφυλισμένοι εκκινητές (Oberste et al., 2003). Ακολουθεί ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του γονιδίου και η σύγκριση με γνωστές αλληλουχίες προτύπων και αγρίων στελεχών με σκοπό την ταυτοποίηση του ιικού στελέχους που μας ενδιαφέρει. Η ανάλυση της αλληλουχίας της VP1 αποτελεί έναν σύγχρονο, ακριβή τρόπο μοριακής ταυτοποίησης των εντεροϊών (Oberste et al., 1999, Oberste et al., 2000, Oberste et al., 2003, Caro et al., 2001, Bolanaki et al., 2006, Kottaridi et al., 2006).

1.13 Σκοπός

Σκοπός της εργασίας είναι η εύρεση πολλαπλών εκκινητικών μορίων τα οποία στοχεύουν σε διάσπαρτες περιοχές και καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος των Echo ιών, με στόχο τη γρήγορη ανίχνευση τους και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος οποιουδήποτε στελέχους.

Αρχικά έγινε διερεύνηση της καταλληλότητας ήδη σχεδιασμένων εκκινητών με τη χρήση του προγράμματος βιοπληροφορικής ClustalW, με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων ζευγών και ακολούθησε η εφαρμογή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με τα επιλεγμένα ζεύγη εκκινητών σε πρότυπα και κλινικά στελέχη Echo ιών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Πρότυπα και κλινικά στελέχη

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκαν και τα 28 πρότυπα στελέχη των Echo ιών, τα οποία προέρχονται από το Ινστιτούτο Pasteur του Παρισιού (IPP, Epidemiologie Moleculaire des Enterovirus), από τον οργανισμό ATCC (Rockville, MD, USA) και από το Εθνικό Κέντρο Επιδημιολογίας 'Bella Johan' (Division of Virology, 'Bela Johan' National Center of Epidemiology, Budapest, Hungary). Στον **Πίνακα 2.1** φαίνεται η ονομασία, η γεωγραφική προέλευση και ο αριθμός καταχώρησης (accession number) στην Τράπεζα αλληλουχιών (GenBank) όλων των πρότυπων στελεχών Echo.

Πρότυπα στελέχη Echo			
Ορότυπος	Στέλεχος	Γεωγραφική Προέλευση	Αριθμός καταχώρησης στην GenBank
1	Farouk	Egypt	X89531
2	Cornellis	Connecticut	X89532
3	Morissey	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	Hamington	Massachusetts	AF295503
17	CHHE-29	Mexico City	AF081330
18	Metcaf	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	AFI62711
31	Caldewll	Kansas	AF405322
32	PR-10	Puerto Rico	AF405323
33	Toluca-3	Mexico	AF405324

Πίνακας 2.1: Πρότυπα στελέχη Echo ιών

Εκτός από πρότυπα στελέχη Echo, ελέγχθηκαν επίσης δύο πρότυπα στελέχη Coxsackie, CAV1, CBV1, και τα τρία εμβολιακά στελέχη των πολιοϊών, Sabin1, Sabin2 και Sabin3 (**Πίνακας 2.2**), ως μάρτυρες, με σκοπό να επιβεβαιωθεί η πιθανότητα τα ζεύγη των εκκινητών που επιλέχθηκαν να είναι κατάλληλα για την ανίχνευση αποκλειστικά των Echo ιών ή όχι.

Ορότυπος	Στέλεχος	Αριθμός καταχώρησης στην GenBank
CAV1	Tompkins	AF499635
CBV1	Japan	M16560
S1	Sabin1	AY184219
S2	Sabin2	AY184220
S3	Sabin3	AY184221

Πίνακας 2.2: Στελέχη Εντεροϊών - μάρτυρες

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 5 κλινικά στελέχη Echo ιών. Στον **Πίνακα 2.3** φαίνονται ο ορότυπος στον οποίο αντιστοιχεί κάθε στέλεχος, η γεωγραφική προέλευση, το έτος, το βιολογικό υλικό απομόνωσης και η κλινική εικόνα.

Στέλεχος	Ορότυπος	Προέλευση	Έτος απομόνωσης	Βιολογικό υλικό	Κλινική εικόνα
156/98/1	E5	Ρουμανία	1998	Κόπρανα	Χωρίς συμπτώματα
Tsikan	E6	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
1729	E14	Ελλάδα	1980	ΕΝΥ	Ψευδογριππικά συμπτώματα
Das 85929	E30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα
Kar 85671	E30	Ελλάδα	2001	Κόπρανα	Άσηπτη μηνιγγίτιδα

Πίνακας 2.3: Κλινικά στελέχη Echo ιών

2.2. Προγράμματα βιοπληροφορικής

Το ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) είναι ένα πρόγραμμα που πραγματοποιεί στοίχιση νουκλεοτιδικών αλληλουχιών με εξαιρετική ακρίβεια και ταχύτητα. Χρησιμοποιήθηκε με σκοπό την επιλογή των καταλληλότερων, από ένα σύνολο εκκινητικών μορίων που είχαν σχεδιαστεί για εντεροϊούς, σε προηγούμενες εργασίες (**Πίνακας 2.4**).

Έγινε στοίχιση των αλληλουχιών όλων των εκκινητικών μορίων με την αλληλουχία κάθε πρότυπου στελέχους των Echo ιών, που έχει κατατεθεί στην GenBank. Η επιλογή έγινε με κριτήρια την ταύτιση της αλληλουχίας, την θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm) και την περιοχή υβριδισμού κάθε μορίου, έτσι ώστε να επιλεγθούν τα καταλληλότερα ζεύγη και να χρησιμοποιηθούν για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων του γονιδιώματος των Echo ιών.

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Περιοχή	Θέση	Βιβλιογραφική αναφορά
1	72437	TTAAACAGCTCTGGGGTTG	Sense	5'UTR	1...20	Mulders et al. 1999
2	TS1	TACCCTTGACGCCTGTTT	Sense	5 UTR	70	*
3	HEV-A-1	CGCCTGTTTATGTCCTTC	Sense	5 UTR	77	*
4	UG ₅₂	CAAGCACTTCTGTTTCCCGG	Sense	5'UTR	168-188	Georgopoulou et al. (2000)
5	HEV-C-8	CCCACGGTCAAAAGTGATTG	Sense	5 UTR	201	*
6	HEV-B-4	ATGGAAGTTGCGGAGTGTTT	Sense	5 UTR	270	*
7	0340F	TAGATCAGGCYGATGAGTACCGC	Sense	5 UTR	310	Lukashev et al., 2005
8	HEV-B-6	TGAATGCGGCTAATCCTAACT	Sense	5 UTR	458	*
9	HEV-A-3	AGT TAG TAG CCG CAT TCA	Antisense	5 UTR	484	*
10	HEV-C-10	GAG TAG GTT GTC GTA ATG CGT A	Sense	5 UTR	499	*
11	HEV-C-9	GGA CAC CCA AAG TAG TCG GTT C	Antisense	5 UTR	553	*
12	216616	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GT	Antisense	5'UTR	545-565	Blomqvist et al. 1999
13	UC ₅₃	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	5'UTR	588-606	Georgopoulou et al. (2000)
14	TS2	GGCTGCTTATGGTGAGAA	Sense	5'UTR	603	*
15	TS3	TTC TCA CCA TAA GCA GCC	Antisense	5'UTR	621	*
16	HEV-A-2	ATC GTT GGG TTG AGA CTT GTG	Antisense	5'UTR	778	*
17	294010	CACGARAATTCWAACMGAGCCTA	Sense	5'UTR	779-804	Blomqvist et al. 2003
18	HEV-C-11	CGCTGTCTTTGTAGTAGTTGAT	Antisense	5'UTR	820	*
19	1200R	GGGAATTTCCACCACCACC	Antisense	VP4	1196-1177	Lukashev et al., 2005
20	1700F	GCYCCMATGTGYGCGAGTACAAYGG	Sense	VP2	1690-1715	Lukashev et al., 2005
21	1800R	GGYGAYTGRWARTCRTCIGAIGT	Antisense	VP3	1802-1780	Lukashev et al., 2005
22	UG24	GACACCATGATTCCTTAA	Sense	VP3	1913-1932	Guillot et al., 2000
23	224	GCIATGYTIGGIACIAYRT	Sense	VP3	1977-1996	Nix et al., 2006
24	2100F	TTYITGTTYTGYYGICGCIATG	Sense	VP3	2089-2112	Lukashev et al., 2005
25	2200R	CTIGAYTGYARICCIAYRTCCCA	Antisense	VP3	2225-2203	Lukashev et al., 2005
26	2400F	TCIGCITGYAAYGAYTTYTCIGT	Sense	VP3	2380-2402	Lukashev et al., 2005
27	UG1	TTTGTGTCAGCGTGTTAATG	sense	VP3	2399-2419	Oberste et al., 2006
28	UC20	TCATTACACGCTGACACAAA	Antisense	VP3	2402-2421	Guillot et al., 2000
29	292	MIGCIGYIGARACNGG	Sense	VP1	2554-2570	Oberste et al. (2003)
30	2600R	GAIGTRTGICIGTYTIRCSGC	Antisense	VP1	2570-2548	Lukashev et al., 2005
31	AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	Sense	VP1	2602-2627	Nix et al., 2006
32	O12	ATGTAYGTICICIGGIGG	Sense	VP1	2875-2894	Oberste et al. 1999
33	PV2S	CITAITCIMGITTYGAYATG	Sense	VP1	2847-2866	Kilpatrick et al. (1996)
34	222	CICIGGIGGIAYRWACAT	Antisense	VP1	2895-2912	Oberste et al., 2006
35	UC1 (4547)	GAATTCCATGTCAAATCTAGA	Antisense	VP1	2852-2872	Balanant et al. (1991)
36	O40	ATGTAYRTICIMCIGGIGC	Sense	VP1	2905-2924	Oberste et al. 1999
37	PV1A	TTIAIGCRTGICCRTTRTT	Antisense	VP1	2906-2925	Kilpatrick et al. (1996)
38	EUG3a	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
39	EUG3b	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
40	EUG3c	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
41	AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Antisense	VP1	2977-2951	Nix et al., 2006
42	AN32	GTYTGCCA	Antisense	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
43	AN33	GAYTGCCA	Antisense	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
44	AN34	CCRTCRTA	Antisense	VP1	3111-3104	Nix et al., 2006
45	AN35	RCTYTGCCA	Antisense	VP1	3009-3002	Nix et al., 2006
46	3100R	AARTIIGACCASCRTCRTARAA	Sense	VP1	3047-3025	Lukashev et al., 2005
47	O11	GCIICIGAYTGITGICCRAA	Antisense	2A	3311-3292	Oberste et al. 1999

48	71935	GTCAATGATCACAACCC	Sense	VP1	3206–3222	Mulders et al. (1995)
49	Q8	AAGAGGTCTCTRTTCCACAT	Antisense	2A	3476–3495	Rico-Hesse et al. (1987)
50	UG23	AAGGGATTGGAGTGGGTGTC	Sense	2C	4169-4188	Guillot et al., 2000
51	CHR1	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	sense	2C	4284-4308	Kottaridi et al. 2007
52	EUC2	TTTGCACTTGAACGTATGTA	Antisense	2C	4413-4433	Caro et al. 2001
53	EUC2a	GGTTCAATACGGCATTG	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al. 2001
54	EUC2b	GGTTCAATACGGTGTGCT	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al. 2001
55	UC15	CATCTCTTGAAGTTTGCTGG	Antisense	2C	4946-4965	Guillot et al., 2000
56	CHR3	CIACYCTWGARGCRCTVTT	sense	2C	5047-5065	Kyriakopoulou et al., 2010
57	CHR2	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	antisense	3A	5084-5061	Kottaridi et al. 2007
58	294019	TTCCARGGACCACTSCAGTA	Sense	3A	5096–5115	Blomqvist et al. 2003
59	294018	ACTTCTGGGARTCAACTGC	Antisense	3A	5180–5199	Blomqvist et al. 2003
60	CHR4	GACRTGAGIACHCCRCCRCA	antisense	3C	5860-5841	Kyriakopoulou et al., 2010
61	5850F	CAGTGYGGIGGIGTICTCATGTC	sense	3C	5837-5859	Lukashev et al., 2003
62	UG16	GTTGGTGGGAACGGTTCACA	Sense	3D	5921-5940	Guillot et al., 2000
63	CHR5	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	sense	3D	6485-6507	Kyriakopoulou et al., 2010
64	UC12	TCAATTAGTCTGGATTTCCCTG	Antisense	3D	6494-6516	Guillot et al., 2000
65	6500R	AGRTTGCCAAAYGTYGYCTCATTGC	antisense	3D	6531-6506	Lukashev et al., 2003
66	92369	GGI GGI ATG CCM TCNGGNTG	Sense	3D	6827–6846	Blomqvist et al. 2003
67	294022	TAT GCC CTT GTA GGT TTT CAG TA	Antisense	3D	6903–6925	Blomqvist et al. 2003
68	CHR6	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	antisense	3D	7250-7227	Kyriakopoulou et al., 2010
69	ENV-FLAP f	GAAGAGYCATTGAGCTA	Sense	5'UTR	418-435	Afonina 2007
70	ENV-FLAP r	GGATTRGCCGCATTC	Antisense	5'UTR	459-474	Afonina 2007
71	ENV-1	GATTGTCACCATAAGCAGC	Antisense	5'UTR	580-598	Bessaud et al., 2008
72	ENV-2	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Sense	5'UTR	451-469	Bessaud et al., 2008
73	AMTH	GCIATGYTIGSIACIAYVT	Sense	VP3	2204-2223	Bessaud et al., 2008b
74	GDCL	ARIABICCCRCARTCICC	Antisense	2A	3695-3714	Bessaud et al., 2008b
75	HEV2AB.d	GAIGYIATGGARCARGG	Sense	2B	3809-3825	Bessaud et al., 2008b
76	HEV2C3A.c	GGICCYTGRAAIARIGCYTC	Antisense	3A	5087-5106	Bessaud et al., 2008b
77	HEV3C.d1	AAYGARAARTTYMGIGAYAT	Sense	3C	5666-5685	Bessaud et al., 2008b
78	HEV3D.c2	ACRTCRTCICRTAIGCIAYCAT	Antisense	3D	6944-6966	Bessaud et al., 2008b
79	UG-52-FLAP	CAAGCACTTCTGTTCCCCGG	Sense	5'UTR	168-188	*
80	UC-53-FLAP	TTGTCACCATAACCAGCCA	Antisense	5'UTR	588-606	*

Πίνακας 2.4 : Εκκινητικά μόρια που ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα ClustalW

* Σχεδιάστηκαν στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

2.3. Κυτταροκαλλιέργειες

Όλα τα ιικά στελέχη, τόσο τα πρότυπα όσο και τα κλινικά, υπήρχαν διαθέσιμα σε κυτταροκαλλιέργειες. Η απομόνωση και η οροταυτοποίηση όλων των κλινικών στελεχών προηγήθηκαν της παρούσας μελέτης (Kottaridi et al., 2004). Επομένως ήταν διαθέσιμες μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες με ταυτοποιημένα στελέχη, τα οποία χρειάστηκε σε κάποιες περιπτώσεις να ανακαλλιεργηθούν με σκοπό την αύξηση του ιικού φορτίου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτταρικές σειρές RD (human rhabdomyosarcoma) και Hep2 (human epidermoid carcinoma), καθώς δεν υπάρχει μια μόνο κυτταρική σειρά στην οποία μπορούν να πολλαπλασιαστούν όλοι οι ορότυποι των Echo ιών.

Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε ειδικές καμπίνες βιολογικής ασφαλείας επιπέδου 2, με κάθετη νηματική ροή αέρα και με χρήση αποστειρωμένων υλικών (υγρών αντιδραστηρίων και πλαστικών σκευών). Υπάρχουν δύο ήδη μέσων καλλιέργειας. Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιείται μέσο καλλιέργειας για ανάπτυξη (Growth Medium, GM), το οποίο διαθέτει υψηλή περιεκτικότητα σε ορό (συνήθως 5- 10%), επάγοντας τη γρήγορη ανάπτυξη των κυττάρων. Για τη διατήρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται το μέσο καλλιέργειας για διατήρηση (Maintenance Medium, MM), το οποίο έχει περιεκτικότητα σε ορό περίπου 2% και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών σε μία κατάσταση αργής κυτταρικής ανάπτυξης κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού των ιών.

2.3.1 Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονται στους -80°C παρουσία DMSO. Για την απόψυξη τους, τα κύτταρα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο με απεσταγμένο νερό σε θερμοκρασία δωματίου, έως ότου τα κύτταρα ξεπαγώσουν. Ακολουθεί μεταφορά των κυττάρων και του θρεπτικού μέσου σε πλαστική φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα GM (10 ml) για την παραγωγή κυτταρικής μονοστιβάδας και στη συνέχεια, η πλαστική φιάλη επωάζεται για 2-4 ώρες σε ειδικό κλίβανο θερμοκρασίας 37°C. Ακολουθεί απομάκρυνση του DMSO και προσθήκη 10 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού GM. Η φιάλη επανατοποθετείται στους 37°C ώστε να πραγματοποιηθεί η ανάπτυξη των κυττάρων.

2.3.2 Αναδιπλασιασμός κυττάρων

Για τον αναδιπλασιασμό των κυττάρων, το θρεπτικό μέσο απομακρύνεται και γίνονται δύο διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα τρυψίνης-EDTA και επώαση για 2 min στους 37°C για την αποκόλληση των κυττάρων, η οποία ελέγχεται σε ανάστροφο

μικροσκόπιο. Κατόπιν τα κύτταρα αναδιαλύονται σε 21 ml μέσου καλλιέργειας GM και μοιράζονται σε 3 πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, οι οποίες τοποθετούνται για ανάπτυξη στους 37°C. Πρέπει να σημειωθεί ότι η θρυψίνη είναι πρωτεολυτικό ένζυμο και χρησιμοποιείται για την αποκόλληση κυττάρων από γυάλινα ή πλαστικά υποστρώματα. Επίσης για την αποκόλληση κυττάρων χρησιμοποιείται το EDTA, το οποίο αποτελεί παράγοντα δέσμευσης ιόντων (chelating agent).

2.3.3 Κατάψυξη κυττάρων

Με σκοπό την αποκόλληση των κυττάρων, δύο πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας υφίστανται τρυψινοποίηση. Το περιεχόμενό τους διαλύεται σε 1 ml μέσου καλλιέργειας για διατήρηση (χωρίς ορό) το οποίο εμπλουτίζεται με 10% DMSO και 20% ορό (Fetal Calf Serum, Sigma, USA). Το αιώρημα κυττάρων μεταφέρεται σε ειδική αμπούλα η οποία τοποθετείται μέσα σε συσκευή ισοπροπανόλης στους -80°C, η οποία επιτρέπει την σταδιακή πτώση της θερμοκρασίας. Μετά από 4 ώρες η αμπούλα απομακρύνεται από την συσκευή ισοπροπανόλης και φυλάσσεται στους -80°C.

2.3.4 Διαλύματα :

Ερυθρό της φαινόλης (Phenol red) : Αποτελεί δείκτη pH. Δημιουργία διαλύματος 0,4% w/v (Merck, Germany) σε απιονισμένο νερό. Αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

NaHCO₃ 7,5% : Προσθήκη 7,5 gr NaHCO₃ (Sigma, USA) σε 50 ml απιονισμένο νερό. Προστίθενται 0,2 ml ερυθρού της φαινόλης 0,4% w/v και απιονισμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100 ml. Αποστείρωση σε κλίβανο 10 psi για 15 min.

Διάλυμα πενικιλίνης-στρεπτομυκίνης : 1x10⁶ units πενικιλίνης και 1 gr στρεπτομυκίνης διαλύονται σε 100 ml PBS. Αποστείρωση μέσω φιλτραρίσματος.

Growth Medium (Eagle's), GM : Για 100 ml Eagle's Growth Medium χρειάζονται 83,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate) (Sigma, USA), 1 ml L-glutamine (200mM) (Gibco, USA), 10 ml Fetal Calf Serum (Sigma, USA): 3,5 ml διάλυμα NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M (Merck, Germany), 1 ml διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης, 0,2 ml διαλύματος 0,4% ερυθρού της φαινόλης.

Maintenance Medium (Eagle's), MM : Για 100 ml Eagle's Maintenance Medium χρειάζονται 90,3 ml Eagle's minimum essential medium (Earl's salts base, no bicarbonate), 1 ml L-glutamine (200mM), 2 ml Fetal Calf Serum, 4,5 ml, διάλυμα

NaHCO₃ 7,5%, 1 ml HEPES 1M, 1 ml, διάλυμα πενικιλίνης στρεπτομυκίνης, 0,2 ml διαλύματος 0,4% ερυθρό της φαινόλης.

Τρυψίνη-EDTA : διάλυμα τρυψίνης-EDTA (10X, Biosera) αραιώνεται 1/10 με διάλυμα Hank's Balanced Salts (Na Bicarbonate) (Biosera).

2.4 Μόλυνση κυτταρικών σειρών

Σε πλαστικούς σωλήνες καλλιέργειας μεταφέρονται 2 ml αιωρήματος κυττάρων σε θρεπτικό μέσο GM D-MEM (Dulbecco essential medium, Biosera) ή MEM (Biosera) για τις RD και Hep2 κυτταρικές σειρές αντίστοιχα. Οι σωλήνες επωάζονται στους 37°C για 24-48 h. Αφού διαπιστωθεί η ανάπτυξη μονοστιβάδας κυττάρων στους σωλήνες, το GM αντικαθίσταται με 2 ml MM. Οι σωλήνες μεταφέρονται σε άλλο θάλαμο εργασίας, όπου γίνεται ο ενοφθαλμισμός 200-500μl από το ικό απόθεμα. Ακολουθεί επώαση σε κυκλικό επωαστήριο στους 37°C. Έγιναν ένα ή δύο περάσματα, διάρκειας 1-5 μέρες το καθένα, μέχρι να παρατηρηθεί πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση (CPE). Οι μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες διατηρούνται στους -80°C.

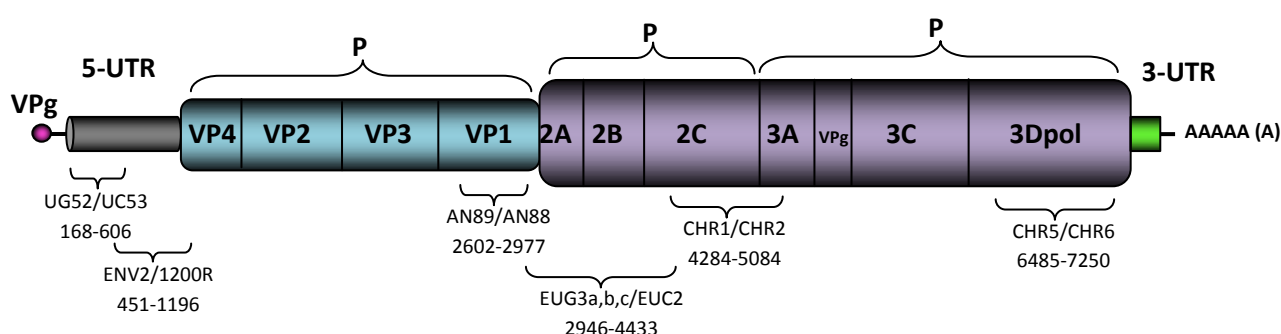
2.5 Εκχύλιση του ιικού RNA

Μετά την παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης, εφαρμόζεται μια μέθοδος εξαγωγής του ιικού RNA, με θειοκυανιούχο γουανιδίνη (GuSCN) (Casas et al., 1995).

Σε πλαστικούς σωλήνες των 2ml , προστίθενται 200μl από κάθε μολυσμένη κυτταροκαλλιέργεια, με 10μl γλυκογόνο (100mg/ml) και 300μl διαλύματος θειοκυανιούχου γουανιδίνης. Ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) για 20 λεπτά, με σκοπό να επιτευχθεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνικών καψιδίων, ώστε να απελευθερωθεί το ικό RNA. Στη συνέχεια προστίθενται 400μl παγωμένης (-20°C) ισοπροπανόλης και μετά από ισχυρή ανάδευση, γίνεται επώαση για 20 λεπτά στους -20°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000xg στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500μl παγωμένης (-20°C) αιθανόλης 70% και μετά από ισχυρή ανάδευση γίνεται ξανά φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000xg στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και πάλι και το ίζημα επαναδιαλύεται σε 200μl διπλά απιονισμένο νερό (ddH₂O) ελεύθερο από ριβονουκλεάσες. Το ικό RNA φυλάσσεται στους -80°C για μακροπρόθεσμη χρήση.

2.6 Εκκινήτες

Μετά από επεξεργασία της στοίχισης των εκκινήτων με τις αλληλουχίες των προτύπων στελεχών Echo, προέκυψαν 6 ζεύγη εκκινήτων, τα οποία καλύπτουν ένα μεγάλο μέρος του γονιδιώματος (**Εικόνα 2.1**). Όλα τα εκκινητικά μόρια έχουν σχεδιαστεί σε προηγούμενες εργασίες. Με σκοπό την ενίσχυση γενωμικών περιοχών με μεγάλη ποικιλότητα, έχουν σχεδιαστεί ειδικοί εκφυλισμένοι εκκινητές, οι οποίοι περιλαμβάνουν στην αλληλουχία τους νουκλεοτιδικές θέσεις όπου υπάρχουν μείγματα βάσεων και δεοξυινοσίνη. Όλα τα ζεύγη εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, εκτός από αυτά που υβριδίζονται στην 5'UTR, αποτελούν ζεύγη εκφυλισμένων εκκινήτων.



Εικόνα 2.1 : Το γονιδίωμα των εντεροϊών και τα τμήματα που ενισχύονται από τα έξι ζεύγη εκκινητικών μορίων

Αρχικά, όλα τα προς μελέτη δείγματα, ελέγχθηκαν με ένα ζεύγος PCR εκκινήτων, οι οποίοι υβριδίζονται σε συντηρημένες περιοχές στην 5'UTR όλων σχεδόν των προτύπων των Εντεροϊών, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα ανίχνευσης όλων των προτύπων αλλά και των κλινικών στελεχών. Συγκεκριμένα, το ζεύγος UG52/UC53 ενισχύει ένα τμήμα 439 βάσεων (θέση 168-606) στην 5'UTR (Georgopoulou et al., 2000, Georgopoulou et al., 2001, Siafakas et al., 2000, Siafakas et al., 2001, Siafakas et al., 2002a, Siafakas et al., 2002b).

Ακολούθησε η εφαρμογή των υπόλοιπων ζευγών εκκινήτων. Το ζεύγος ENV2/1200R, ενισχύει ένα τμήμα 746 βάσεων (θέση 451-1196) στην 5'UTR και VP4. Για την VP1 περιοχή, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινήτων AN89/AN898, το οποίο ενισχύει ένα τμήμα 376 βάσεων (θέση 2602-2977). Ένα τμήμα 1488 βάσεων (θέση 2946-4433), που καλύπτει το τέλος της VP1 ως την αρχή της 2C περιοχής, ενισχύεται από τα εκκινητικά μόρια EUG3a,b,c/EUC2 (Caro et al., 2001). Το ζεύγος CHR1/CHR2 (Lukashev et al., 2005) ενισχύει ένα τμήμα 800 βάσεων (θέση 4284-5084) στην 2C περιοχή και το ζεύγος CHR5/CHR6 (Kyriakopoulou et al., 2010), ένα τμήμα 786 βάσεων (θέση 6485-7250) στην 3D περιοχή.

Η αλληλουχία όλων των εκκινητικών μορίων φαίνεται στον **Πίνακα 2.5**.

Εκκινητής	Αλληλουχία (5'-3')	Πολικότητα	Περιοχή	Θέση	Βιβλιογραφική αναφορά
UG ₅₂	CAAGCACTTCTGTTTCCCGG	Sense	5'UTR	168-188	Georgopoulou et al. (2000)
UC ₅₃	TTGTACCATAACCAGCCA	Antisense	5'UTR	588-606	Georgopoulou et al., 2000
ENV-2	CCCCTGAATGCGGCTAATC	Sense	5'UTR	451-469	Bessaud et al., 2008
1200R	GGGAATTTCCACCACCCC	Antisense	VP4	1196-1177	Lukashev et al., 2005
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	Sense	VP1	2602-2627	Nix et al., 2006
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT	Antisense	VP1	2977-2951	Nix et al., 2006
EUG3a	TGGCAAACCTCCWCCAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3b	TGGCAAACATCTTCMAATCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUG3c	TGGCAGACTTCAACHAACCC	Sense	VP1	2946-2965	Caro et al., 2001
EUC2	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	Antisense	2C	4413-4433	Caro et al., 2001
EUC2a	GGTTCAATACGGCATTTG	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al., 2001
EUC2b	GGTTCAATACGGTGTGCT	Antisense	2C	4428-4448	Caro et al., 2001
CHR1	CNTCHCARAGTGAYCARGARCARYT	sense	2C	4284-4308	Kottaridi et al. 2007
CHR2	GTAYACYGGTGGWCCYTGRAAKA	antisense	3A	5084-5061	Kottaridi et al. 2007
CHR5	ATCCAGYTTGAAYGAYTCIGIRG	Sense	3D	6485-6507	Kyriakopoulou et al., 2010
CHR6	GAAYTCYTCRTAYTCKTGCTCYCC	Antisense	3D	7250-7227	Kyriakopoulou et al., 2010

Πίνακας 2.5 : Αλληλουχία, πολικότητα και ακριβής θέση στόχευσης των εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Δοκιμάστηκαν και άλλα ζεύγη εκκινητών (72437/HEV-C-9, 1700F/2200R, AMTH/3100R, 2100F/AN88, O12/O11, 2400F/3100R, 2100F-222, UG1-222, **Πίνακας 2.4**), τα οποία παρόλο που σύμφωνα με τα αποτελέσματα του προγράμματος ClustalW φαινόταν κατάλληλα, δεν έδωσαν τα ανάλογα αποτελέσματα.

2.7 Αντίστροφη Μεταγραφή

Για τη μετατροπή του ιικού RNA, που απομονώθηκε προηγουμένως από τις μολυσμένες κυτταροκαλλιέργειες, σε cDNA, εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικά πρωτόκολλα.

Στην πρώτη περίπτωση η διαδικασία πραγματοποιήθηκε ως εξής: 5 μl ιικού RNA, και 1 μl τυχαίων εκκινητικών μορίων (100pmol/μl)(Random primers, d(N9) Takara, Japan), 1 μl dNTPs (10mM each) και 5 μl ddH₂O ελεύθερο νουκλεασών, επωάστηκαν στους 65°C για 5 λεπτά ώστε τα μόρια του RNA να αποδιαταχθούν και τα εκκινητικά μόρια να υβριδοποιηθούν. Μετά τη διακοπή της αντίδρασης και τη μεταφορά σε πάγο, προστέθηκε σε κάθε δείγμα, μείγμα αποτελούμενο από 4μl 5x first strand Buffer, 2μl 0,1M DTT, 0,5μl αναστολέα ριβονουκλεασών RNase out (20 u/μl), 0,5μl

αντίστροφη μεταγραφάση RT (100u/μl)(Invitrogen Superscript II) και 1μl ddH₂O ελεύθερο νουκλεασών. Ακολουθεί επώαση στους 25°C για 12 λεπτά, στους 42°C για 50 λεπτά και στους 70°C για 15 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης το cDNA φυλάσσεται στους -20°C.

Στην περίπτωση των εκκινητών EUG2a,b,c/EUC2, χρειάζεται να προηγηθεί αντίστροφη μεταγραφή, όχι με τυχαίους εκκινητές αλλά με εξειδικευμένους εκκινητές, EUC2a, EUC2b. Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10pmol από καθέναν από τους δύο αντικωδικούς εκκινητές (1μl από τον καθένα), οι οποίοι επώαστηκαν μαζί με 1 μl dNTPs (10mM each), 4 μl ddH₂O ελεύθερο νουκλεασών και 5 μl ιικού RNA στους 65°C για 5 λεπτά. Σε σχέση με το προηγούμενο πρωτόκολλο, παραλείπεται το στάδιο των 25°C.

2.8 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης – PCR

Μετά την παραγωγή του cDNA ακολουθεί η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) η οποία επιτρέπει την ενίσχυση in vitro ενός τμήματος cDNA, το οποίο οριοθετείται από τα εκκινητικά μόρια (**Πίνακας 2.5**). Η αντίδραση PCR εφαρμόστηκε σε όλα τα πρότυπα στελέχη Echo ιών (**Πίνακας 2.1**), σε πέντε στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (**Πίνακας 2.2**) και σε πέντε κλινικά στελέχη (**Πίνακας 2.3**).

Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 3 μl cDNA του κάθε δείγματος, 2μl εκκινητών (1μl από κάθε εκκινητή 50pmol), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Pac reaction buffer), 5 μl μείγματος νουκλεοτιδίων (dNTPs 10mM, Invitrogen, UK), 2.5 units Pac DNA πολυμεράσης (Pac5000 Strategene) και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 50 μl.

Για κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιείται ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης του cDNA στους 95°C για 2 λεπτά και ακολουθεί η εφαρμογή, των διαφορετικών για κάθε ζεύγος εκκινητών, συνθηκών αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης (**Πίνακας 2.6**). Το τελικό στάδιο σε όλες τις αντιδράσεις περιλαμβάνει επώαση για 5min στους 72°C για πλήρη σύνθεση των μη ολοκληρωμένων νεοσυντιθέμενων προϊόντων.

Ζεύγος Εκκινητών	Συνθήκες	Μέγεθος προϊόντος	Κύκλοι
UG₅₂ /UC₅₃ dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη:95°C για 30sec Υβριδισμός:45°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 30sec	439	40
ENV-2/1200R dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 55°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 30sec	746	40
AN89/ AN88 dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός:65°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 30sec	376	40
EUG3a,b,c/ EUC2 dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη:95°C για 30sec Υβριδισμός:50°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 2 min	1488	40
CHR1/ CHR2 dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 55°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 30sec	801	40
CHR5/ CHR6 dNTPs 1mM, MgCl ₂ 2mM	Αποδιάταξη: 95°C για 30 sec Υβριδισμός: 50°C για 30sec Επιμήκυνση:72°C για 30sec	766	40

Πίνακας 2.6: Συνθήκες της αντίδρασης PCR για όλα τα ζεύγη εκκινητών.

2.9 Ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων σε πηκτή αгарόζης

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αгарόζης (Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αгарόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αгарόζης, 10 µl PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των

δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 1 h. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε.

Διαλύματα :

5x TBE: 5,4% Tris Base, 2,75% H₃BO₃ (Merck, Germany) και 10μM EDTA

διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό.

Κυανό της βρωμοφαινόλης: 1mM EDTA, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 40% σουκρόζη.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα PCR – Πρότυπα στελέχη

Έξι διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (**Πίνακας 2.5**) εφαρμόστηκαν σε αντιδράσεις PCR με σκοπό την ενίσχυση του γονιδιώματος όλων των προτύπων στελεχών Echo (**Πίνακας 2.1**) αλλά και των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες (CAV1, CBV1, S1, S2, S3) (**Πίνακας 2.2**). Τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 3.1**.

Αναλυτικά, το ζεύγος UG52/UC53, ήταν αποτελεσματικό στην ενίσχυση όλων των προτύπων στελέχη Echo και των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς είναι ένα ζεύγος εκκινητών με το οποίο μπορεί να γίνει ανίχνευση όλων των Εντεροϊών. Ομοίως, το ζεύγος ENV2/1200R που δεν έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν, ήταν αποτελεσματικό σε όλα τα πρότυπα στελέχη Echo και στους μάρτυρες. Το ζεύγος AN89/AN88, είχε θετικό αποτέλεσμα σε όλα, εκτός από το E21. Στα στελέχη E12, E25 και S1 η ενίσχυση ήταν περιορισμένη. Οι εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2 είχαν θετικό αποτέλεσμα σε 24 από τα 28 πρότυπα στελέχη και στα στελέχη μάρτυρες όπου εφαρμόστηκαν. Στα στελέχη E2, E17, E20 και E25 δεν έγινε ενίσχυση, ενώ έγινε περιορισμένη ενίσχυση στα στελέχη E3, E12, E16. Το ζεύγος CHR1/CHR2 ήταν αποτελεσματικό σε όλα τα πρότυπα στελέχη Echo και στους μάρτυρες, εκτός από τα τρία στελέχη S1, S2, S3. Με το ζεύγος CHR5/CHR6, η ενίσχυση ήταν περιορισμένη στα στελέχη E1, E6, E7, E9 και δεν έγινε στα στελέχη E12, E25, E30, E33. Από τα στελέχη μάρτυρες, ενισχύθηκε το CAV1, λιγότερο το CBV1 και καθόλου τα Sabin στελέχη.

3.2 Αποτελέσματα PCR – Κλινικά στελέχη

Και τα έξι ζεύγη εκκινητών, εφαρμόστηκαν επιλεκτικά σε πέντε κλινικά δείγματα και τα αποτελέσματα φαίνονται στον **Πίνακα 3.2**.

Τα ζεύγη UG52/UC53 και ENV2/1200R ήταν αποτελεσματικά σε όλα τα κλινικά στελέχη. Με το ζεύγος AN89/AN88, δεν ενισχύθηκε ένα μόνο από τα πέντε κλινικά στελέχη και τα δύο ενισχύθηκαν με μικρή απόδοση. Με τους εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2 έγινε επιτυχής ενίσχυση όλων των κλινικών στελεχών, με περιορισμένη ενίσχυση ενός μόνο στελέχους. Ένα από τα κλινικά στελέχη δεν ενισχύθηκε, με τους εκκινητές CHR1/CHR2 και ένα ενισχύθηκε περιορισμένα. Τέλος, το ζεύγος CHR5/CHR6 ενίσχυσε αποτελεσματικά μόνο ένα και από τα πέντε κλινικά στελέχη και ένα με μικρή απόδοση.

PCR-Πρότυπα στελέχη Echo						
Ορότυπος	UG52/UC53	ENV2/1200R	AN88/AN89	EUG3a,b,c/ EUC2	CHR1/CHR2	CHR5/CHR6
E1	+	+	+	+	+	+ Αχνή μπάντα
E2	+	+	+	-	+	+
E3	+	+	+	+ Αχνή μπάντα	+	+
E4	+	+	+	+	+	+
E5	+	+	+	+	+	+
E6	+	+	+	+	+	+ Αχνή μπάντα
E7	+	+	+	+	+	+ Αχνή μπάντα
E9	+	+	+	+	+ Αχνή μπάντα	+ Αχνή μπάντα
E11	+	+	+	+	+	+
E12	+	+	+ Αχνή μπάντα	+ Αχνή μπάντα	+	-
E13	+	+	+	+	+	+
E14	+	+	+	+	+	+
E15	+	+	+	+	+	+
E16	+	+	+	+ Αχνή μπάντα	+	+
E17	+	+	+	-	+	+
E18	+	+	+	+	+	+
E19	+	+	+	+	+	+
E20	+	+	+	-	+	+
E21	+	+	-	+	+	+
E24	+	+	+	+	+	+
E25	+	+	+ Αχνή μπάντα	-	+	-
E26	+	+	+	+	+	+
E27	+	+	+	+	+	+
E29	+	+	+	+	+	+
E30	+	+	+	+	+	-
E31	+	+	+	+	+	+
E32	+	+	+	+	+	+
E33	+	+	+	+	+	-
CAV1	+	+	+	+	+	+ Αχνή μπάντα
CBV1	+	+	+	+	+	+
S1	+	+	+ Αχνή μπάντα	(Δεν έγινε)	-	-
S2	+	+	+	+	-	-
S3	+	+	+	(Δεν έγινε)	-	-

Πίνακας 3.1: Αποτελέσματα PCR των προτύπων στελεχών

PCR-Κλινικά στελέχη Echo						
	UG52/UC53	ENV2/1200R	AN88/AN89	EUG3a,b,c/ EUC2	CHR1/CHR2	CHR5/CHR6
E5 156/98/1	+	+	+ Αχνή μπάντα	+	-	+
E6 Tsikan	+	+	+	+	+	-
E14 1729	+	+	+ Αχνή μπάντα	+	+	-
E30Das 85929	+	+	+	+ Αχνή μπάντα	+	-
E30 Kar 85671	+	+	-	+	+ Αχνή μπάντα	+ Αχνή μπάντα

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα PCR των κλινικών στελεχών

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι Echo ιοί είναι σημαντικοί παράγοντες παθογένειας, ιδιαίτερα σε νήπια και οι πιο συνηθισμένοι από τους Εντεροϊούς. Παρόλο που η μόλυνση με Echo ιούς είναι συνήθως ασυμπτωματική, είναι υπεύθυνοι για πολλά σημαντικά κλινικά συμπτώματα. Για το λόγο αυτό, υπάρχει ανάγκη για γρήγορη ανίχνευση και ταυτοποίησή τους.

Γενικά οι σύγχρονες μοριακές μέθοδοι που βασίζονται στην RT-PCR, παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάγνωση των μολύνσεων με Εντεροϊούς. Στόχος είναι η γρήγορη και με υψηλή ευαισθησία ανίχνευση όλων των μελών του γένους των Εντεροϊών. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη στόχευση ειδικών περιοχών του γονιδιώματος, της ενίσχυση και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους. Για τον σκοπό αυτό έχουν σχεδιαστεί διαφόρων ειδών εκκινητές, που περιλαμβάνουν γενικούς, ειδικούς αλλά και εκφυλισμένους εκκινητές, οι οποίοι στοχεύουν σε διάφορες περιοχές του γονιδιώματος, σχετικά συντηρημένες όπως η 5'UTR ή ακόμα και ιδιαίτερα μεταβλητές όπως η VP1.

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η ειδικότητα και καταλληλότητα κάποιων από τους ήδη σχεδιασμένους εκκινητές που αναφέρθηκαν και φαίνονται στον **Πίνακα 2.4**. Σκοπός της εργασίας είναι η εύρεση μιας ομάδας εκκινητικών μορίων τα οποία στοχεύουν σε διάσπαρτες περιοχές και καλύπτουν μεγάλο μέρος του γονιδιώματος των Echo ιών, με στόχο τη γρήγορη ανίχνευση τους και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του γονιδιώματος οποιουδήποτε στελέχους.

Με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής ClustalW, έγινε στοίχιση όλων των διαθέσιμων ήδη σχεδιασμένων εκκινητικών μορίων, με την γενωμική αλληλουχία όλων των προτύπων στελεχών Echo, με σκοπό την εύρεση των καταλληλότερων, τόσο ως προς την αλληλουχία τους όσο και την θέση υβριδισμού τους στο ιικό γονιδίωμα. Τα ζεύγη που επιλέχθηκαν (**Πίνακας 2.5**) ενίσχυσαν στις περισσότερες περιπτώσεις τα τμήματα στόχους. Διερευνήθηκε επίσης το ενδεχόμενο κάποια από τα εκκινητικά μόρια να είναι ειδικά μόνο για τους Echo ιούς. Ωστόσο δεν προέκυψε κάποιο τέτοιο συμπέρασμα.

Όπως φαίνεται και από προηγούμενες συγκριτικές μελέτες (Kottaridi et al., 2004, Bolanaki et al., 2005) κάθε περιοχή ενδείκνυται για διαφορετικό σκοπό. Η 5'UTR είναι μια σχετικά συντηρημένη περιοχή στο γονιδίωμα των Εντεροϊών. Για το λόγο αυτό η ενίσχυση τμημάτων της χρησιμοποιείται για την ανίχνευση τους. Η VP1 περιοχή έχει αποδειχθεί (Oberste et al., 1998, Oberste et al., 1999, Caro et al., 2001, Norder et al., 2001) ότι σχετίζεται άμεσα με τον ορότυπο. Η VP1 καψιδιακή

πρωτεΐνη, βρίσκεται κυρίως στην επιφάνεια του ώριμου ιοσώματος και φέρει αντιγονικές θέσεις (Mateu et al., 1995). Για τον λόγο αυτό είναι και η πιο μεταβλητή περιοχή του γονιδιώματος και είναι κατάλληλη για την ταυτοποίηση των εντεροϊών. Εμπόδιο στον σχεδιασμό εκκινητών στη VP1 περιοχή, αποτελεί η μεγάλη ενδοτυπική ποικιλομορφία. Τη λύση δίνουν οι εκφυλισμένοι εκκινητές οι οποίοι περιέχουν δεοξυινোসίνη και μείγματα βάσεων, με αποτέλεσμα την επιτυχή ενίσχυση της VP1 περιοχής όλων των οροτύπων των Εντεροϊών (Oberste et al., 2003). Λόγο του μεγάλου αριθμού οροτύπων, η δυσκολία σχεδιασμού εκκινητών για την αποκλειστική ταυτοποίηση των Echo ιών, είναι ακόμα μεγαλύτερη.

Στην 5'UTR εφαρμόστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών. Το ζεύγος UG52/UC53, ήταν αποτελεσματικό στην ανίχνευση τόσο των προτύπων Echo στελεχών όσο και των μαρτύρων. Είναι οι καταλληλότεροι εκκινητές για την ανίχνευση προτύπων και κλινικών στελεχών. Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που στοχεύει στην 5'UTR/VP4, ENV2/1200R, ήταν εξίσου αποτελεσματικό σε όλα τα στελέχη στα οποία δοκιμάστηκε. Με περαιτέρω διερεύνηση, θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητά του για την ανίχνευση όλων των εντεροϊών.

Στην VP1 περιοχή, εφαρμόστηκε το ζεύγος εκκινητών AN89/AN88, με αρκετά καλή απόδοση. Επίσης, οι εκκινητές EUG3a,b,c/EUC2a, ενισχύουν ένα μεγάλο τμήμα του γονιδιώματος που περιλαμβάνει το 3' άκρο της VP1, τις 2A, 2B και το 5' άκρο της 2C περιοχής. Τα αποτελέσματα στα πρότυπα στελέχη ήταν σχετικά καλά. Το επόμενο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε, CHR1/CHR2, ενισχύει ένα τμήμα που περιλαμβάνει τις 2C και 3A περιοχές. Ενίσχυσε αποτελεσματικά όλα τα πρότυπα στελέχη Echo και τους μάρτυρες, εκτός από τα εμβολιακά στελέχη S1, S2, S3. Στην 3D περιοχή εφαρμόστηκε το ζεύγος CHR5/CHR6. Δεν ενίσχυσε επιτυχώς τα 4 από τα 28 πρότυπα στελέχη και γενικά είχε χαμηλότερη απόδοση. Όπως και το ζεύγος CHR1/CHR2, δεν ενίσχυσε τα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών, S1, S2, S3. Τα δύο ζεύγη είναι επίσης εκφυλισμένα και σχεδιάστηκαν για την εφαρμογή σε Echo στελέχη (Kottaridi et al., 2007, Kyriakopoulou et al., 2010).

Ακολούθησε η εφαρμογή και των έξι ζευγών εκκινητών σε πέντε κλινικά δείγματα, από την οποία φάνηκε ότι μόνο το ζεύγος CHR5/CHR6 στην 3D περιοχή, ίσως δεν είναι ιδιαίτερα κατάλληλο και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση.

Γενικά, τα αποτελέσματα των πειραμάτων είναι αρκετά ικανοποιητικά. Με τη χρήση των συγκεκριμένων εκκινητικών μορίων, μπορούν να ενισχυθούν αρκετά μεγάλα τμήματα σε όλο το μήκος του γονιδιώματος των Echo ιών. Μετά την αλληλούχιση τους, μπορούν να σχεδιαστούν νέοι εκκινητές πάνω στις περιοχές αυτές, έτσι ώστε να καλυφθεί και να ενισχυθεί όλο σχεδόν το γονιδίωμα

οποιοιδήποτε στελέχους Echo ιού. Επιτυγχάνεται έτσι ο γρήγορος προσδιορισμός της αλληλουχίας του. Η εφαρμογή σε περισσότερα κλινικά στελέχη, θα επιβεβαιώσει την σημαντικότητα των αποτελεσμάτων.

Μελλοντικά θα μπορούσε να σχεδιαστεί μια multiplex PCR, μέσω της οποίας θα είναι εφικτή η γρήγορη ανίχνευση Echo ιών και η ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιοχών του γονιδιώματος με σκοπό τον προσδιορισμό της αλληλουχίας. Η ανάλυση του γονιδιώματος όσο το δυνατόν περισσότερων στελεχών Echo, θα βοηθήσει στην κατανόηση της δράσης τους και ίσως στην ανάπτυξη αντιικών παραγόντων.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afonina I, Ankoudinova I, Mills A, Lokhov S, Huynh P, Mahoney W. (2007)** Primers with 5' flaps improve real-time PCR. *Biotechniques*. 2007 Dec;43(6):770, 772, 774.
- Andino R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, and D. Baltimore. 1993.** Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *The EMBO Journal* 12(9): 3587-3598.
- Ansardi, D. C., M. Luo, and C. D. Morrow. 1994.** Mutations in the poliovirus P1 capsid precursor at arginine residues VP4-ARG34, VP3 ARG223, and VP1-ARG129 affect virus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Virology*. **199**:20-34
- Agol V.I., Paul A.V., Wimmer E. (1999).** Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res*. 62(2): 129-47. Review.
- Ambros V, Baltimore D. (1980)** Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'-terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*. 1980 Jul 25;255(14):6739-44.
- Andersson P, Edman K, Lindberg AM. (2002)** Molecular analysis of the echovirus 18 prototype: evidence of interserotypic recombination with echovirus 9. *Virus Res*. 2002 Apr 23;85(1):71-83.
- Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow (1996)** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res*. 46:1-68.
- Back, S. H., Y. K. Kim, W. J. Kim, S. Cho, H. Rang Oh, J.E. Kim, and S. K. Jang. (2002).** Translation of Polioviral mRNA Is Inhibited by Cleavage of Polypyrimidine Tract-Binding Proteins Executed by Polioviral 3Cpro. *J.Virol*. **76**:2529-2542.
- Balanant J, Guillot S, Candrea A, Delpeyroux F, Crainic R. (1991)** The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay. *Virology*. 1991 Oct;184(2):645-54.
- Bell EJ, McCartney RA, Basquill D, Chaudhuri AK. (1986)** Mu-antibody capture ELISA for the rapid diagnosis of enterovirus infections in patients with aseptic meningitis. *J Med Virol*. 1986 Jul;19(3):213-7.
- Belnap D. M., McDermott B. M. Jr, Filman D. J., Cheng N., 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**:73-8.
- Belov G. A., Bonnet N. A., Kovtunovych G., Jackson C. L., Lippincott-Schwartz J., and Ehrenfeld E. (2007)** Hijacking Components of the Cellular Secretory Pathway for Replication of Poliovirus RNA. *J. Virol*. **81**:558-567.

Banerjee R, Dasgupta A. (2001) Interaction of picornavirus 2C polypeptide with the viral negative-strand RNA. *J Gen Virol.* 2001 Nov;82(Pt 11):2621-7.

Bergelson, J. M., M. P. Shepley, B. M. C. Chan, M. E. Hemler, and R. W. Finberg, (1992). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* **255**:1718–1720.

Bergelson, J. M., B. M. C. Chan, R. W. Finberg, and M. E. Hemler, (1993). The integrin VLA-2 binds echovirus 1 and extracellular matrix ligands by different mechanisms. *J. Clin. Invest.* **92**:232–239.

Bergelson, J. M., N. St. John, S. Kawaguchi, M. Chan, H. Stubdal, J. Modlin, and R. W. Finberg. (1993). Infection of echoviruses 1 and 8 depends on the $\alpha 2$ subunit of human VLA-2. *J. Virol.* **67**:6847–6852.

Bergelson, J. M., M. Chan, K. R. Solomon, N. F. St. John, H. Lin, and R. W. Finberg, (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., St. John, N. F., Kawaguchi, S., Pasqualini, R., Berdichevsky, F., Hemler, M. E., and Finberg, R. W. (1994) The I domain is essential for echovirus interaction with VLA-2. *Cell Adhesion and Commun.* **2**, 455–464

Bessaud M, Jegouic S, Joffret ML, Barge C, Balanant J, Gouandjika-Vasilache I, Delpeyroux F. (2008) Characterization of the genome of human enteroviruses: design of generic primers for amplification and sequencing of different regions of the viral genome. *J Virol Methods.* 2008 May;149(2):277-84. Epub 2008 Mar 10.

Bienz K, Egger D, Troxler M, Pasamontes L. (1990) Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. *J Virol.* 1990 Mar;64(3):1156-63.

Blomqvist S., Skytta A., Roivainen M., and Hovi T. (1999) Rapid detection of human rhinoviruses in nasopharyngeal aspirates by a microwell reverse transcription-PCR-hybridisation assay. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2813–2816.

Blomqvist 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**: 573-80.

Blondel B, Duncan G, Couderc T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbère-Garapin F. (1998) Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol.* 1998 Feb;4(1):1-26. Review.

Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T. (2005) Nucleotide analysis and phylogenetic study of the homology boundaries of coxsackie A and B viruses. *Virus Genes* **31**:307-20.

Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Margaritis L., and Katsorchis T. (2006) Evolution of 2B and 2C genomic parts of species B Cocksackie viruses. Phylogenetic study and comparison with other regions. *Virus Genes* **32**:249-59.

Bolanaki E., Kottaridi C., Markoulatos P., Kyriakopoulou Z., Margaritis L., and Katsorchis T. (2007) Partial 3D gene sequences of Cocksackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes*. **35**:129-40.

Boussadia O., M. Niepmann, L. Creancier, A. C. Prats, F. Dautry, and H. Jacquemin-Sablon. (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**(6): 3353-3359.

Brodbeck, W. G., D. Liu, J. Sperry, C. Mold, and M. E. Medof. 1996. Localization of classical and alternative pathway regulatory activity within the decay-accelerating factor. *J. Immunol.* **156**:2528–2533.

Brown B., Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A. (2003) Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* **77**:8973–8984.

Bubeck D, Filman DJ, Cheng N, Steven AC, Hogle JM, and Belnap DM (2005) The structure of the poliovirus 135S cell entry intermediate at 10-angstrom resolution reveals the location of an externalized polypeptide that binds to membranes. *Journal of Virology* **79**: 7745–7755

Calandria, C., A. Irurzun, Á. Barco, L. Carrasco. 2004. Individual expression of poliovirus 2Apro and 3Cpro induces activation of caspase-3 and PARP cleavage in HeLa cells. *Virus Research* **104**: 39–49.

Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., and Crainic R. (2001) Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* **82**: 79-91.

Casas I., Palacios G. F., Trallero G., Cisterna D., Freire M. C., and Tenorio A. (2001) Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *J. Med. Virol.* **65**:138–48.

Chen JH, Chiu NC, Chang JC, et al. (2005) A neonatal echovirus 11 outbreak in an obstetric clinic. *J Microbiol Immunol Infect.* **2005**;38:332-7.

Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. (1988) Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J Clin Microbiol.* **1988 Dec**;26(12):2576-80.

Chow, M., J.F. Newman, and D. Filman. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature*. **327**:482-486.

Chua B. H., McMinn P. C., Lam S. K., and Chua K. B. (2001) Comparison of the complete nucleotide sequences of echovirus 7 strain UMMC and the prototype (Wallace) strain demonstrates significant genetic drift over time. *J. Gen. Virol.* **82**:2629-39.

Colston E. and V. R. Racaniello. 1994. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *The EMBO Journal* **13**(24): 5855-5862.

Costa-Mattioli M, Svitkin Y, (2004) La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Sonenberg N. Mol Cell Biol.* 2004 Aug; **24**(15):6861-70.

Crawford L, Chapman K. (1990) Identification of a high molecular weight steroid response element binding protein. *Mol Endocrinol.* 1990 May; **4**(5):685-92.

Cuconati, A., W. Xiang, F. Lahser, T. Pfister, and E. Wimmer. 1998. A Protein Linkage Map of the P2 Nonstructural Proteins of Poliovirus. *J. Virol.* **72**: 1297-1307.

Curry S., Fry E., Blakemore W., Abu-Ghazaleh R., Jackson T., King A., Lea S., Newman J., 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.* (12): 9743-52.

De Jesus NH (2007). "Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis". *Virol. J.* **4**:70.doi:10.1186/1743-422X-4-70. PMID 17623069. PMC 1947962.

DeStefano, J. J., and O. Titilope. 2006. Poliovirus protein 3AB displays nucleic acid chaperone and helix-destabilizing activities. *J. Virol.* **80**: 1662-1671.

Dobrikova E., P. Florez, S. Bradrick, and M. Gromeier. 2003. Activity of a type 1 picornavirus internal ribosomal entry site is determined by sequences within the 3' nontranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**:15125-15130.

Doedens, J. R., and K. Kirkegaard. 1995. Inhibition of cellular 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., et al. (1985). The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene.* **40**(1): 1-8. Review.

Duggal R., A. Cuconati, M. Gromeier, and E. Wimmer. 1997. Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13786-13791.

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., Bienz K. (2002). Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 76(21): 10960 – 10971.

Ehrenfeld E, Semler BL (1995). Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;203:65-83. Review.

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. Nat. Acad. Sci. USA* **86**, 9906-9910.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al., (2005). Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2005.

Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J. Minor P.D. and Hogle JM. (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8: 1567-79.

Fujita K, Krishnakumar SS, Franco D, Paul AV, London E, Wimmer E. (2007) Membrane topography of the hydrophobic anchor sequence of poliovirus 3A and 3AB proteins and the functional effect of 3A/3AB membrane association upon RNA replication. *Biochemistry.* 2007 May 1;46(17):5185-99. Epub 2007 Apr 7.

Gavrilin GV, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Kew OM, Agol VI. (2000). Evolution of circulating wild poliovirus and of vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient: a unifying model. *J Virol* 74:7381-90.

Georgescu MM, Balanant J, Macadam A, Otelea D, Combiescu M, Combiescu AA, Crainic R, Delpeyroux F. (1997). Evolution of the Sabin type 1 poliovirus in humans: characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 71:7758-7768.

Georgopoulou A., Markoulatos P., Spyrou N., and Vamvakopoulos N. C. (2000) Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications.. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4337-42.

Georgopoulou A., and Markoulatos P. (2001) Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**:792-799.

Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2000. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* **74**(18):8434-8443.

Gulevich AY, Yusupova RA, Drygin YF. (2001). A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry (Mosc).* 2001 Mar;**66**(3):345-9.

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

Halonen P, Rocha E, Hierholzer J, Holloway B, Hyypiä T, Hurskainen P, Pallansch M. (1995) Detection of enteroviruses and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. *J Clin Microbiol.* 1995 Mar;**33**(3):648-53.

Hansen J.L., A.M. Long, and S.C. Schultz. 1997.Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**: 1109–22.

Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, et al. (2005) An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol Infect.* 2005; **133**:291-298.

He Y., Bowman V. D., Mueller S., Bator C. M., Bella J., Peng X., Baker T. S., Wimmer E., Kuhn R. J., and Rossmann M. G.. (2000). Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:79–84.

He, Y., Lin, F., Chipman, P. R., Bator, C. M., Baker, T. S., Shoham, M., Kuhn, R. J., Medof, M. E. & Rossmann, M. G. (2002). Structure of decay-accelerating factor bound to echovirus 7: a virus–receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10325–10329.

Hemler, M.E. (1990) *VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes.* *Annu. Rev. Immunol.* 1990;**8**:365-400

Herold J. and R. Andino. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* **7**: 581-591.

Hindiyeh, M., Q. H. Li, R. Basavappa, J. M. Hogle, and M. Chow. 1999. Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol.* **73**:9072–79.

Hogle, J. M. 2002. Poliovirus cell entry: Common Structural Themes in Viral Cell Entry Pathways. *Annu Rev Microbiol.* 56: 677–702.

Hunt S. L., and Jackson R. J. (1999) Polypyrimidine-tract binding protein (PTB) is necessary, but not sufficient, for efficient internal initiation of translation of human rhinovirus-2 RNA. *RNA*. **5**: 344-359.

Hynes RO (1987). "Integrins: a family of cell surface receptors". *Cell* **48** (4): 549–54. doi:10.1016/0092-8674(87)90233-9. PMID 3028640

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

Jacobson S. J., D. A. Konings, and P. Sarnow. 1993. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*. **67**:2961-2971.

Jurgens C. K., Barton D. J., Sharma N., Morasco B. J., Ogram S. A., and Flanagan J. B. (2006). 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology*. **345**:346-357.

Jokinen J, White DJ, Salmela M, Huhtala M, Käpylä J, Sipilä K, Puranen JS, Nissinen L, Kankaanpää P, Marjomäki V, Hyypiä T, Johnson MS, Heino J., (2010). Molecular mechanism of alpha2beta1 integrin interaction with human echovirus 1. *EMBO J*. 2010 Jan 6;29(1):196-208.

Kamata, T., Puzon, W., and Takada, Y. (1994) Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha2beta1 (VLA-2, CD49b/CD29). *J. Biol. Chem.* **269**, 9659–9663

Kauder S. E. and Racaniello V. R. (2004) Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* **113**: 1743-53.

Kessler HH, Santner B, Rabenau H, et al. (1997). Rapid diagnosis of enterovirus infection by a new one-step reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 1997;35:976-977

Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Mulders MN, Holloway BP, Pallansch MA, Kew OM. (1996) Group-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residue at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol*. 1996 Dec;34(12):2990-6.

King A.M.Q., 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). Picornaviridae. In “Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses” (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B.

Carsten, M.K Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego.

Kirkegaard K. Baltimore D. (1986). The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47: 433 – 443.

Kirkegaard K. (1990) Mutations in VP1 of poliovirus specifically affect both encapsidation and release of viral RNA. *J Virol.* 1990 Jan;64(1):195-206.

Kondratova, A.A., N. Neznanov, R. V. Kondratov, and A. V. Gudkov. 2005. Poliovirus Protein 3A Binds and Inactivates LIS1, Causing Block of Membrane Protein Trafficking and Deregulation of Cell Division. *Cell cycle* 10:1403-1410.

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., Mamuris Z., Stathopoulos C., Markoulatos P. (2006) Molecular phylogeny of VP1, 2A, and 2B genes of echovirus isolates: epidemiological linkage and observations on genetic variation. *Arch. Virol.* 151:1117-32.

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 Helena, (1999) Academic Press, Echoviruses. In: Allan Granoff, Robert G. Webster , "Encyclopedia of Virology, 3-Volume Set, ISBN-10: 0122270304.

Kuttner-Kondo, L., D. E. Hourcade, V. E. Anderson, N. Muqim, L. Mitchell, D. C. Soares, P. N. Barlow, and M. E. Medof. 2007. Structure-based mapping of DAF's active site residues that decay accelerate the C3 convertases. *J. Biol. Chem.* 282:18552–18562.

Kuttner-Kondo, L. A., L. Mitchell, D. E. Hourcade, and M. E. Medof. 2001. Characterization of the active sites in decay-accelerating factor. *J. Immunol.* 167:2164–2171.

Kuttner-Kondo, L., Medof, M. E., Brodbeck, W. & Shoham, M. (1996) *Protein Eng.* 9, 1143–1149.

Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P. Younan, and R. E. Lloyd. 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* 24(4):1779-1790.

Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pliaka V, Mastorakos P, Stamati A, Pratti A, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. (2010) Molecular identification and full genome analysis of an echovirus 7 strain isolated from the environment in Greece. *Virus Genes*. 2010 Apr;40(2):183-92. Epub 2010 Jan 22.

Lublin DM, Atkinson JP. (1989) Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.

Lukacik, P., P. Roversi, J. White, D. Esser, G. P. Smith, J. Billington, P. A. Williams, P. M. Rudd, M. R. Wormald, D. J. Harvey, M. D. Crispin, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, D. J. Evans, B. P. Morgan, R. A. Smith, and S. M. Lea. (2004). Complement regulation at the molecular level: the structure of decayaccelerating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:1279–1284.

Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. (2003). Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 77(19): 10423-31.

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**:463-70.

Lukashev A. N., Lashkevich V. A., Ivanova O. E., Koroleva G. A., Hinkkanen A. E., and Ilonen J. (2005) Recombination in circulating Human enterovirus B: independent evolution of structural and non-structural genome regions. *J. Gen. Virol.* **86**:3281-90.

Lyons T., K. E. Murray, A. W. Roberts, and D. J. Barton. 2001. Poliovirus 5'-Terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 75(22): 10696-10708.

Madan, V., A. Castelló, and L.Carrasco. 2008. Viroporins from RNA viruses induce caspase- dependent apoptosis. *Cellular Microbiology* **10**: 437–451

Magnius LO, Saleh LH, Vikerfors T, Norder H. (1988). A solid-phase reverse immunosorbent test for the detection of enterovirus IgM. *J Virol Methods*. 1988 May;20(1):73-82.

Marcotte, L. L., A. B. Wass, D. W. Gohara, H. B. Pathak, J. J. Arnold, D. J. Filman, C.E. Cameron, and J.M. Hogle. (2007). Crystal Structure of Poliovirus 3CD Protein: Virally Encoded Protease and Precursor to the RNA-Dependent RNA Polymerase. *J.Virol.* 81:3583-3596.

Martín J, Minor PD. (2002) Characterization of CHAT and Cox type 1 live-attenuated poliovirus vaccine strains. *J Virol.* 2002 Jun;76(11):5339-49.

Mateu MG. (1995) Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res*. 1995 Sep;38(1):1-24.

Medof, M. E., D. M. Lublin, M. Holers, D. J. Ayers, R. R. Getty, J. F. Leykam, J. P. Atkinson, and M. L. Tykocinski. 1987. Cloning and characterization of cDNAs encoding the complete sequence of decay-accelerating factor of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2007–2011

Melchers W. J., Zoll J., Tessari M., Bakhmutov D. V., Gmyl A. P., Agol V. I., and Heus H. A. (2006) A GCUA tetranucleotide loop found in the poliovirus oriL by in vivo SELEX (un)expectedly forms a YNMG-like structure: Extending the YNMG family with GYYA. *RNA*. 12:1671-82.

Melnick JL, Rennick V, Hampil B, Schmidt NJ, Ho HH. (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.* 1973;48(3):263–268.

Melnick JL. (1996) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996:655-712

Melnick J.L. (2001). Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: *Fields virology*, 4rd ed.(Fields BN, Knipe DM, HowleyPM, eds). Philadelphia: Lippincott-Raven. p. 723-776.

Minor D. Philip, Morgan-Capner Peter, Muir Peter, (2000), Enteroviruses, Principles and Practice of Clinical Virology, Fourth Edition Pages: 427–449, 2000 Published Online : 15 OCT 2002, DOI: 10.1002/0470842474.ch14

Mirand A., Henquell C., Archimbaud C., Peigue-Lafeuille H., and Bailly J. L. (2007) Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. *J. Gen. Virol.* **88**:166-76.

Modlin JF (1990) Coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Mandell GL, Douglas RG, Jr and Bennet JE (eds) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, p. 1620. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M, van Loon A.M. (1998). Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202-27.

Mulders MN, Reimerink JH, Stenvik M, Alaeddinoglu I, van der Avoort HG, Hovi T, Koopmans MP. A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *Journal of General Virology* (1999), **80**, 907–916.

Mulders MN, van Loon AM, van der Avoort HG, Reimerink JH, Ras A, Bestebroer TM, Drebot MA, Kew OM, Koopmans MP. (1995) Molecular characterization of a wild poliovirus type 3 epidemic in The Netherlands (1992 and 1993). *J Clin Microbiol.* 1995 Dec;33(12):3252-6.

Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001). Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* 7: 1126-1141.

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

Narkeviciute I, Vaiciuniene D. (2004) Outbreak of echovirus 13 infection among Lithuanian children. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10:1023-5

Nix WA, Oberste MS, Pallansch MA. (2006) Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2698-704.

Norder H, Bjerregaard L, Magnius LO. Homotypic echoviruses share aminoterminal VP1 sequence homology applicable for typing. *J Med Virol.* 2001 Jan;63(1):35-44.

Nugent CI, Kirkegaard K (1995). RNA binding properties of poliovirus subviral particles. *J Virol.* 1995 Jan;69(1):13-22.

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

Olive DM, Al-Mufti S, Al-Mulla W, et al. (1990). Detection and differentiation of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J Gen Virol* 1990;71:2141-2147.

Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. (1998) Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. *Virus Res.* 1998 Nov;58(1-2):35-43.

Oberste M. S., Maher K., Kilpatrick D. R., Flemister M. R., Brown B. A., and Pallansch M. A. (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* **37**:1288-93.

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Pallansch MA. (1999) Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol.* 1999 Mar;73(3):1941-8.

Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. (1999) Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol.* 1999 Dec;37(12):3928-33.

Oberste MS, Maher K, Flemister MR, Marchetti G, Kilpatrick DR, Pallansch MA. (2000) Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1170-4.

Oberste MS, Nix WA, Maher K, Pallansch MA. (2003) Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol.* 2003 Apr;26(3):375-7.

Oberste M. S., Maher K., and Pallansch M. A. (2004) Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. *J. Virol.* **78**:855-67.

Oberste M. S., Maher K., Schnurr D., Flemister R. M., Lovchik C. J., Peters H., Sessions W., Kirk C., Chatterjee N., Fuller S., Hanauer J. M. and Pallansch A. M. (2004). Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enterovirus and the rhinoviruses. *J. Gen. Virol.* **85**:2577-2584.

Oberste M. S., Michele S. M., Maher K., Schnurr D., Cisterna D., Junttila N., Uddin M., Chomel J. J., Lau C. S., Ridha W., al-Busaidy S., Norder H., Magnus L. O., and Pallansch M. A. (2004) Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. *J. Gen. Virol.* **85**:3205-3212.

Oberste M. S., Peñaranda S., and Pallansch M. A. (2004) RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. *J. Virol.* **78**:2948-55.

Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. (2006) Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol.* 2006 Jan;87(Pt 1):119-28.

Oberste M. S, Maher K., Nix W. A., Michele S. M., Uddin M., Schnurr D., al-Busaidy S., Akoua-Koffi C., and Pallansch M. A. (2007) Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species Human Enterovirus B. *Virus Res.* **128**:34-42.

Pallansch M. and Roos R., (2007). Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 840-893

Perera, R., S. Daijogo, B. L. Walter, J. H. C. Nguyen, and B.L. Semler. 2007. Cellular Protein Modification by Poliovirus: the Two Faces of Poly(rC)-Binding Protein. *J.Virol.***81**:8919-8932.

Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. (1999) Molecular biology. In “Encyclopedia of Virology”, second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.

Pfister T., and Wimmer E. (1999) Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**: 6992-7001.

Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995). A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 23(11): 1870 – 1875.

Powell, R. M., Schmitt, V., Ward, T., Goodfellow, I., Evans, D. J. & Almond, J. W. (1998) Characterization of echoviruses that bind decay accelerating factor (CD55): evidence that some haemagglutinating strains use more than one cellular receptor. *J. Gen. Virol.* **79**, 707–713.

Prevot D., Decimo D., Herbreteau C. H., Roux F., Garin J., Luc Darlix J., and Ohlmann T. (2003) Characterization of a novel RNA – binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Jour.* **22**:1909-1921.

Quinonez M Jorge, MD (2008) Echovirus.
<http://emedicine.medscape.com/article/963458-print>

Racaniello R. Vincent (2007). Picornaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al., eds. *Fields Virology*, 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins; 2007: 796-838

Read SJ, Kurtz JB. (1999) Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol.* 1999 May;37(5):1352-5.

Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. (1987) Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology.* 1987 Oct;160(2):311-22.

Rodriguez Wells, V., J. Stephen, and J. J. DeStefano. 2001. Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Research* **74**:119–132.

Rohll JB, Moon DH, Evans DJ, Almond JW. (1995) The 3' untranslated region of picornavirus RNA: features required for efficient genome replication. *J Virol.* 1995 Dec;69(12):7835-44.

Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., 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.

Romero JR. (1999). Reverse-transcription polymerase chain reaction detection of the enteroviruses. *Arch Pathol Lab Med*. 1999 Dec;123(12):1161-9. Review.

Rotbart HA. (1990) Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses. *J Clin Microbiol*. 1990 Mar;28(3):438-42.

Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al. (1994) Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with a colorimetric microwell detection assay. *J Clin Microbiol* 1994;32:2590-2592.

Rust, R. C., L. Landmann, R. Gosert, B. L. Tang, W. Hong, H. P. Hauri, D. Egger, and K. Bienz. (2001). Cellular COPII Proteins Are Involved in Production of the Vesicles That Form the Poliovirus Replication Complex. *J. Virol*. **75**: 9808-9818

Santti J, Hyypiä T, Kinnunen L, Salminen M. (1999) Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol*. 1999 Oct;73(10):8741-9.

Santti J., Harvala H., Kinnunen L., and Hyypiä T. (2000) Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9. *J. Gen Virol*. **81**:1361-72.

Schein, C. H., N. Oezguen, D. E. Volk, R. Garimella, A. Paul, and W. Braun. 2006. NMR structure of the viral peptide linked to the genome (VPg) of poliovirus. *Peptides*. **27**: 1676–1684.

Semler, B. L., and Ertel, K. J. (2008) Picornaviridae: molecular biology, pp. 129-140. In: B. Mahy and M. Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*, 3rd edition, vol. 4. Elsevier Ltd., Oxford, U.K. 2008.

Shulman L.M., Manor Y., Azar R., Handschere R., Vonsover A., Mendelson E., Rothman S., Hassin D., Halmut T., Abramovitz B., Varsano N. (1997). Identification of a new strain of fastidious enterovirus 70 as the causative agent of an outbreak of hemorrhagic conjunctivitis. *J. Clin. Microbiol*. 35(8): 2145-9.

Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF, Barry RD. (1997) Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol*. 1997 Jun;71(6):4736-43. PMID:9151867

Sharma R., Raychaudhuri S., and Dasgupta A. (2004) Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* **320**:195– 205.

Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway. 2001. Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.

Siafakas N., Markoulatos P., Stanway G., Tzanakaki G., 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(3): 209-16.

Siafakas N, Markoulatos P, Stanway G. (2002b) Molecular classification of coxsackie A viruses on the basis of the 5'-UTR: structural and evolutionary aspects. *J Mol Evol.* 2002 Dec;55(6):638-52.

Siafakas N., Markoulatos P., Vlachos C., Stanway G., Tzanakaki G., Kourea-Kremastinou J. (2003). Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. *Mol. Cell. Probes.* 17(2-3): 113-23.

Silvestri, L. S., J. M. Parilla, B. J. Morasco, A. O. Sushma, and J. B. Flanagan. 2006. Relationship between poliovirus negative-strand RNA synthesis and the length of the poly(A) tail. *Virology.* **345**:509-519.

Somekh E, Cesar K, Handsheer R, et al. (2003) An outbreak of echovirus 13 meningitis in Central Israel. *Epidemiol Infect.* 2003;130:257-62.

Sommergruber, W., M. Zorn, D. Blaas, F. Fessl, P. Volkmann, I. Maurer-Fogy, P. Pallai, V. Merluzzi, M. Matteo, and T. Skern. 1989. Polypeptide 2A of human rhinovirus type 2: identification as a protease and characterization by mutational analysis. *Virology* **169**: 68– 77.

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**:7859-7875.

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

Strauss, D.M., L.W. Glustrom, and D.S. Wuttke. 2003. Towards an Understanding of the Poliovirus Replication Complex : The Solution Structure of the Soluble Domain of the Poliovirus 3A Protein. *J.Mol.Biol.***330**: 225-234

Todd S., Nguyen J.H., Semler B.L. (1995). RNA-protein interactions directed by the 3' end of human rhinovirus genomic RNA. *J. Virol.* 69(6): 3605-14.

Towner J. S., Brown D. M., Nguyen J. H. C., and Semler B. L. (2003) Functional conservation of the hydrophobic domain of polypeptide 3AB between human rhinovirus and poliovirus. *Virology*. **314**:432-442

Toyoda H., Nicklin M.J., Murray M.G., Anderson C.W., Dunn J.J., Studier F.W. and Wimmer E. (1986). A second virus-encoded proteinase involved in proteolytic processing of poliovirus polyprotein. *Cell*. 45: 761-70.

Thoelen I, Lemey P, Van Der Donck I, Beuselinck K, Lindberg AM, 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*. 2003 Jul;70(3):420-9.

Uhrinova, S., F. Lin, G. Ball, K. Bromek, D. Uhrin, M. E. Medof, and P. N. Barlow. (2003). Solution structure of a functionally active fragment of decayaccelerating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:4718–4723.

Ventoso, I., E. S.MacMillanb, J. W. B. Hersheyb, and L Carrasco. 1998. Poliovirus 2A proteinase cleaves directly the eIF-4G subunit of eIF-4F complex. *FEBS letters*. **435**: 79-83.

Verlinden Y., Cuconati A., Wimmer E., Rombaut B. (2000). Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J. Gen. Virol.* 81(Pt 11): 2751-4.

Ward C.D., Flanagan J.B. (1992). Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66(6): 3784-93.

Ward, T., Pipkin, P. A., Clarkson, N. A., Stone, D. M., Minor, P. D. & Almond, J. W. (1994) *EMBO J.* **13**, 5070–5074.

Weidman M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta. 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Research* 95:75-85.

Williams, P., Y. Chaudhry, I. G. Goodfellow, J. Billington, R. Powell, O. B. Spiller, D. J. Evans, and S. M. Lea (2003). Mapping CD55 function. The structure of two pathogen-binding domains at 1.7 Å. *J. Biol. Chem.* **278**: 10691–10696.

Wimmer E, Hellen CUT, Cao X (1993) Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet* 27:353-436

Witwer C., Rauscher S., Hofacker I.L., and Stadler P. F. (2001) Conserved RNA secondary structures in Picornaviridae genomes. *Nucleic. Acids Res.* **15**:5079-89.

Yin-Murphy M, Almond JW (1996). Baron S *et al.* ed. *Picornavirues*. in: *Baron's Medical Microbiology* (4th ed.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.2862>.

Zoll GJ, Melchers WJ, Kopecka H, Jambroes G, van der Poel HJ, Galama JM. (1992). General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J Clin Microbiol.* 1992 Jan;30(1):160-5.