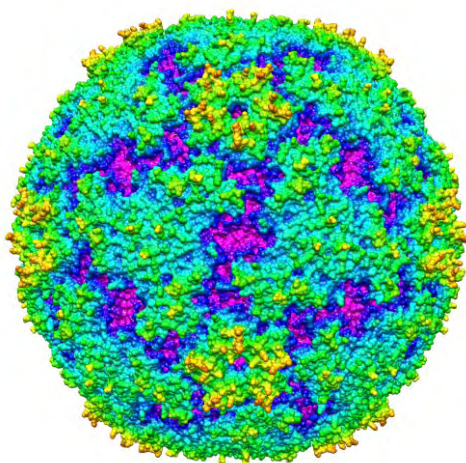




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Κούπανης Παναγιώτης

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΙΑΣ stem-loop reverse transcription PCR
ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΝΤΟΠΙΣΜΟ ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΑ ΕΝΕΡΓΩΝ
ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ**



ΛΑΡΙΣΑ
2016

**Ανάπτυξη μιας stem-loop reverse transcription PCR για τον εντοπισμό
αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών**

**Development of a stem-loop reverse transcription PCR for the detection of active
replicating enteroviruses.**

Στοιχεία Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής : Μαρκουλάτος Παναγιώτης

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

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

Δ. Μόσιαλος: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Γ. Αμούτζιας: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική, του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ημερομηνία κατάθεσης πτυχιακής εργασίας:

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας από το Οκτώβριο του 2015 ως τον Μάρτιο του 2016.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια αυτής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αντώνη Φίκατα για την αμέριστη συμπαράστασή και βοήθεια κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Τηλέμαχο Δημητρίου, όπως και όλους τους συναδέλφους που διεκπεραίωσαν τις εργασίες τους κατά την ίδια χρονική περίοδο, για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι Εντεροϊοί είναι μέλη της οικογένειας των Picorna ιών, αποτελούν ένα γένος ιών που φέρει θετικής πολικότητας μονόκλωνο RNA [(+)ssRNA] και συνδέονται με διάφορες ασθένειες του ανθρώπου και των θηλαστικών, όπως οι ρινοϊοί (HRV) που προκαλούν το κοινό κρυολόγημα, ο ιός της νόσου ποδός-στόματος (FMDV) και ο ιός της ηπατίτιδας Α (HAV) που προκαλεί οξεία φλεγμονή του ήπατος. Ο πιο γνωστός εντεροϊός είναι αυτός της πολιομυελίτιδας (PV) που προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) με χαλαρή παράλυση και είναι υπεύθυνος για την παραλυτική πολιομυελίτιδα, κρούσματα της οποίας συναντώνται ακόμη και σήμερα σε υποβαθμισμένες περιοχές του πλανήτη.

Το RNA γονιδίωμα όλων των Picorna ιών αποτελείται περίπου από 7.500 βάσεις θετικής πολικότητας. Η μόλυνση που προκαλείται από το κύτταρο ξενιστή, οδηγεί σε συνέχεια στη μετάφραση του γονιδιώματος σε μια ενιαία πολυπρωτεΐνη. Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης με τη συμβολή των ιικών πρωτεασών οδηγεί στο σχηματισμό δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου καθώς και τις μη δομικών πρωτεϊνών, οι οποίες εμπλέκονται κυρίως στη αντιγραφή του ιού.

Προκαλούν μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων προσβάλλοντας διάφορα συστήματα του ανθρώπινου οργανισμού. Υπό το πρίσμα αυτό η εφικτή και ταχεία διάγνωση (ανίχνευση) τους από περιβαλλοντικά δείγματα καθώς και τρόφιμα είναι δόκιμο να ερευνηθεί περαιτέρω. Οι μέθοδοι ανίχνευσης και ταυτοποίησής των εντεροϊών περιλαμβάνουν συχνά χρονοβόρα πρωτόκολλα είτε μεθόδους υβριδισμού με αδυναμία στη διάκριση μεταξύ ενεργών και μη – ενεργών ιικών σωματιδίων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να καταρτιστεί η ανάπτυξη ενός μη-χρονοβόρου πρωτοκόλλου strand specific RT-PCR παρέχοντας αυξημένη ευαισθησία και εξειδίκευση, βάσει των χαρακτηριστικών της δομής του εκκινητή (RT-primer) και της θερμοδυναμικής του σταθερότητας, με σκοπό τη δυνατή και γρήγορη ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου των εντεροϊών. Μέσω αυτής της διαδικασίας επιχειρείται μια εφικτή προσέγγιση συνεχούς ανίχνευσης της οικογένειας των εντεροϊών σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα καθώς και σε τρόφιμα.

Abstract

The Enteroviruses are members of the Picorna virus family, they form a genera of viruses with single stranded positive RNA [(+) ssRNA] and are associated with various diseases of mammals, such as rhinoviruses (HRV), which are often responsible for common colds, the foot and mouth disease virus (FMDV) and hepatitis A virus (HAV) which could lead to acute inflammation of the liver. The most famous of the enteroviruses is the poliovirus (PV) that affects the central nervous system (CNS) and is responsible for paralytic poliomyelitis which occurs even today in developing countries.

The RNA genome of all Picorna viruses consists of approximately 7,500 kb ssRNA. The infection caused by the host cell leads to the translation of the virus genome into a single long open reading frame. The processing of polyprotein with the contribution of the viral-coded proteases performs the cleavage to give rise to both structural and non structural proteins, which are involved in the process of viral replication.

They are held responsible for a wide range of severe symptoms that affect several human systems. From this point of view the acquisition of a rapid and effective diagnosis from environmental samples is worthy of further investigation. Usually, detection and identification methods regarding the enteroviruses involve time consuming protocols and hybridization methods that fail to provide with a solid distinction between active and non-active viral particles.

The purpose of this study is to establish the development of a non-time-consuming protocol strand specific RT-PCR providing increased sensitivity and specificity, according to the characteristics of the actuator structure (RT-primer) and his thermodynamic stability, for the rapid detection of replicating strand of enteroviruses. Through this process it is attempted to develop a protocol in order to obtain results for the detection of enteroviruses in clinical and environmental samples as well as food samples.

Περιεχόμενα

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	1
1.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ	3
1.2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ.....	3
1.2.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ.....	6
1.2.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ	9
1.2.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ	11
1.2.5 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΪΚΟΥ RNA	13
1.2.6 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ (ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ & ΤΕΜΑΧΙΣΜΟΣ).....	15
1.2.7 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΙΪΚΟΥ RNA	16
1.2.8 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ, ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ RNA ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΝΕΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ	18
1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ	20
1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ.....	21
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ	23
2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	23
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
3.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ	24
3.2 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Sabin 1.. Error! Bookmark not defined.	
3.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΜΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ Sabin 1	25
3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA	25
3.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)	26
3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR	27
3.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.....	29
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	30
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR	30
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	35
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	37

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εντεροϊοί (EV) είναι μέλη της οικογένειας των Picorna ιών και με βάση τις ασθένειες που προκαλούν στον άνθρωπο είναι το πιο σημαντικό γένος. Σε αυτή συμπεριλαμβάνονται πολλοί άλλοι παθογόνοι ιοί των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως οι ρινοϊοί (HRV) που προκαλούν το κοινό κρυολόγημα, ο ιός της νόσου ποδός-στόματος (FMDV) και ο ιός της ηπατίτιδας A (HAV) που προκαλεί οξεία φλεγμονή του ήπατος.

Ο πιο γνωστός εντεροϊός είναι ο ιός της πολιομυελίτιδας (PV) που προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ) με χαλαρή παράλυση. Το 1908 συνδέθηκε με την πολιομυελίτιδα από τους Landsteiner και Popper που τον ταυτοποίησαν ως κύριο αιτιολογικό παράγοντα της νόσου). Έκτοτε, η ευρύτερη μελέτη του PV στα πλαίσια της θεραπείας της νόσου επέφερε την επακόλουθη μελέτη του γονιδιώματος του, της δομής του και των μηχανισμών πολλαπλασιασμού του ιού. Ο ιός της πολιομυελίτιδας (PV) αποτέλεσε ένα καλό μοντέλο για την κατανόηση των μηχανισμών του κύκλου ζωής και της παθογένειας όχι μόνο των Picorna-ιών αλλά και πολλών RNA ιών όπως οι Coxsackie-ιοί που μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές και θανατηφόρες ασθένειες που προσβάλλουν το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), την καρδιά και το πάγκρεας (Heim A. et al. 2005, Racaniello V. et al. 2006, Tryfonos C. 2012). Η συνέχιση της έρευνας είναι απολύτως αναγκαία για τη μάθηση όσο το δυνατόν περισσότερων δεδομένων για τον κύκλο ζωής αυτής της κατηγορίας ιών που ακόμα και σήμερα ευθύνονται για ένα πλήθος μολύνσεων, ώστε να καταστεί δυνατή η αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση τους.

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι κοινές παθογόνες ιδιότητες που παρουσιάζουν οι εντεροϊοί στον άνθρωπο και τα ζώα όπως και οι βιοφυσικές ιδιότητες τους αποτέλεσαν τα σημεία εκείνα στα οποία βασίστηκαν οι πρώτες προσπάθειες ταξινόμησης. Κοινά χαρακτηριστικά της οικογένειας είναι το πολύ μικρό μέγεθος και το μονόκλωνο RNA γονιδίωμα θετικής πολικότητας, από το οποίο προέρχεται και το όνομα της οικογένειας (pico = μικρό και RNA = ριβονουκλεϊνικό οξύ). Η απουσία λιπιδιακού φακέλου, η σταθερότητά τους σε συγκεκριμένες τιμές pH και η ανθεκτικότητα τους στον αιθέρα αποτελούν επίσης χαρακτηριστικά της οικογένειας των εντεροϊών (Melnick *et al.* 1974). Με την ανάπτυξη της μοριακής βιολογίας και των τεχνικών της, αναλύθηκε η δομή του καψιδίου και αναγνωρίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν οι κυτταρικοί υποδοχείς στους οποίους δεσμεύονται. Τα στοιχεία αυτά οδήγησαν σε ανακατατάξεις στην οικογένεια Picornaviridae (Knowles 2011, Tryfonos C. 2012, Stanway *et al.* 2002).

Η οικογένεια των ιών Picornaviridae ανήκει στην τάξη Picornavirales και σήμερα αποτελείται από 50 είδη που ομαδοποιούνται σε εικοσιεννέα (29) γένη , ως εξής: Aphthovirus, Aquamarivirus, Avihepatovirus, Avisivirus, Cardiovirus, Cosavirus, Dicipivirus, Enterovirus, Erbovirus, Gallivirus, Hepatovirus, Hunnivirus, Kobuvirus, Kunsagivirus, Megrivirus, Mischivirus, Mosavirus, Oscivirus, Parechovirus, Pasivirus, Passerivirus, Rosavirus, Sakobuvirus, Salivirus, Sapelovirus, Senecavirus, Sicinivirus, Teschovirus και Tremovirus. (Adams M.J. et al. 2015).

Σήμερα βάσει της ισχύουσας ταξινόμησης διακρίνονται δώδεκα διακριτά γένη εντεροϊών με διάφορους οροτύπους ο καθένας (πίνακας 1). Ο πολλαπλασιασμός τους γίνεται στον πεπτικό σωλήνα, είναι ανθεκτικοί στο χαμηλό pH και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες με τη μετάδοση του ιού σε άλλα όργανα, ανάλογα με τον τύπο του εντεροϊού . Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί περιλαμβάνουν τους ιούς coxsackie A και B με 23 οροτύπους και 6 ορότυπους αντίστοιχα, τους πολιοϊούς με 3 ορότυπους, οι Echo ιοί με 28 ορότυπους και άλλοι οι οποίοι ταξινομούνται με βάση την σειρά αναγνώρισης τους όπως οι εντεροϊοί (EV) 68-71.

Πίνακας 1: Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους.

Πηγή: [ICTV Feb. 2015]

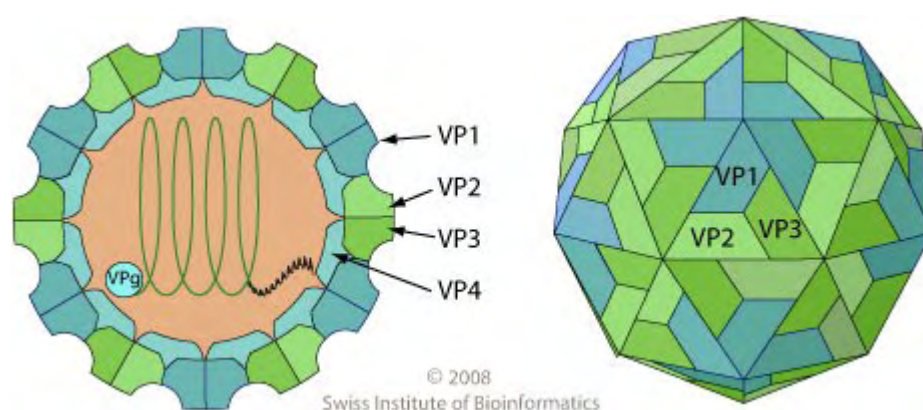
Γένος Εντεροϊών	Αριθμός Οροτύπων
Enterovirus A	25
Enterovirus B	63
Enterovirus C	23
Enterovirus D	5
Enterovirus E	4
Enterovirus F	6
Enterovirus G	16
Enterovirus H	1
Enterovirus J	6
Rhinovirus A	80
Rhinovirus B	32
Rhinovirus C	55

1.2 ΜΟΡΙΑΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

1.2.1 ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

Τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι μικροί RNA ιοί με σχετικά απλή δομή. Το RNA περιβάλλεται από ένα καψίδιο, το οποίο είναι κατά προσέγγιση σφαιρικό και έχει διάμετρο 25-30 nm και χαρακτηριστική εικοσαεδρική συμμετρία. Τα ιοσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητα τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητα τους σε τιμές pH=3 και μικρότερες (Melnick J.L. et al. 1996, Saunders et al. 2007).

Για τη δημιουργία των καψιδίων των εντεροϊών απαιτείται ο σχηματισμός πρωτομερών από τις πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4. Από τον ελάχιστο αριθμό των 60 πρωτομερών που απαιτούνται για κάθε εικοσαεδρικό καψίδιο προκύπτουν 12 πενταμερή που ενώνονται και δίνουν την τελική μορφή του καψιδίου. Αξίζει να σημειωθεί ότι η πρωτεΐνη VP4 η οποία έχει σημαντικά μικρότερο μέγεθος από τις υπόλοιπες, εμφανίζεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου. (Basavarappa et al. 1994, Hellen et al. 1995, Tryfonos C. 2012).



Εικόνα 1: Αντιπροσωπευτική δομή του καψιδίου των εντεροϊών, διακρίνονται οι τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: με μπλε οι VP1 με πράσινο ανοιχτό η VP2, με πράσινο σκούρο η VP3 ενώ η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου με γαλάζιο χρώμα. (Πηγή: Ελβετικό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής)

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας: στο κέντρο των πενταμερών εντοπίζεται ο πενταμερής (5χ) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ αυτών βρίσκονται ο τριμερής (3χ) και ο διμερής (2χ) άξονας συμμετρίας.

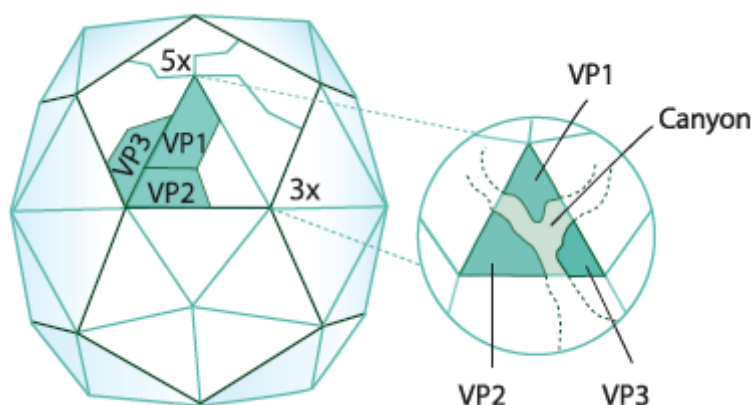
Η δομή και η σύνθεση του καψιδίου ευθύνεται για τη μεγάλη ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν οι εντεροϊοί στα διάφορα χημικά απολυμαντικά καθώς και την

ευαισθησία τους στις ψηλές θερμοκρασίες (Ma, J.F. et al. 1994, Wallis & Melnick 1962). Ρόλος του καψιδίου είναι η προστασία του RNA ταυτόχρονα με τη συμμετοχή του στην αναγνώριση και δέσμευση σε υποδοχείς του κυττάρου-ξενιστή (Birli K. 2009, Tryfonos C. 2012).

Μια ιδιαίτερη διαμόρφωση του καψιδίου που μοιάζει με φαράγγι (canyon) είναι το σημείο όπου δεσμεύονται οι υποδοχείς. Το φαράγγι διατρέχει τον άξονα κάθε πενταμερούς και τα «τοιχώματα» του σχηματίζονται από περιοχές της VP1 από τη μια πλευρά και των VP2 και VP3 από την άλλη (Hendry et al. 1999, Rossmann M. et al. 1994). Επίσης, το καψίδιο καθοδηγεί το πακετάρισμα του γονιδιώματος και την ωρίμανση του ιού (Filman DJ. et al. 1989, Tryfonos C. 2012).

Στη σταθεροποίηση του ιϊκού καψιδίου πιστεύεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η δομική πρωτεΐνη VP4, παρόλο που βρίσκεται εσωτερικά αυτού. Αυτή η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται, είτε αλληλεπιδρώντας με το αμινοτελικό της άκρο με τις άλλες τρεις πρωτεΐνες (VP 1, VP2 και VP3) (Wimmer, 1982). Επίσης συμβάλει στην πρόσδεση του ιού με τον υποδοχέα του κυττάρου-ξενιστή (Ratka M. 1989, Brakoulis C. 2007). Καθώς και στην απελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του ξενιστή.

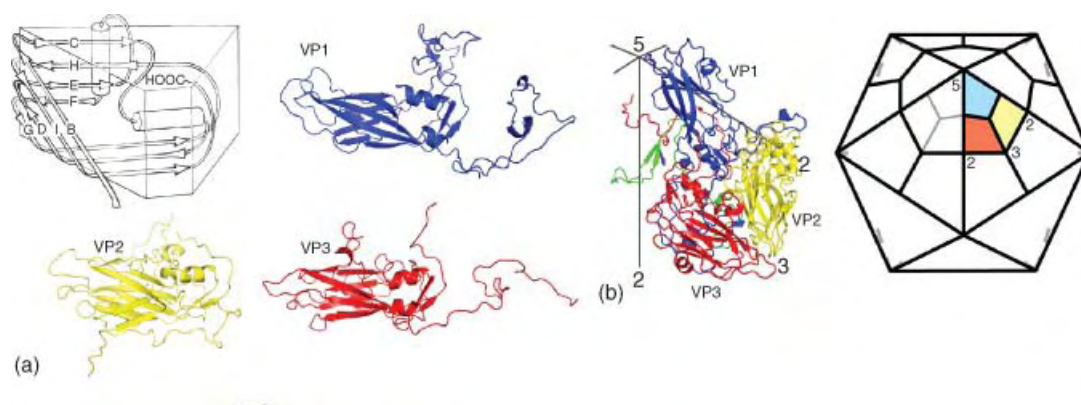
Οι υπόλοιπες 3 δομικές πρωτεΐνες (VP1, VP2 και VP3) που βρίσκονται εξωτερικά του καψιδίου, αν και διαφέρουν στο μέγεθος και στην αμινοξική τους αλληλουχία, έχουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση.



Εικόνα 2: Εικοσαεδρική δομή που χαρακτηρίζεται από την παρουσία των αξόνων συμμετρίας της τάξης 5,3 και 2. Λεπτομέρεια του canyon που σχηματίζεται από την πρωτεΐνη VP1 γύρω από τον άξονα συμμετρίας 5x, στη διασταύρωση με τις πρωτεΐνες VP2, VP3.

(Πηγή: UCLouvain FDP Virologie http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna)

Το πρωτομερές (P1) των εντεροϊών περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Οι δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, εμφανίζουν κοινή τοπολογική κατανομή: δηλαδή τον σχηματισμό ενός αντιπαράλληλου οκταπλού πλέγματος β' - βαρελίου. Η περιοχή αυτή σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β' - φύλλα , διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό ενός άκαμπτου πρωτεϊνικού περιβλήματος γύρω από τον πενταπλό (5x) άξονα συμμετρίας. Το σχηματιζόμενο δίκτυο από τις N -τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4 είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Όσο αφορά τη VP4, η οποία διαφέρει από τις υπόλοιπες δομικές πρωτεΐνες, λειτουργεί περισσότερο ως N -τελική επέκταση της VP2 παρά ως ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου, πράγμα που πιθανολογείται ότι συμβάλει στην προσκόλληση σε κυτταρικούς υποδοχείς, στην αποδιάταξη του καψιδίου και στην διευκόλυνση της απελευθέρωσης του γονιδιώματος του ιού στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή (Filman DJ. et al. 1989, Brakoulis C. 2007) (εικόνα 3).



Εικόνα 3: (α) Διάγραμμα απεικόνισης των οκτώ β' πλεγμάτων κάθε πρωτεΐνης που σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους. Επίσης διακρίνονται τα τρισδιάστατα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και η κοινή δομή β'-βαρελίου.

(b) Προσανατολισμός των πρωτομερών της εικοσαεδρικής δομής του καψιδίου σε σχέση με τους άξονες συμμετρίας 5x, 3x και 2x με την εσωτερική VP4 σε πράσινο χρώμα.

(Πηγή: Picornaviruses, David J Rowlands, University of Leeds, Leeds, UK, <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001080.html>)

1.2.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA, με μήκος περίπου 7,500 νουκλεοτίδια (Pfister T. et al. 1999). Σε αυτό διακρίνονται τρεις διαφορετικές περιοχές. Κεντρικά υπάρχει μια μεγάλη περιοχή που αποτελεί το αναγνωστικό πλαίσιο και κωδικοποιεί τις δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (Kitamura N. et al. 1981, Racaniello V. et al. 1981, Tryfonos C. 2012). Στα δύο άκρα του, οι περιοχές αποτελούνται από νουκλεοτίδια και δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες (UTRs).

Το ιϊκό RNA είναι ικανό να παράγει όλες τις ιϊκές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού κατά την είσοδο του στο κύτταρο.

Πιο συγκεκριμένα, το RNA των εντεροϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με φωσφοδιεστερικό δεσμό στο 5' άκρο (πλούσιο σε G+C) με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genomelinked). Η VPg ποικίλει στο μέγεθος από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιϊκό γονίδιο. Η VPg πιστεύεται ότι συμβάλλει στον πολλαπλασιασμό και εγκλεισμό του γενώματος στο καψίδιο, ενώ δεν είναι απαραίτητη για την μόλυνση κυττάρων από τους εντεροϊούς. Το mRNA των εντεροϊών διαφέρει από το ιϊκό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Όταν το ιϊκό RNA χρησιμοποιείται ως mRNA, η VPg αποκόπτεται ενζυματικά από το 5'-άκρο από μια πρωτεΐνη του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο διαχωρισμού πριν ενωθεί το ριβόσωμα για να αρχίσει η μετάφραση (Ambros V. et al. 1978, Nomoto A. et al. 1977, Pettersson RF. et al. 1977, Tryfonos C. 2012).

Η 5'-μη κωδική περιοχή των εντεροϊών περιέχει σημαντικά στοιχεία τα οποία συμμετέχουν στην αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα των ιών αυτών. Σε αυτή, είναι ευδιάκριτες δύο υποπεριοχές: στην αρχή μια διαμόρφωση cloverleaf και στη συνέχεια μια σειρά από φουρκέτες (stem-loops) που αποτελούν το εσωτερικό σημείο δέσμευσης του ριβοσώματος (Internal Ribosome Entry Site - IRES) (Andino R. et al. 1990, Kitamura N. et al. 1981, Tryfonos C. 2012).

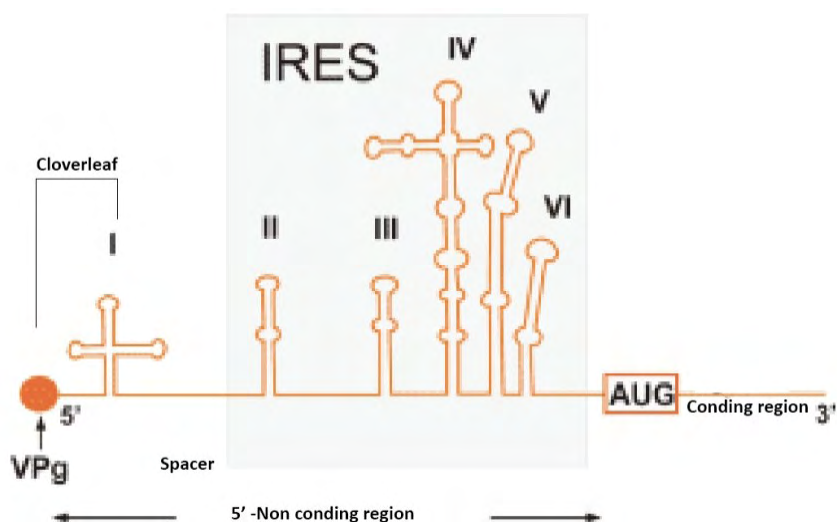
Επίσης η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES- Internal Ribosome Entry Site) που ευθύνεται για τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα (Racaniello V. et al. 2007).

Τα IRES στοιχεία των Picorna-ιών, χωρίζονται σε τρεις ομάδες βάσει των δομικών και αλληλουχικών διαφοροποιήσεων τους. Με βάση αυτή την κατηγοριοποίηση συναντώνται:

- τα IRES τύπου I των εντεροϊών και ρινοϊών (Rhinovirus - HRV),
- τα τύπου II των καρδιοϊών (Cardiovirus) και αφθοϊών (Aphthovirus)
- τα τύπου III του ιού της ηπατίτιδας A (Hepatitis A virus - HAV).

Το IRES τύπου I έχει πέντε φουρκέτες που αριθμούνται με τους λατινικούς αριθμούς II-VI. Η δομή τριφυλλιού της περιοχής I είναι σημαντική για τη σταθερότητα του RNA και την έναρξη της αντιγραφής του θετικής πολικότητας κλώνου (Melchers W.J. et al. 2006). Οι δομικές περιοχές II έως VI, αποτελούν το στοιχείο IRES των εντεροϊών, ενώ οι ελάχιστες απαιτήσεις για την λειτουργία του στοιχείου αυτού είναι οι δομικές περιοχές II, IV και V (Haller A.A. et al. 1993, Tryfonos C. 2012) (εικόνα 4).

Η διατήρηση της πρωτοταγούς και της δευτεροταγούς δομής του IRES συντελεί σημαντικά στην προαγωγή της μετάφρασης, βοηθώντας στη σύνδεση RNA-ριβωσώματος, καθώς και στον πολλαπλασιασμό του ιϊκού RNA.

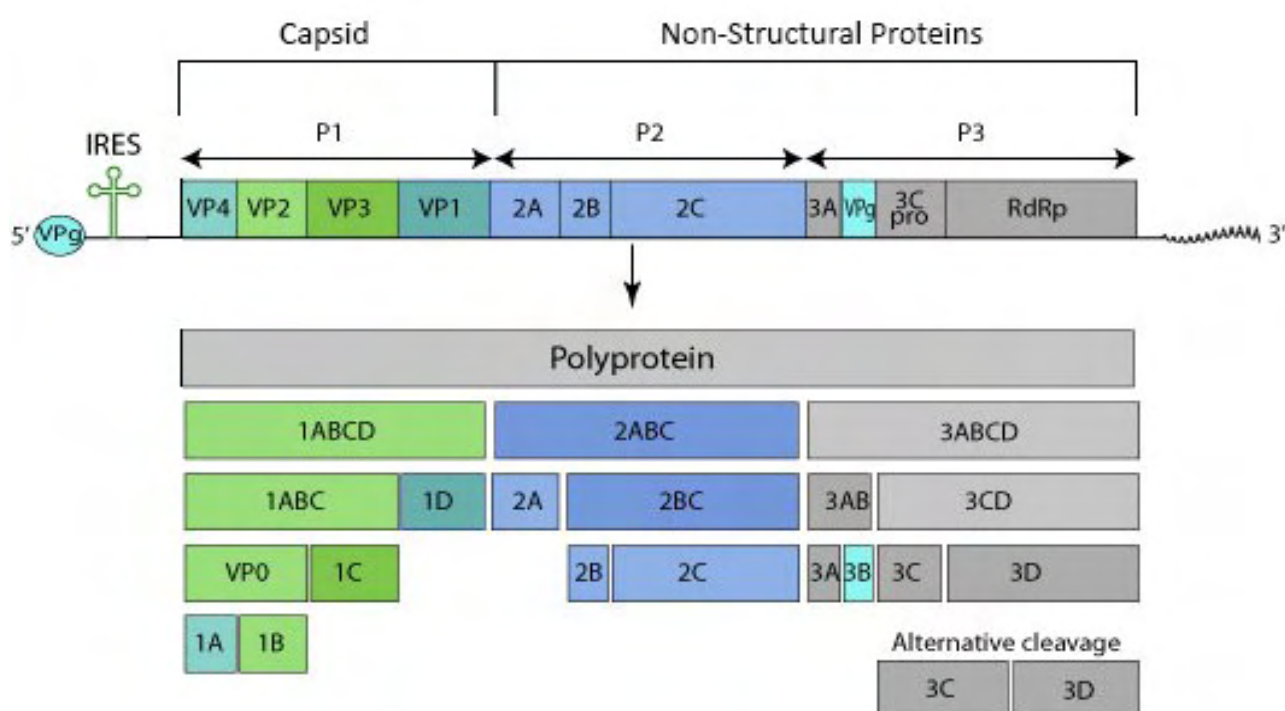


Εικόνα 4: Η 5' αμετάφραστη περιοχή των εντεροϊών μαζί με το IRES.
(Πηγή: <http://www.microbes-edu.org/etudiant/picornaviridae2.html>)

Η 3'-μη κωδική περιοχή των εντεροϊών, αποτελεί το σημείο της έναρξης για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου, είναι απαραίτητη για την αντιγραφή του ιϊκού RNA (Oberste M. Steven et al 2006). Η 3'-μη κωδικοποιούσα (3'-NC) περιοχή έχει μέγεθος περίπου 70-100 νουκλεοτίδια. Η δευτεροταγής δομή της που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιϊκού RNA, παρουσιάζει ενδιαφέρουσα διαμόρφωση. Η ιδιαιτερότητα της έγκειται στο γεγονός ότι περιέχει 2 ή 3 φουρκέτες, ανάλογα με τον ορότυπο. Στο άκρο της

υπάρχει μια σειρά από αδενίνες που ονομάζεται πολύ(Α)ουρά. Το μήκος της εξαρτάται από τον ορότυπο και κυμαίνεται από 60 μέχρι 80 νουκλεοτίδια (Pilipenko E.V et al. 1992),(Yogo Y W.E. et al. 1972). Αξίζει ωστόσο να αναφερθεί ότι δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων (Brown DM et al. 2005). Τόσο το ιϊκό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρει μια πολύ(Α) ουρά (Yogo Y W.E. et al. 1972). Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ (U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(Α) του θετικού κλώνου (Yogo Y T.M. 1974).

Η μεγαλύτερη περιοχή του ιϊκού RNA αποτελείται από την παρουσία ενός μοναδικού αναγνωστικού πλαισίου (Open Reading Frame - ORF) ή κωδική περιοχή και μεταφράζεται σε μία πολυπρωτεΐνη (περίπου 2500 αμινοξέων) που με τη δράση των ιικών πρωτεασών διασπάται στις διάφορες ικές πρωτεΐνες (Rueckert R.R. & Wimmer E. 1984). Η πολυπρωτεΐνη με τη σειρά της χωρίζεται σε τρεις περιοχές : P1, P2 και P3 (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Επάνω: Διάγραμμα του ιϊκού γενώματος με την VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, τα γονίδια των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(Α)ουρά. Κάτω: ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης από τις 3 περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ιικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού. (Πηγή: Ελβετικό Ινστιτούτο Βιοπληροφορικής, http://viralzone.expasy.org/all_by_species/33.html)

Η P1 περιοχή της πολυπρωτεΐνης διασπάται στις δομικές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1 που ευθύνονται για τη συγκρότηση του ιϊκού καψιδίου. Οι δομικές πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην αναγνώριση και δέσμευση κυτταρικών υποδοχέων, στην αντιγονικότητα, στο πακετάρισμα και στην απελευθέρωση του ιϊκού RNA είναι ανάμεσα στις κύριες λειτουργίες του ιϊκού καψιδίου.

Οι δράσεις των πρωτεϊνών της P2 περιοχής στοχεύουν στη μετατροπή του κυτταροπλάσματος του κύτταρου σε ένα περιβάλλον που να συντελεί στην αποτελεσματική παραγωγή των νέων ιικών γονιδιωμάτων (2^{Apro} , $3C^{pro}$, $3CD^{pro}$) (Hellen, 1995, Tryfonos C. 2012). Η 2A πρωτεΐνη διασπά την πολυπρωτεΐνη ελευθερώνοντας με αυτό τον τρόπο την P1 περιοχή της πολυπρωτεΐνης. Επίσης, η δράση της 2A σε κυτταρικές πρωτεΐνες συντελεί στη δημιουργία του κυτταροπαθητικού φαινομένου και στην απόπτωση του κυττάρου.

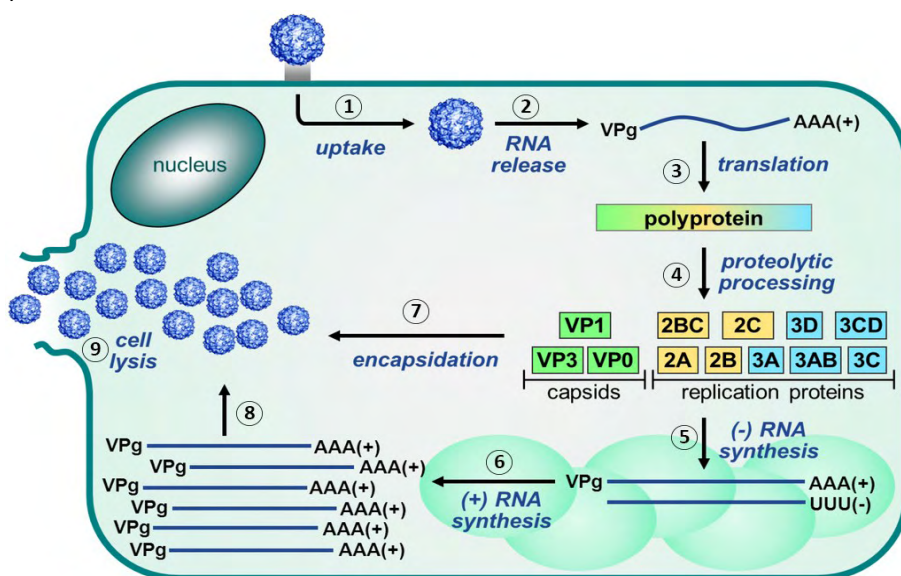
Τέλος, σχετικά με τις πρωτεΐνες της περιοχής P3, αυτές συμμετέχουν πιο άμεσα στον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γονιδιώματος ($2B$, $2C$, $3AB$, $3B^{VPg}$, $3CD^{pro}$, $3D^{pol}$). Παράγονται από δύο μονοπάτια πρωτεολυτικής διάσπασης της P3. Το κυρίως μονοπάτι χωρίζει την P3 στις ενδιάμεσες πρωτεΐνες $3AB$ και $3CD$ που είναι σταθερές και συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του ιού πριν δώσουν τις $3A$, $3B$ και $3C$, $3D$ αντίστοιχα. Το δεύτερο μονοπάτι έχει μικρότερη παραγωγή και δημιουργεί την $3A$ και την πρόδρομη $3BCD$ που διασπάται στις $3B$, $3C$ και $3D$ (Lawson et al. 1992, Pathak et al. 2008, Tryfonos C. 2012).

Από τη στιγμή που η αντιγραφή του RNA είναι σε εξέλιξη, ποσότητες θετικού κλώνου (+) RNA παράγονται, μέρος αυτού του RNA λειτουργεί ως mRNA και μεγάλες ποσότητες των πρωτεϊνών του ιού στη συνέχεια συντίθεται.

1.2.3 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων αποτελεί το σημείο όπου γίνεται η αντιγραφή των εντεροϊών. Το πρώτο βήμα της διαδικασίας αυτής είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Το RNA τότε απεκδύεται, προκαλώντας δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Μόλις, το θετικής πολικότητας ιϊκό RNA, εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν ιικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ιικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί γίνονται κυρίως από δύο ιικές πρωτεϊνάσες: την $2A^{pro}$ και την $3C^{pro}$ ή $3CD^{pro}$. Μια εκ των πρωτεϊνών που

συντίθενται ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι και η ιική RNA-εξαρτώμενη πολυμεράση. Παράγωγα αυτής της διαδικασίας είναι και οι βοηθητικές πρωτεΐνες οι οποίες απαιτούνται για την αντιγραφή του γενώματος και τη σύνθεση του mRNA. Το πρώτο βήμα της αντιγραφής του γενώματος είναι η αντιγραφή του θετικού RNA κλώνου. Κατά την αντιγραφή η ιική πολυμεράση συνθέτει αρχικά ένα συμπληρωματικό αρνητικής πολικότητας RNAκλώνο. Η παραγωγή επιπρόσθετων θετικών κλώνων ακολουθεί, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το RNA αρνητικής πολικότητας που μόλις συντέθηκε. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ιικές πρωτεΐνες. Η καψιδίωση ξεκινά όταν οι πρωτεΐνες του καψιδίου είναι επαρκείς. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή, σχηματίζοντας τελικά το εικοσαεδρικό καψίδιο (εικόνα 6). Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια με τα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό. Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες, κάτι που εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης (Racaniello V. 2007).



Εικόνα 6 : Σύνοψη του κύκλου ζωής του εντεροϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1) και απέκδυση του ιϊκού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιϊκό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνθεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. Ο ιϊκός (+) RNA κλώνος αντιγράφεται από τις ιικές RNA πολυμεράσες για να σχηματιστούν πλήρους μήκους (-) RNA κλώνοι (5), οι οποίοι αντιγράφονται στη συνέχεια για να παραχθεί επιπρόσθετο (+) RNA (6). Στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, ο νέο-συντεθειμένος (+) RNA κλώνος μεταφράζεται για να παράγει επιπρόσθετες ιικές πρωτεΐνες (7). Στα τελευταία στάδια της μόλυνσης, οι (+) κλώνοι εισέρχονται στο μορφογενετικό μονοπάτι (8). Τα νέο-συντεθειμένα ιικά σωματίδια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση (9).

(Πηγή: Zoll J, Heus HA, van Kuppeveld FJ, Melchers WJ: The structure–function relationship of the enterovirus 3′-UTR. *Virus Res* 2009;139:209–216. Copyright Elsevier)

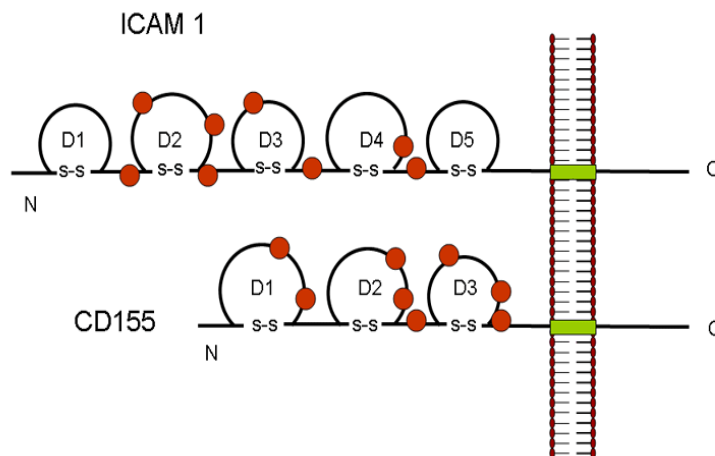
1.2.4 ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΙ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών γίνεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή. Επομένως το πρωταρχικό στάδιο της διαδικασίας είναι η είσοδος του ιού ή του ιϊκού γονιδιώματος στο κύτταρο-ξενιστή. Η διαδικασία ξεκινά με τη σύνδεση του ιού στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου. Υπεύθυνοι για την σύνδεση είναι κυτταρικοί υποδοχείς που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της πλασματικής μεμβράνης και αναγνωρίζουν συγκεκριμένες περιοχές στα καψίδια των εντεροϊών. Ο ρόλος των υποδοχέων είναι διπλός. Ο πρώτος είναι ο σωστός προσανατολισμός και τοποθέτηση του καψιδίου στο χώρο σε σχέση με την πλασματική μεμβράνη και τους υποδοχείς. Ο δεύτερος είναι οι αλλαγές που επέρχονται στο καψίδιο ως αποτέλεσμα της σύνδεσης του με τους υποδοχείς (Hogle, 2002, Zhang P. et al. 2008, Tryfonos C. 2012).

Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) (Mendelsohn CL. et al. 1989). Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους picorna ιούς, όπου και μερικοί μοιράζονται μεταξύ μελών άλλων οικογενειών.

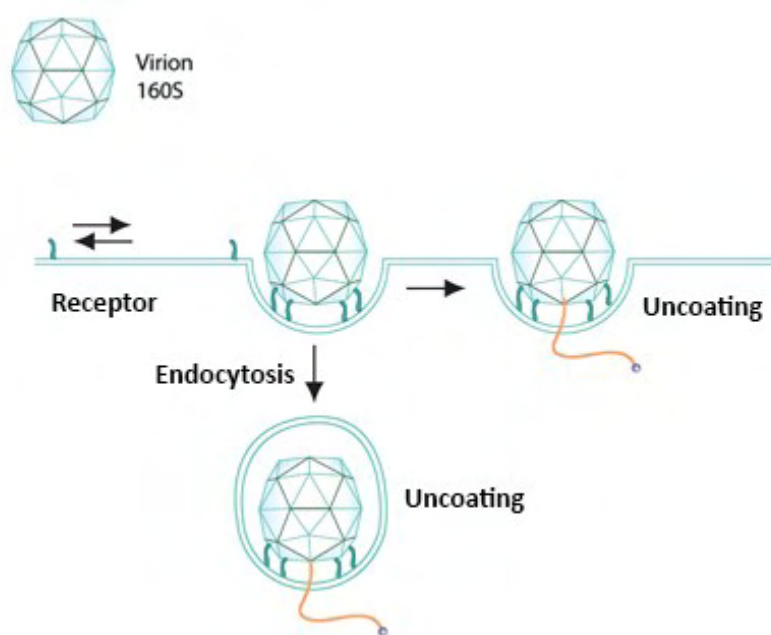
Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες έχουν ταυτοποιηθεί ως υποδοχείς των Picorna-ιών. Η πλειοψηφία των κυτταρικών υποδοχέων ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Ig) και στην οικογένεια των υποδοχέων ιντεγκρίνης. Οι διάφοροι ορότυποι μπορεί να χρησιμοποιούν διάφορους υποδοχείς για την είσοδο τους στα κύτταρα. Μερικοί ορότυποι μπορεί να αλληλεπιδρούν και με δεύτερο κυτταρικό υποδοχέα ενώ και άλλες μεμβρανικές κυτταρικές πρωτεΐνες πιθανό να εμπλέκονται στην είσοδο του ιού (Orthopoulos G. et al. 2004, Rossmann M.H. et al. 2002, Selinka H.C. et al. 2002, Tryfonos C. 2012).. Χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των Picorna ιών αποτελούν ο CD155 και ο ICAM-1 (εικόνα 7). Ο κυτταρικός υποδοχέας CD155 μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη, που ανήκει στην υπερ-οικογένεια των ανοσοσφαιρινών και αποτελείται από τρία τμήματα: i) την εξωκυττάρια, όπου βρίσκεται το αμινοτελικό του άκρο, ii) την διαμεμβρανική, και iii) την ενδομεμβρανική, όπου έχουμε το καρβοξυτελικό του άκρο.

Για τους υπόλοιπους εντεροϊούς που μολύνουν τον άνθρωπο βρέθηκε ότι χρησιμοποιούν κυρίως τους CAR (Coxsackievirus Adenovirus Receptor) , DAF και ICAM-1 κυτταρικούς υποδοχείς. Ο DAF (decay-accelerating factor) ή CD55 χρησιμοποιείται από διάφορους ορότυπους των εντεροϊών.



Εικόνα 7: Χαρακτηριστικές διαμεμβρανικές πρωτεΐνες των *Picornaviridae*. Ο CD155 και ο ICAM 1 είναι γλυκοπρωτεΐνες που αγκιστρώνουν στην κυτταρική μεμβράνη. Διακρίνονται οι εξωκυτταρικές περιοχές τους εμφανίζοντας πτυχώσεις όμοιες των ανοσοσφαιρινών και κάθε περιοχή σταθεροποιείται με S-S δεσμούς. Ο ICAM 1 είναι μακρύτερος και προεξέχει βαθιά μέσα στο *canyon* ενώ ο CD 155 είναι κοντύτερος κατά μήκος του *canyon*. (Πηγή: <http://www.microbiologybook.org/virol/polio.htm>)

Οι υποδοχείς αναγνωρίζουν περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP3 και VP2. Η VP1 συμμετέχει περισσότερο στις αλληλεπιδράσεις με τους κυτταρικούς υποδοχείς αφού κατέχει το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας του ιϊκού καψιδίου. Οι υποδοχείς αλληλεπιδρούν με τις δομικές πρωτεΐνες εισερχόμενοι στο φαράγγι. Με την είσοδο του υποδοχέα προκαλούνται ανακατατάξεις στις δομικές πρωτεΐνες που οδηγούν στη δημιουργία των Α σωματιδίων. Μετά τη σύνδεση με τον υποδοχέα, το επόμενο βήμα είναι η απελευθέρωση και η είσοδος του ιϊκού RNA στο κυτταρόπλασμα διαμέσου της πλασματικής μεμβράνης (εικόνα 8). Αυτό επιτυγχάνεται πιθανότατα μέσω κάποιου πόρου που δημιουργείται από τις αλληλεπιδράσεις των ιϊκών δομικών πρωτεϊνών με την πλασματική μεμβράνη. Για το λόγο ότι οι εντεροϊοί βρέθηκαν και στα ενδοσώματα, υπάρχει επίσης η άποψη ότι εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα με ενδοκύτωση με τη μεσολάβηση των υποδοχέων (DeTulleo L. & Kirchhausen T. 1998, Ohka S. et al. 2004, Perez L. & Carrasco L. 1993, Tryfonos C. 2012).



Εικόνα 8: Μοντέλο εισόδου των εντεροϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο προσδένεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στη διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωμάτων A. (Πηγή: UCL, http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna)

1.2.5 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΪΚΟΥ RNA

Με την είσοδο του ιού στο κύτταρο το επόμενο στάδιο αποτελεί η μετάφραση του ιϊκού RNA προκειμένου να παραχθούν οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για τον πολλαπλασιασμό του ιού. Η μετάφραση γίνεται αποκλειστικά στο κυτταρόπλασμα.

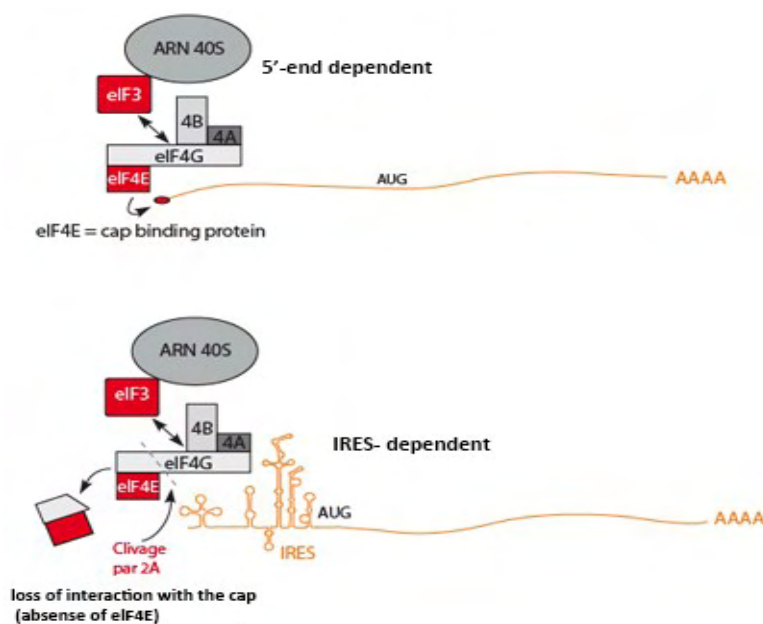
Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο (Ambros, 1980). Η μετάφραση του ιϊκού RNA ξεκινά με την αποκοπή της VPg από τα ριβοσώματα του κυττάρου ξενιστή (Ambros V.A. 1980, Wimmer, 1982, Tryfonos C. 2012). Η 40S υπομονάδα του κυτταρικού ριβοσώματος δεσμεύεται στο ιϊκό RNA στην εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES (Internal Ribosome Entry Site)* και ακολούθως ολισθαίνει κατά μήκος του RNA ή μετατοπίζεται (looping) στην περιοχή έναρξης της πρωτεϊνοσύνθεσης, με κατεύθυνση 5'→3' (Lopez et al. 2001, Pestova et al. 1996, Tryfonos C. 2012).

Η έναρξη της μετάφρασης στα ιικά RNA γίνεται με ένα διαφορετικό μηχανισμό από το μοντέλο σάρωσης που είχε προταθεί για τη μετάφραση των ευκαρυωτικών mRNA. Έτσι, οι εντεροϊοί μπορούν να μεταφράζονται κάτω από συνθήκες που καταστέλλουν τη

μετάφραση των κυτταρικών mRNA. Το IRES μέσα από τη δομή του βοηθάει στη στρατολόγηση όλων των απαιτούμενων ιικών και κυτταρικών πρωτεϊνών που θα βοηθήσουν τη δέσμευση της 40S υπομονάδας του κυτταρικού ριβοσώματος στο ιϊκό RNA (Jang, 1989, Kitamura N, 1981, Pelletier and Sonenberg 1988, Tryfonos C. 2012). Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με την eIF3 συνδεδεμένη στην C- τελική περιοχή της eIF4G, Ο eIF4G είναι ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο που έχει δράση πρωτεΐνης «σκαλωσιάς» (scaffold protein) και συντονίζει τη λειτουργία των πρωτεϊνών που δεσμεύονται μαζί του.

Σ' αυτόν δεσμεύονται άλλοι κυτταρικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIF3, eIF4A, eIF4E) καθώς και η κυτταρική πρωτεΐνη PABP (poly(A)-binding protein) που συνδέεται απευθείας στο IRES (εικόνα 9).

Οι θέσεις IRES των picorna ιών, δεν είναι αυστηρά συντηρημένες μεταξύ των εντεροϊών αλλά είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση του ριβοσώματος. Υπάρχουν όμως μερικές περιοχές που είναι κοινές για όλους τους τύπους των IRES: το μοτίβο Yn-Xm-AUG, το GNRA και οι πλούσιες σε αδενίνες (A) και κυτοσίνες (C) περιοχές. Το Yn-Xm-AUG βρίσκεται στο 3'- άκρο του IRES. Όπου Yn είναι μια περιοχή 5-7 νουκλεοτιδίων, πλούσια σε πυριμιδίνες. Ως Xm χαρακτηρίζεται μια περιοχή που αποτελείται από 15-25 νουκλεοτίδια και βρίσκεται μεταξύ της πλούσιας σε πυριμιδίνες περιοχής και ενός AUG κωδικονίου. Το τελευταίο αποτελεί και το σύνορο του IRES στο 3'-άκρο. Η μετάφραση ξεκινάει από το αμέσως επόμενο AUG. Το GNRA μοτίβο δημιουργεί μια θηλιά που αποτελείται από G: γουανίνη, N: οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο, R: πουρίνη και A: αδενίνη. Γενικά τα GNRA μοτίβα απαντώνται πολύ συχνά σε μεγάλα RNA μόρια με έντονη τριτοταγή διαμόρφωση και πιστεύεται ότι βοηθούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων που τα περιέχουν και άλλων μορίων RNA ή/και πρωτεϊνών. Εμπλέκονται επίσης στη διαμόρφωση της τριτοταγούς δομής φέρνοντας κοντά απομακρυσμένες περιοχές του RNA. Παρόμοιο ρόλο είναι πιθανό να έχουν και στα IRES, παρόλο που η δράση τους δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί (Fernandez-Miragall 2006, Iizuka N. et al. 1991, Jackson R.J. et al. 1994, Le S.Y. et al. 1992, Tryfonos C. 2012).



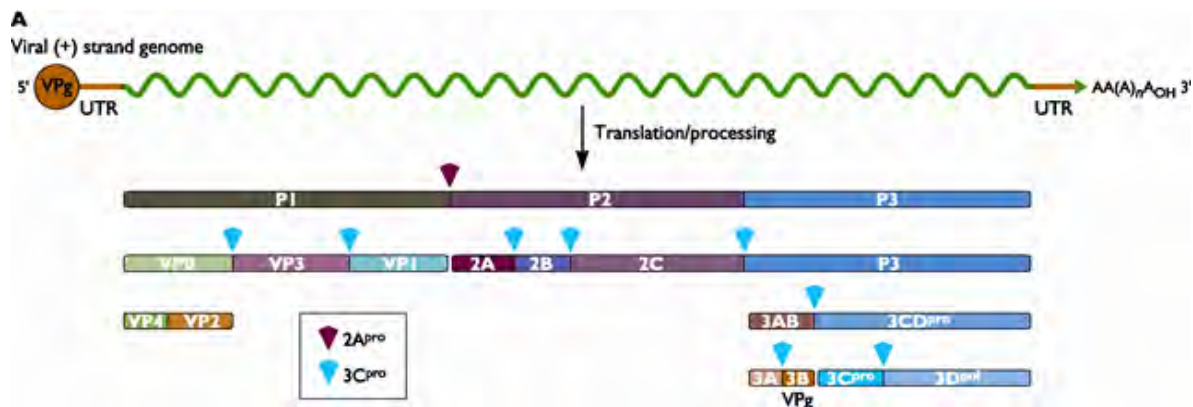
Εικόνα 9: Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Επάνω διακρίνεται η 5'- καλύπτρα-εξαρτώμενη έναρξη, ενώ κάτω απεικονίζεται η IRES- εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο προσαρτάται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES.

Πηγή: UCL, http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna

1.2.6 ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ (ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ & ΤΕΜΑΧΙΣΜΟΣ)

Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιϊκό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA.

Από τη μετάφραση του γενετικού υλικού του ιού δημιουργείται η ιική πολυπρωτεΐνη, η οποία στην πορεία θα πρωτεολυθεί από τις ιικές πρωτεάσες. Η πρωτεολυτική διεργασία διακρίνεται σε τρία στάδια. Αρχικά η διάσπαση της πολυπρωτεΐνης στην περιοχή της P1 και P2 γίνεται με τη δράση της ιικής πρωτεάσης 2A^{pro}. Στο δεύτερο στάδιο έχουμε την πρωτεόλυση όλων των περιοχών από τις ιικές πρωτεάσες 3C^{pro} και 3CD^{pro}, παίρνοντας ως προϊόντα, τις δομικές πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3 καθώς και όλες τις λειτουργικές πρωτεΐνες και τις ενδιάμεσες μορφές αυτών. Το τρίτο στάδιο αφορά τη διάσπαση της VP0 στις δομικές πρωτεΐνες VP4 και VP2 (Wimmer et al. 1999, Brakoulias C. 2007) (Εικόνα 10).



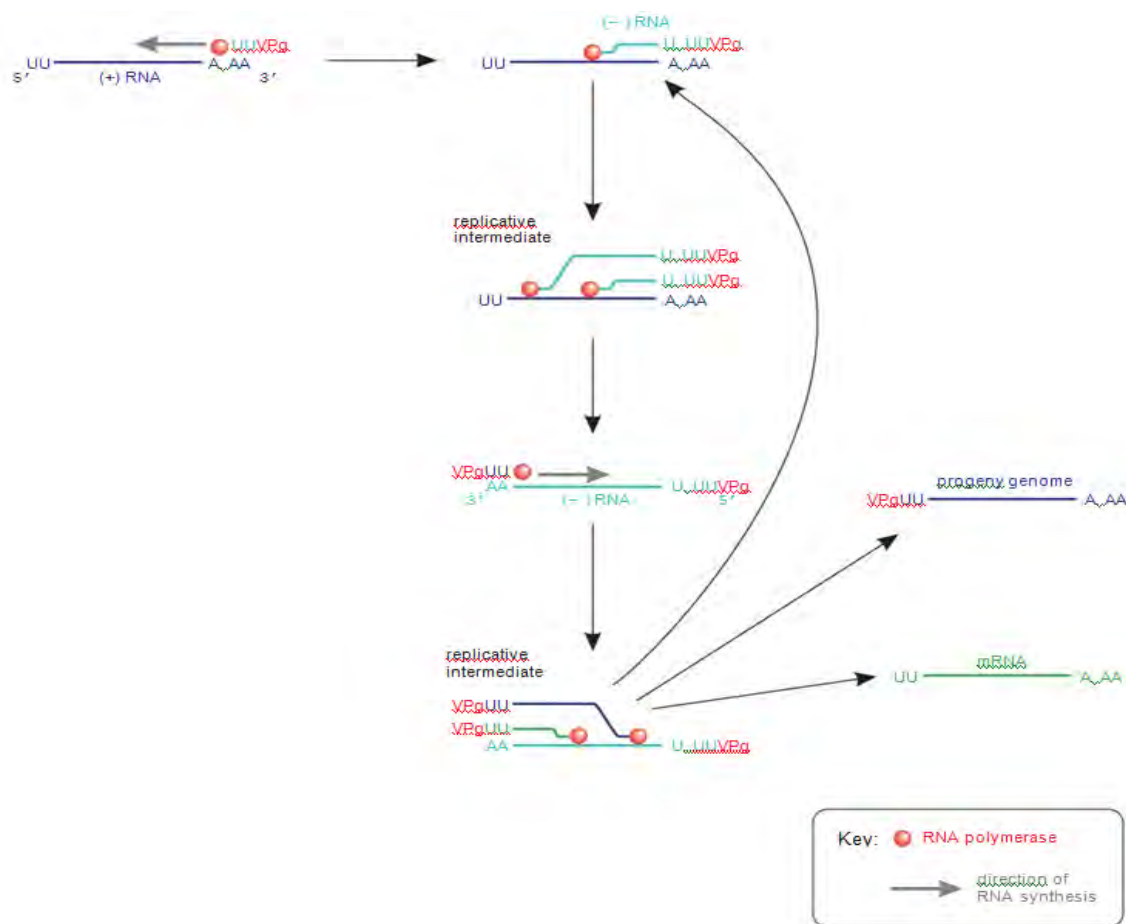
Εικόνα 10: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης. Οι δείκτες αντιστοιχούν στα σημεία πρωτεόλυσης από τις 3C^{pro}, 3CD^{pro} και από την 2A^{pro}.

(Πηγή: <http://epidemiologiamolecular.com/picornavirus/>)

1.2.7 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΙΪΚΟΥ RNA

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή. Με τη δημιουργία των ιικών πρωτεϊνών, υπάρχουν πλέον όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA. Το επόμενο βήμα είναι η δημιουργία των νέων θετικής πολικότητας ιικών RNA (Εικόνα 11).

Το ενδιάμεσο διπλασιασμού RI RNA (replicative intermediate), παρουσιάζει ιδιότητες μονόκλωνου αλλά και δίκλωνου RNA γιατί αποτελείται από ένα πλήρες μόριο RNA (αρνητικής ή θετικής πολικότητας) και ένα αριθμό προσαρτημένων νεοσυντιθέμενων RNA μορίων αντίθετης πολικότητας και ποικίλων μεγεθών. Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Έχει εκτιμηθεί ότι ο ιός ελέγχει τη σύνθεση του RNA κατά τέτοιον τρόπο ώστε η σύνθεση των θετικών κλώνων να είναι περίπου 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών. Μερικά από τα θετικά (+) RNA μορία χρησιμοποιούνται ως πρότυπα για περαιτέρω σύνθεση αρνητικών κλώνων, κάποια λειτουργούν ως mRNA και κάποια προορίζονται ώστε να αποτελέσουν το γονιδίωμα των απόγονων ιοσωματίων (Carter J.B. and Saunders V.A, 2007).



Εικόνα 11: Ο μηχανισμός αντιγραφής του ιϊκού RNA.

(Πηγή: *VIROLOGY, Principles and Applications*, John P. Carter and Venetia A. Saunders, 2007)

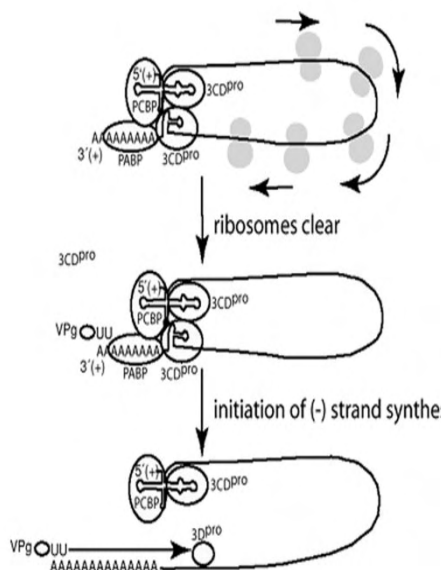
Πριν συντεθούν τα συμπληρωματικά αρνητικής-πολικότητας αντίγραφα του γονιδιώματος, το γενωμικό RNA ενεργεί ως πρότυπο για την πρωτεϊνική σύνθεση. Το ίδιο μόριο RNA που έχει χρησιμοποιηθεί στη μετάφραση, χρησιμοποιείται έπειτα ως πρότυπο για τη σύνθεση των αρνητικών κλώνων RNA από την ιική πολυμεράση 3D. Αυτή η διαδικασία απαιτεί ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών τόσο του κυττάρου όσο και του ιού καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία επάνω στο RNA τα οποία δρουν *in cis* ρυθμίζοντας την αντιγραφή (Εικόνα 12).

Cis-δραστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την αντιγραφή αποτελούν:

- Η 3'-UTR και η πολυαδενυλιωμένη ουρά, είναι γνωστό ότι το μέγεθος της πολυαδενυλιωμένης ουράς αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την αντιγραφή του ιού (Barton DJ et al. 2001).
- Το cloverleaf που βρίσκεται στο 5' άκρο της 5'-UTR επηρεάζει την σταθερότητα την μεταγραφή και την αντιγραφή των εντεροϊών. Θεωρείται ότι αυτή η δομή αλληλεπιδρά με την 3'-UTR μέσω πρωτεϊνών σχηματίζοντας ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (RNP)

σύμπλοκο, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Gamarnik AV, 1998).

- Μια δομή φουρκέτας που βρίσκεται στην περιοχή 2C του γενώματος είναι απαραίτητη για την σύνθεση της VPg-pUpU η οποία χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται διαφορετικός μηχανισμός ουριδιλίωσης της πρωτεΐνης VPg, για την έναρξη της αντιγραφής των κλώνων θετικής και αρνητικής πολικότητας, (Goodfellow I. et al. 2000, Morasco B.J. 2003, Tsolis K. 2008). Ένα από τα πρώτα βήματα κατά την έναρξη της αντιγραφής, είναι ο σχηματισμός της ουριδιλιωμένης VPg, η οποία στη συνέχεια χρησιμοποιείται σαν εκκινητής από την ιική πολυμεράση. Υπάρχουν δύο μοντέλα που περιγράφουν τον σχηματισμό της ουριδιλιωμένης VPg. Σύμφωνα με το πρώτο, η VPg ουριδιλιώνεται στην πολυαδενυλιωμένη ουρά όπου και δρα σαν εκκινητής για την έναρξη της αντιγραφής του αρνητικού κλώνου. Σύμφωνα με το δεύτερο μοντέλο, η VPg ουριδιλιώνεται στην φουρκέτα cre(2C), με αποτέλεσμα να παράγονται αρκετά μόρια VPg-pUpU τα οποία και χρησιμοποιούνται σαν εκκινητικά μόρια για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας, αναγνωρίζοντας τις δύο αδενίνες που βρίσκονται στο 3' άκρο του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Sharma, 2004). Κατά την αντιγραφή του ιικού γενώματος, υπάρχει μια ασυμμετρία όσον αφορά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας σε σχέση με τον κλώνο αρνητικής πολικότητας. Η ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την δημιουργία των εκκινητικών μορίων (ουριδιλίωση της VPg στην 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά και στην φουρκέτα cre(2C), μπορεί να εξηγήσει τον λόγο για τον οποίο παρατηρείται απότομη αύξηση των κλώνων θετικής πολικότητας (Morasco BJ, 2003).



Εικόνα 12: Μετάβαση από την μετάφραση του ιικού γενώματος στην σύνθεση του αρνητικού κλώνου πολικότητας RNA. Οι ικές πρωτεΐνες 3CD, VPg PABP, PCBP-βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στα άκρα του ιικού RNA για να σχηματίσουν ένα κυκλικό RNP σύμπλοκο. Στη συνέχεια, η VPg-pUpU αλληλεπιδρά με το 3' άκρο του ιικού RNA και σχηματίζει το κυκλικό πρωταρχικό RNA σύμπλοκο αντιγραφής. Η σύνθεση του (-)RNA κλώνου ξεκινάει με την επιμήκυνση του VPg-pUpU από την 3D^{pol}. (Πηγή: *Fields of Virology*, 5th Edition, 2007.)

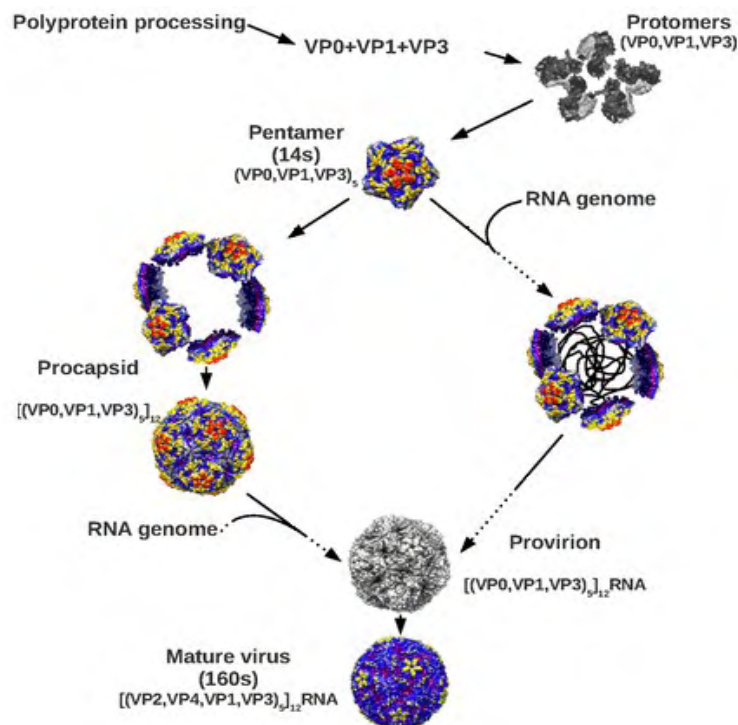
1.2.8 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ, ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ RNA ΚΑΙ ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ ΝΕΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Μετά τον πολλαπλασιασμό του ιϊκού γενώματος στο κύτταρο, δημιουργούνται τα ιϊκά 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 D., 1996).

Κάτω από πειραματικές συνθήκες *in vitro*, το στάδιο αυτό διαρκεί 7 έως 8 ώρες.

Αρχικά, η P1 πολυπρωτεΐνη, που αποτελεί τον πρόδρομο των καψιδικών πρωτεϊνών, τέμνεται από την 3CDPro και σχηματίζει τις VP0, VP1 και VP3, οι οποίες συσσωματώνονται και σχηματίζουν ένα 5S πρωτομερές (R.R., 1985). Στη συνέχεια, 5 πρωτομερή συνδέονται και σχηματίζουν ένα καψιδικό 14S πενταμερές, όπου ενώνονται και δίνουν το 80S άδειο προκαψίδιο. Υπάρχουν δύο μοντέλα για τον σχηματισμό του προϊόντος, του επόμενου ενδιάμεσου κατά την συναρμολόγηση του ιϊκού σωματιδίου: Είτε το ιϊκό RNA εισάγεται μέσα στο προκαψίδιο μέσω ενός πόρου, είτε τα πενταμερή συσσωματώνονται γύρω από το ιϊκό RNA, σχηματίζοντας τον προϊόν. Το τελευταίο στάδιο της συναρμολόγησης του ιϊκού σωματιδίου είναι η τομή της VP0 σε VP2 και VP4, μέσω ενός μηχανισμού αυτοκατάλυσης. Αυτό το στάδιο είναι πολύ σημαντικό γιατί μετατρέπει τον προϊόν σε ώριμο μολυσματικό ιϊκό σωματίδιο, αυξάνοντας παράλληλα την σταθερότητα του καψιδίου του (De Jesus, 2007).

Μετά την συναρμολόγηση, ο ιός συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα του μολυσμένου κυττάρου και απελευθερώνεται με τη λύση του κυττάρου-ξενιστή (θάνατο). Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλαγές, γνωστές ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις, (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Μορφογένεση του εντεροϊού. Μορφογένεση του εντεροϊού. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται σε VP0+VP3+VP1 πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν το πρωτομερές 5S. Τα πρωτομερή σχηματίζουν τα πενταμερή 14S και αυτά με τη σειρά τους τα άδεια ιικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S ιωσωμάτιο. (Πηγή: <http://imgarcade.com/1/enterovirus-71/>)

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι εντεροϊοί μολύνουν εκατομμύρια ανθρώπων παγκοσμίως κάθε έτος, με ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκβάσεων που κυμαίνονται από την ασαφή μόλυνση και την ήπια αναπνευστική ασθένεια (κοινό κρυολόγημα) έως την ασθένεια HFM, την οξεία αιμορραγική επιπεφυκίτιδα, την ασηπτική μηνιγγίτιδα, την μυοκαρδίτιδα και την οξεία χαλαρή παράλυση.

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

Κόπρανα -> λύματα -> νερό -> στοματοεντερική οδός

Για τον ιό της ηπατίτιδας Α (HAV) συχνή είναι η μετάδοση μέσω οστρακοειδών (μύδια) που αναπτύσσονται σε νερά που δέχονται κοπρανώδη ρύπανση. Πιο επιρρεπείς στις μολύνσεις από εντεροϊούς, όπως και στις περισσότερες ασθένειες, είναι τα μικρά παιδιά και γενικά τα άτομα μικρής ηλικίας τα οποία συνήθως δεν έχουν αντισώματα από προηγούμενες μολύνσεις. Ενήλικες μπορούν και αυτοί να μολυνθούν και να νοσήσουν, αν δεν παρουσιάζουν ανοσία για κάποιο συγκεκριμένο ορότυπο. Εντεροϊοί μπορούν να βρεθούν σε εκκρίσεις του αναπνευστικού (σάλιο, πτύελα ή ρινική βλέννα) με αποτέλεσμα να μολύνουν τα άτομα που θα έρθουν σε επαφή με αυτά. Εντεροϊοί εντοπίζονται συνήθως στα κόπρανα ενός μολυσμένου ατόμου (CDC, June 1998). Γι' αυτό το λόγο καλές συνθήκες υγιεινής μπορούν να μειώσουν την μετάδοση των ιών αυτών, ενώ η εποχή που μεταδίδονται συνήθως οι εντεροϊοί είναι το καλοκαίρι και το φθινόπωρο.

1.4 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Οι εντεροϊοί αποτελούν για τον άνθρωπο συνήθη αιτιολογία κλινικών λοιμώξεων. Οι περισσότεροι εντεροϊοί (όχι ο HAV) μπορούν να προκαλέσουν λοίμωξη του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επιπλέον μπορούν να προκαλέσουν ποικίλα κλινικά σύνδρομα. Οι πολιοϊοί είναι δυνατόν να προκαλέσουν παραλύσεις, ενώ οι υπόλοιποι εντεροϊοί σχετίζονται με την εμφάνιση μυϊτίδας, μυοκαρδίτιδας, μηνιγγίτιδας, επιπεφυκίτιδας, εξανθημάτων, ήπιων λοιμώξεων των ανωτέρων αναπνευστικών οδών και ηπατίτιδας. Διάφοροι εντεροϊοί μπορούν να προκαλέσουν το ίδιο σύνδρομο, ενώ ο ίδιος εντεροϊός μπορεί να προκαλέσει ποικιλία συνδρόμων, είτε με την μορφή σποραδικών κρουσμάτων ή ακόμη και επιδημιών. Οι εντεροϊοί εισέρχονται στο σώμα του ανθρώπου και των ζώων από τη στοματική οδό. Αρχική θέση πολλαπλασιασμού τους αποτελεί ο λεμφικός ιστός του πεπτικού σωλήνα, περιλαμβανομένου και του φάρυγγα.

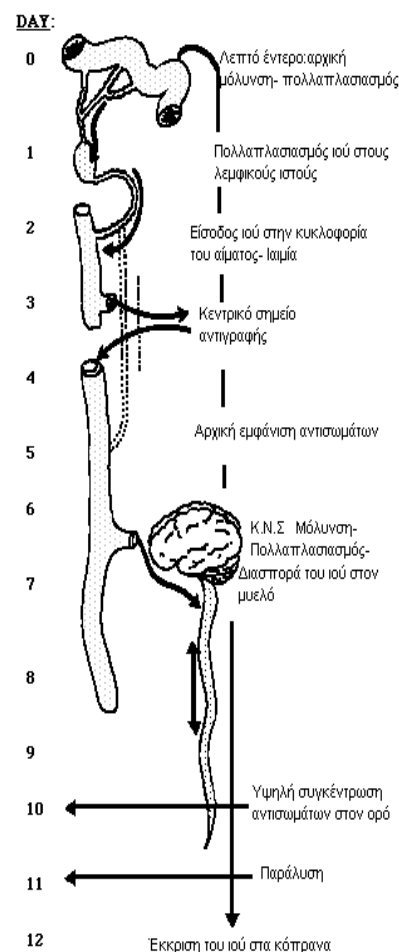
Σύμφωνα με το μοντέλο του Sabin (Εικόνα 14), ο ιός εγκαθιδρύει αρχικά μία μόλυνση στις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντερικού σωλήνα. Στη συνέχεια ο ιός μπορεί να μεταδοθεί από τον βλεννογόνο στους τοπικούς λεμφαδένες από τους οποίους μπορεί να απομονωθεί αλλά αυτό δεν σημαίνει απαραίτητως ότι ο ιός μπορεί να αντιγράφεται εκεί. Κατόπιν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, προκαλώντας μία χαμηλού βαθμού ιαιμία και έτσι μπορεί πλέον να μολύνει πιο απομακρυσμένους λεμφικούς ιστούς ή άλλες ευαίσθητες περιοχές.

Από το έντερο διασπείρονται προς δυο κατευθύνσεις:

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

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

Οι Coxsackie-ιοί και οι ECHO-ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύτερο φάσμα νόσων. Αρχική θέση πολλαπλασιασμού τους είναι ο φάρυγγας και το λεπτό έντερο. Οι ιοί αυτοί μπορούν να προκαλέσουν παραλύσεις μυών, φυσαλιδώδη στοματίτιδα ή ερπητική κυνάγχη (Coxsackie A), επιδημική μυαλγία και πλευροδυνία (Coxsackie B) μυοκαρδίτιδα και περικαρδίτιδα (Coxsackie B), μηνιγγοεγκεφαλίτιδα (Coxsackie B και εντεροϊός 71), εξανθήματα, κ.τ.λ.. Ο ιός Coxsackie B4 θεωρείται υπεύθυνος για την πρόκληση διαβήτη. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπειτα από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς (Oberste, 2005).



Εικόνα 14: Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των εντεροϊών.

(Πηγή: www.micro.msb.le.ac.uk/.../balti4/balti24.html)

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο εντοπισμός αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών μέσω μιας stem-loop reverse transcription PCR έπειτα από θερμικές αδρανοποιήσεις σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες 42 °C, 52°C, 62°C, 72°C και 82°C συγκεντρώσεων [10⁵] και [1] TCID₅₀, με τη χρήση ενός ειδικού εκκινητή αντίστροφης μεταγραφάσης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Στον σχεδιασμό των εκκινητών για εντοπισμό του (-) αρνητικού κλώνου , χρησιμοποιήθηκαν όσον αφορά την RT-PCR , ο εκκινητής EntNS3RT. Ο συγκεκριμένος RT-PCR εκκινητής , σχηματίζει χαρακτηριστική δομή στελέχους – θηλιάς , (stem-loop structure) και μία ειδική ικκή αλληλουχία στο 3'-άκρο, η οποία προσδίδει αυξημένη θερμοδυναμική σταθερότητα και υψηλή εξειδίκευση . Η διάταξη που εμφανίζει ο RT- primer, αποτελεί «εργαλείο» για τον εντοπισμό του αρνητικού κλώνου, (Anwar, August, & Too, 2006). Για την PCR επιλέχτηκε το ζεύγος εκκινητών EntNS1-f/UC53flap , όπου ο EntNS1-f προσδένεται πάνω σε ένα κομμάτι του εκκινητή EntNS3 (stem-loop). Το μέγεθος του προϊόντος είναι 446bp για τον αρνητικό κλώνο και 438bp για τον θετικό κλώνο.

Πίνακας 2: Αλληλουχίες εκκινητικών μορίων

Primer	Sequence	Position
EntNS3 RT	5'- TGTG CGTTCCCGCCGTCGCACTTCTGTTT -3'	176-182
EntNS1-f	5'- CGTTCCCGCCGTCGCAC -3'	
UG52-flap	5'- aataaatcataaCAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-3'	168-188
UC53-flap	5'- aataaatcataaTTGTCACCATAACCAGCCA-3'	588-606

Bold: Viral specific sequence

Fluo: Primer Specific Sequence

3.2 ΘΕΡΜΙΚΕΣ ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ Sabin 1

Μετά τη μόλυνση των κυττάρων με το πρότυπο στέλεχος Sabin 1, πραγματοποιήθηκε σειρά αδρανοποιήσεων για τις εξής θερμοκρασίες της πειραματικής διαδικασίας: 42°C, 52°C, 62°C, 72°C και 82°C και για τις δύο υπό εξέταση συγκεντρώσεις TCID₅₀ [10⁵] και [1].

Οι αδρανοποιήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του υδατόλουτρου και την παραμονή αρχικά του θρεπτικού υλικού τους D-MEM 2% στις αντίστοιχες θερμοκρασίες για δέκα λεπτά (10min), και στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό για ακόμη 10min όπου τώρα περιείχε και την αντίστοιχη συγκέντρωση ιού σε TCID₅₀, [10⁵] και [1].

3.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ RD ΜΕ ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΜΒΟΛΙΑΚΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ SABIN 1

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά RD (rhabdomyosarcoma) για την ανάπτυξη του στελέχους Sabin 1. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις για την επίτευξη του στελέχους στις δύο υπό εξέταση διαφορετικές συγκεντρώσεις [10⁵] και [1] CCID₅₀. Με τον όρο CCID₅₀ αναφερόμαστε στο τίτλο του ιού που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στο 50% της κυτταροκαλλιέργειας. Για την δυνατή μόλυνση της κυτταροσειράς RD από το δείγμα ιού, ο έλεγχος ποιότητας της είναι απαραίτητος, παράλληλα πραγματοποιήθηκε η απόψυξη του δείγματος.

Όσον αφορά τη μόλυνση τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό D-MEM με περιεκτικότητα 1% σε Fetal Bovine Serum (FBS). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μεταφορά 100μl από την κυτταροκαλλιέργεια (D-MEM 2%) σε κάθε πηγαδάκι από μια μικροπλάκα 96 θέσεων. Τέλος πραγματοποιήθηκε επώαση στους 37°C και καθημερινή παρακολούθηση για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης (cytopathic-CPE).

3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΙΙΚΟΥ RNA

Η απομόνωση του ιϊκού RNA από τα κύτταρα πραγματοποιήθηκε στις 6h (θετικοποίηση σήματος για τον αρνητικό κλώνο) για τις δύο υπό εξέταση συγκεντρώσεις TCID₅₀ [10⁵] και [1]. Πρώτο βήμα ήταν η εκχύλιση του ιϊκού γενετικού υλικού, με την χρησιμοποίηση της RNeasy Mini Kit της εταιρείας QIAGEN. Κατά την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκαν 200μl από το κάθε προς εξέταση δείγμα και συλλέχτηκαν 50μl από το εκχυλισθέν RNA .

3.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Μετά από την εκχύλιση του γενετικού υλικού του ιού (RNA), απαραίτητο βήμα είναι η μετατροπή του σε cDNA, προκειμένου να ακολουθήσει PCR μέσω της οποίας θα ενισχυθεί η περιοχή του ιϊκού γενώματος που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Για την σύνθεση cDNA από το προϊόν της εκχύλισης του RNA, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω διαδικασία ήταν η Superscript II, προσφέροντας υψηλή απόδοση.

Για τον θετικό κλώνο χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής UC53-flap , ενώ για τον αρνητικό κλώνο έγινε χρήση του **EntNS3RT**. Αρχικά, προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει τον εκκινητή UC53-flap τελικής συγκέντρωσης 50pmol (1 μl/tube), 2mM dNTPs τελικής συγκέντρωσης και νερό ελεύθερο νουκλεασών (Nucleasefree water) (5μl/tube). Σε erppendorf των 500μl, προστέθηκαν 7μl/tube του παραπάνω μίγματος και 5μl RNA του εκχυλίσματος. Στη συνέχεια, τα tubes, επώαστηκαν στους 65° C για 5min. Μετά την επώαση, τα Erppendorf τοποθετούνται στον πάγο. Έπειτα, προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα, το οποίο περιέχει 1X first strand Buffer, το οποίο αποτελεί ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα για την δράση του ενζύμου, 0,01 mM DTT , RNase out (20units) , αντίστροφη μεταγραφάση (RT Superscript II (Invitrogen), 100U) και νερό ελεύθερο νουκλεασών (Nuclease- free water), ώστε τελικά ο όγκος του μίγματος να είναι 8 μl. Στη συνέχεια προστέθηκαν 8μl αυτού του μίγματος σε κάθε erppendorf, και ακολούθησε spin down, και επώαση των erppendorf στους 42 °C για 50min, βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της RT Superscript II και στην συνέχεια έγινε απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με επώαση στους 70°C για 15min.

3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR

Η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler).

Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation),
- 2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου,
- 3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension).

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά, προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Το μίγμα αποτελείται από: 1mM dNTPs τελικής συγκέντρωσης, 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA Taq Buffer 1X), 1 μl $MgCl_2$ 2mM, 10pmol από τους εκκινητές, 0,5U KAPA Taq και νερό ddH₂O (nuclease free) μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος, σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA από το προϊόν της RT.

Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf thermal cycler) σε συνθήκες, οι οποίες είναι ειδικές για κάθε διαφορετικό ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε (βλ. πίνακα 1).

Παράλληλα Χρησιμοποιήθηκαν για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων δυο είδη controls, το ddH₂O, καθώς και κυτταροκαλλιέργεια μη ενοφθαλμισμένη με ιό.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την PCR ήταν το εξής :

PCR conditions

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR για ανίχνευση αρνητικού κλώνου (EntNS1-f/UC53-flap)

PCR conditions	Temperature	Time	40 cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	2 min	

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR για ανίχνευση θετικού κλώνου (UG52-flap/UC53-flap)

PCR conditions	Temperature	Time	45 cycles
Initial denaturation	95°C	2 min	
Denaturation	95°C	30 sec	
Annealing	63°C	30 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Final extension	72°C	2 min	

Πίνακας 5: Πίνακας συνθηκών της Nested - PCR

Nested RT -PCR conditions	Temperature	Time
Initial denaturation	95°C	3 min
Denaturation	95°C	30 sec
Annealing	55°C	30 sec
Extension	72°C	30 sec
Final extension	72°C	5 min

3.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 2%, ενώ για Nested - PCR 3%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen Ultra-Pure Gel Agarose) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) αναμίχτηκαν, σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

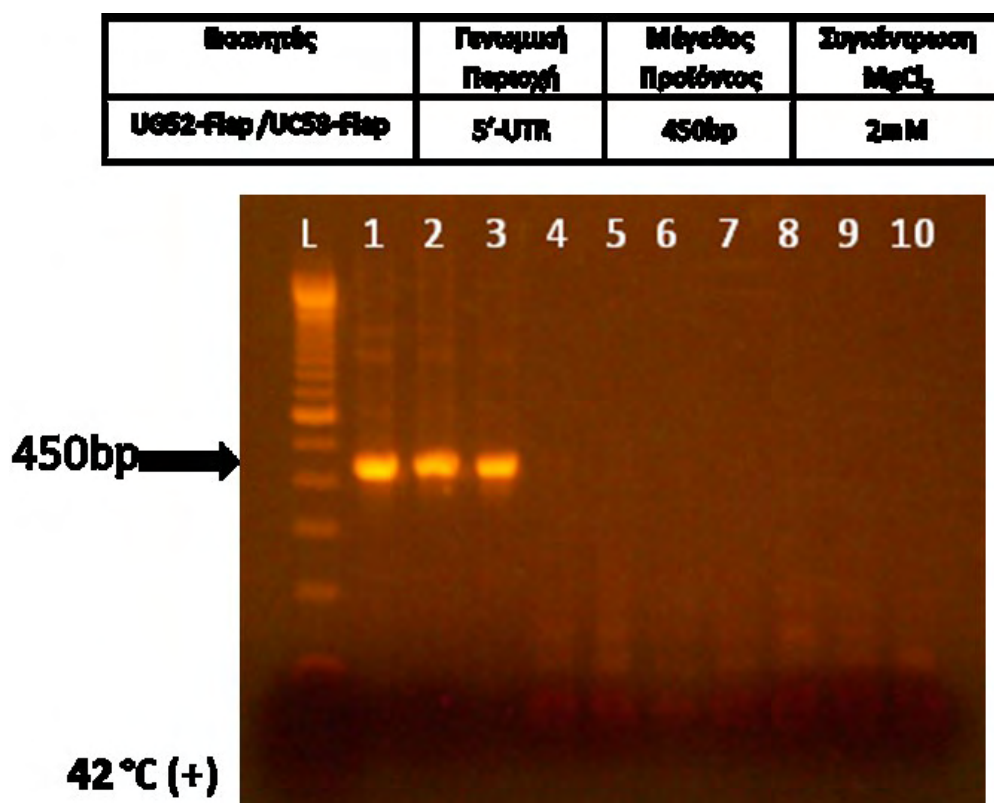
Για τον προσδιορισμό του μήκους των PCR προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30min. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και η πηκτή φωτογραφήθηκε .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

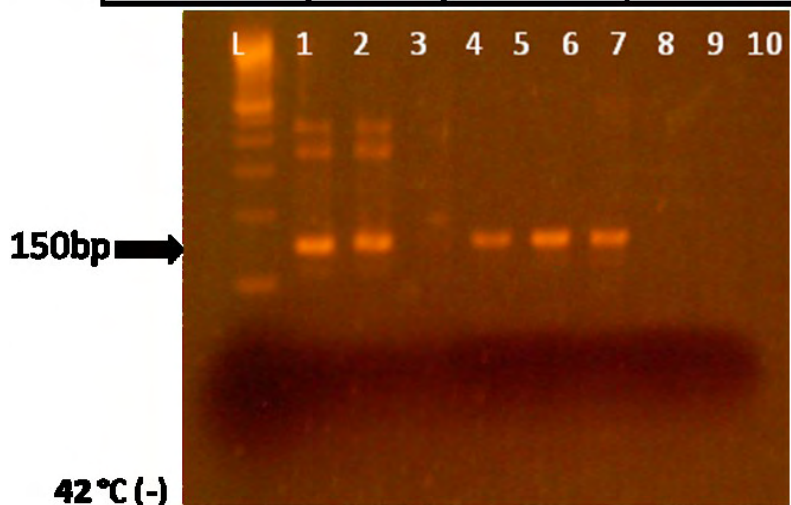
Για την επιβεβαίωση παρουσίας ιϊκού γενώματος στις κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών UG52flap/UC53flap. Ενώ ο EntNS1f/UC53flap χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου .

Στις εικόνες παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα της PCR για τις συγκεντρώσεις $[10^5]$ και $[1]$ TCID₅₀ έπειτα από τις αδρανοποιήσεις στις αντίστοιχες θερμοκρασίες του πειράματος:



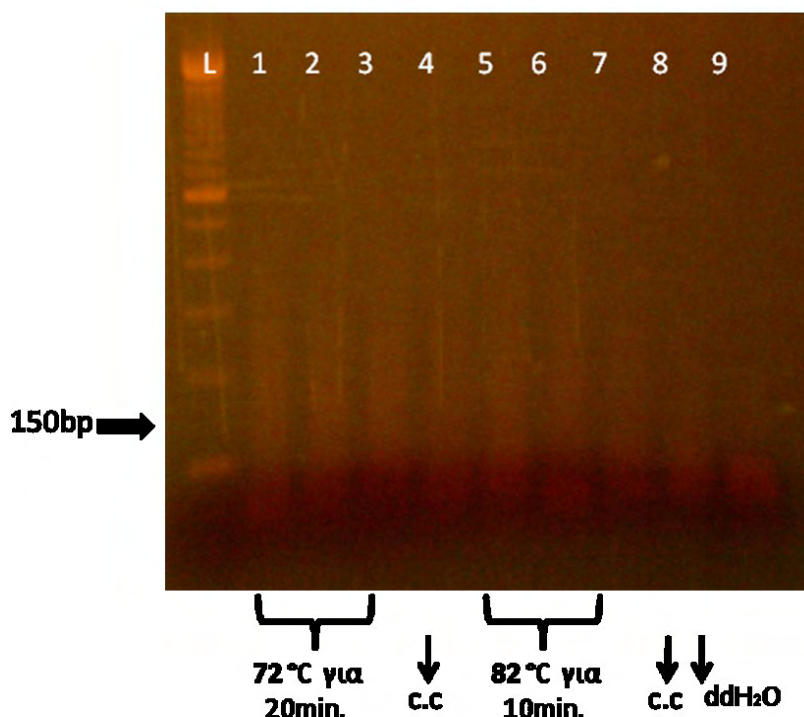
Εικόνα 15: Αποτελέσματα της PCR για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης στους 42 °C για τον θετικό κλώνο. Στην 1η στήλη αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακού βάρους Ladder 100bp, στη 1η, 2η, 3η τα δείγματα μας σε συγκέντρωση $[10^5]$ και 4η ddH₂O 5η c.c ,6η, 7η και 8η για τη συγκέντρωση $[1]$, στην 9η c.c , ενώ στη 10η ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Πρωτοπλάσμα	Γονομική Περιοχή	Μέγεθος Προβέτου	Συγκέντρωση $MgCl_2$
ENV1/ENV2	5'-UTR	148bp	2mM



Εικόνα 16: Αποτελέσματα της PCR για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης στους 42 °C για τον αρνητικό κλώνο. Στην 1η στήλη αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακού βάρους Ladder 100bp, στη 1η και 2η τα δείγματα μας σε συγκέντρωση $[10^5]$, στη 3η ddH₂O, 4η, 5η και 6η τα δείγματα για τη συγκέντρωση $[1]$, 7η c.c. ενώ, στη 8η ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Πρωτοπλάσμα	Γονομική Περιοχή	Μέγεθος Προβέτου	Συγκέντρωση $MgCl_2$
ENV1/ENV2	5'-UTR	148bp	2mM



Εικόνα 17: Αποτελέσματα της Nested-PCR για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης στους 72 °C και 82 °C για τον αρνητικό κλώνο. Στην 1η στήλη αντιστοιχεί ο μάρτυρας μοριακού βάρους Ladder 100bp, στη 1η, 2η, 3η τα δείγματα μας σε συγκέντρωση $[10^5]$ στη 4η c.c., 5η, 6η, και 7η δείγματα για 82 °C και 8η c.c. ενώ στην 9η ο αρνητικός μάρτυρας (ddH₂O).

Πίνακας 6: Αποτελέσματα που καταγράφηκαν με βάση την RT – PCR και Nested-PCR για τον θετικό και αρνητικό κλώνο για το στέλεχος Sabin 1 (συγκέντρωση $[10^5]$ TCID₅₀).

➤ Sabin 1 $[10^5]$ TCID₅₀

Θερμοκρασίες & χρόνος αδρανοποίησης	PCR για (-) κλώνο	Nested PCR για (-) κλώνο	PCR για (+) κλώνο	CPE
42 °C για 10min	+	+	+	+
52 °C για 10min	+	+	+	+
62 °C για 10min	+	+	+	+
72 °C για 10min	-	+	+	+
72 °C για 20min	-	-	-	-
82 °C για 10min	-	-	-	-

➤

Πίνακας 7: Αποτελέσματα που καταγράφηκαν με βάση την RT – PCR και Nested-PCR για τον θετικό και αρνητικό κλώνο για το στέλεχος Sabin 1 (συγκέντρωση $[1]$ TCID₅₀).

➤ Sabin 1 $[1]$ TCID₅₀

Θερμοκρασίες & χρόνος αδρανοποίησης	PCR για (-) κλώνο	Nested PCR για (-) κλώνο	PCR για (+) κλώνο	CPE
42 °C για 10min	-	+	-	+
52 °C για 10min	-	+	-	+
62 °C για 10min	-	-	-	-
72 °C για 10min	-	-	-	-

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 6 για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης στους 42°C, 52°C, 62 °C καθώς και 72°C για 10min, πραγματοποιήθηκε ανίχνευση του αρνητικού κλώνου για τη συγκέντρωση [10⁵] TCID₅₀ .

Τα αποτελέσματα για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης 72°C για 20min και 82°C για 10min στη συγκέντρωση [10⁵] TCID₅₀, επιβεβαιώνουν την μη ανίχνευση του αρνητικού κλώνου (Πίνακας 6).

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα παρατηρούμε για την συγκέντρωση [1] TCID₅₀, ότι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου σταματά στους 52°C, καθώς για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης για τους 62°C και 72°C για 10min δεν δίνουν κάποιο αποτέλεσμα με Nested ή απλή PCR (Πίνακας 7).

Τα ανωτέρω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν επίσης μέσω των αποτελεσμάτων των κυτταροκαλλιιεργειών με την ύπαρξη ή μη της κυτταροπαθογόνου δράσης. (cytopathic-CPE).

Η εικόνα των κυτταροκαλλιιεργειών για τη συγκέντρωση [10⁵] TCID₅₀, χαρακτηρίστηκε από την ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης. Πιο συγκεκριμένα έπειτα από αδρανοποίηση του στελέχους στους 42 °C και 52 °C εμφανίστηκε CPE στη μικροπλάκα μετά από την 1η και 2η μέρα αντίστοιχα. Για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης 62°C και 72°C για 10 min πραγματοποιήθηκαν ανακαλλιέργειες για να διαπιστωθεί αν ο ιός παραμένει ικανός να εισέλθει στα κύτταρα και παρατηρήθηκε CPE στη μικροπλάκα αλλά στους σωλήνες ανακαλλιέργειας στο πρώτο πέρασμα (P1). Τέλος η μη ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης 72°C για 20min και 82°C για 10min επιβεβαιώνεται τόσο στις μικροπλάκες όσο και για τις ανακαλλιέργειες σε σωλήνες μέχρι το τρίτο πέρασμα (P3).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα των κυτταροκαλλιιεργειών για τη συγκέντρωση [1] TCID₅₀ για τις χαμηλότερες θερμοκρασίες αδρανοποίησης 42°C και 52°C για 10min, παρατηρήθηκε η ύπαρξη κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) στις μικροπλάκες την 2η και την 3η μέρα αντίστοιχα. Επίσης παρατηρείται η μη εμφάνιση CPE για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης στους 62°C και 72°C για 10 min στα αποτελέσματα των κυτταροκαλλιιεργειών τόσο στις μικροπλάκες όσο και για τις ανακαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν σε σωλήνες μέχρι το τέταρτο πέρασμα (P4) για τους 62 °C και στο τρίτο (P3) πέρασμα αντίστοιχα για τους 72 °C.

Η παρατήρηση εμφάνισης της κυτταροπαθογόνου δράσης δεν συνεχίστηκε για τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης 72°C για 20min και 82°C για 10min, για το λόγο ότι από τους 52°C σταμάτα η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου και η περαιτέρω εμφάνιση του CPE για την συγκέντρωση [1] TCID₅₀.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ευθύνονται για διάφορες ασθένειες που προκαλούν στον άνθρωπο και εντοπίζονται στο περιβάλλον καθώς και σε τρόφιμα. Συνεπώς καθίσταται σημαντική η ικανότητα μιας γρήγορης μεθόδου ανίχνευσης της παρουσίας τους, αλλά και η διάκριση της αντιγραφικής ενεργότητας τους.

Η παρούσα εργασία αποτέλεσε το (ενδιάμεσο) στάδιο για την ανάπτυξη μιας stem-loop reverse transcription PCR για τον εντοπισμό αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών κατόπιν μόλυνσης κυττάρων RD με πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1. Από την πειραματική προσέγγιση διαπιστώνεται ότι κύριο και σημαντικό για τον εντοπισμό της ύπαρξης αντιγραφικά ενεργών εντεροϊών, είναι η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου. Η ανίχνευση του μπορεί να χαρακτηριστεί ως το «κλειδί» για την ενεργή αντιγραφή των Picorna ιών.

Μέσα από προηγούμενες μελέτες έχει αναδειχθεί η ύπαρξη ενός γενικότερου προβλήματος σχετικά με την μολυσματικότητα των Picorna ιών και των εντεροϊών συνολικά, καθώς μπορούν να εντοπιστούν σε περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα. Ο εντοπισμός τους σε τέτοιου είδους δείγματα όπου σχετίζονται με τον άνθρωπο και κατ' επέκταση με την ανθρώπινη υγεία καθιστά σημαντική την αποτελεσματική έρευνα της μολυσματικότητας τους. Η χρήση των υπαρχόντων κυτταρικών σειρών δίνει ένα σημαντικό προβάδισμα για μια γενική εικόνα αλλά, μέχρι και σήμερα εντοπίζεται η αδυναμία κάποιων στελεχών των εντεροϊών να αναπτυχθούν σε κυτταροκαλλιέργειες.

Η ανάπτυξη της παραπάνω προσέγγισης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία επιχειρεί να δώσει μια απλή και πολύ γρήγορη τεχνική με τη χρήση ενός εξειδικευμένου εκκινητή χωρίς την μεσολάβηση ενζυμικής κατεργασίας δειγμάτων πριν την PCR, τεχνικές χρονοβόρες, εστιάζοντας έτσι, άμεσα στον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας του ιού.

Με την επιλογή εξειδικευμένου εκκινητή (RT-primer), παρέχεται υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία κατά τον εντοπισμό. Ο εκκινητής (RT-primer) προσδένεται στον αντιγραφόμενο κλώνο στην 5' - UTR γενωμική περιοχή των εντεροϊών, όπου περιέχονται σημαντικά στοιχεία που συμμετέχουν στην αντιγραφή, μετάφραση και μολυσματικότητα των ιών αυτών. Επιτυγχάνεται με αυτό τον τρόπο η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) αλλά και η παράλληλη επιβεβαίωση μέσω των κυτταροκαλλιιεργειών. Δίνεται έτσι το πλεονέκτημα να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης μόλυνσης από εντεροϊούς σε περιβαλλοντικά δείγματα και τρόφιμα.

Συμπεραίνεται ότι οι θερμοκρασίες αδρανοποίησης προκαλούν μεταβολές στη στεροδιαμόρφωση του καψιδίου του ιού με συνέπεια την επακόλουθη εμφάνιση προβλημάτων πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα και την απώλεια της μολυσματικότητας του εντεροϊού.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές αδρανοποίησης που ακολουθούν διαδικασίες προεπεξεργασίας, μοριακές μέθοδοι (direct RT-PCR) ή μέθοδοι υβριδισμού, οι οποίες παρουσιάζουν αδυναμία στη διάκριση μεταξύ ενεργών και μη – ενεργών ιικών σωματιδίων. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας για την ανάπτυξη μιας stem-loop reverse transcription PCR έδειξαν ότι με άμεσο τρόπο μπορεί να διαπιστωθεί η αντιγραφική ενεργότητα του ιού παρέχοντας τη δυνατότητα λήψης γρήγορων αποτελεσμάτων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M.L., (2014). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 159, 2831-2841.
- Adams, M.L., (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 160, 1837-1850.
- Ambros, V., Petterson R., Baltimore D., (1978). An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 15, 1439–1446.
- 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.* 255, 6739-6744.
- Andino, R., Rieckhof, G.E., Trono, D., Baltimore, D., (1990). Substitutions in the protease (3Cpro) gene of poliovirus can suppress a mutation in the 5' noncoding region. *J. Virol.* 64, 607-612.
- Ansardi, D., Porter, D., Anderson, M., Morrow, C., (1996). Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46, 1-68.
- Anwar, A., August, J.T., Too, H.P., (2006). A stem-loop mediated reverse transcription real time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Analytical Biochemistry* 352(1), 120-128.
- Baert, L., Debevere J., Uyttendaele M., (2009). The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses, *Intern. Journ. of Food Microb.* 131, 83–94.
- Barton, D.O., (2001). 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *EMBO J.* 20, 1439-1448.
- Basavappa, R., Syed, R., Flore, O., Icenogle, J.P., Filman, D.J., Hogle, J.M., (1994). Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 Å resolution. *Protein Sci.* 3, 1651-1669.
- Bertrand, I., Schijven, J.F., Sanchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., De Roda Husman, A.M., Myrmel, M., Sellwood, J., Cook, N., Gantzer, C., (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review, *Jour. Appl. Microb.* 112, 1059–1074.

Bhattacharya, S.S., Kulka, M, Lampel, K.A., Cebula, T.A., Goswami, B.B., (2004). Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus, *Jour. of Virol. Meth.* 116, 181–187.

Birli, K., (2009). Track recombination at 2C and 3D genomic regions of poliovirus vaccine strains. Bachelor's thesis, 11-12.

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. NeuroViro.* 4, 1-26.

Borman, A.D., (1994). Sequences within the poliovirus internal ribosome entry segment control viral RNA synthesis. *EMBO J.* 13, 3149-3157.

Brakoulas, C., (2007). Restrospective detection of recombinations in environmental poliovirus samples. Bachelor's thesis, 10-11, 18.

Brown, D.M., Cornell, C.T., Tran, G.P., Nguyen, J.H., Semler, B.L., (2005). An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol.* 79, 11962–11973.

Bubeck, D., Filman, D.J., Cheng, N., Steven, A.C, Hogle, J.M., Belnap, D.M., (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. *J. Virol.* 79, 7745-7755.

Caspar, D.L., KLUG., A., (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 27, 1-24.

CDC (2006) Enterovirus surveillance -United States, 2002-2004. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55, 153-156.

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

Cliver, D.O., (2009). Capsid and Infectivity in Virus Detection, *Food Envir. Virol.* 1, 123–128.

Coyne, C.A., (2006). Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119-131.

De Jesus, N.H., (2007). Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virology journal* 4, 70.

De Roda Husman, A.M., Lodder W.J., Rutjes S.A., Schijven J.F., Teunis, P.F.M., (2009). Long-Term Inactivation Study of Three Enteroviruses in Artificial Surface and Groundwaters, Using PCR and Cell Culture, *Appl. & Environ. Microb.* 75, 1050-1057.

De Sena, J.A., (1977). Studies on the in vitro uncoating of poliovirus. II. Characteristics of the membrane-modified particle. *Virology* 78, 554-566.

DeTulleo, L.A., (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO J.* 17, 4585-4593.

Ehrenfield, E., Teterina, N., (2002). Initiation of Translation of Picornavirus RNAs: Structure and Function of the Internal Ribosome Entry. In *Molecular Biology of Picornaviruses*. At S. a. E.. Washington D.C: ASM Press, 159-169.

Fernandez-Miragall, O., Ramos R., Ramajo, J., Martinez-Salas, E., (2006). Evidence of reciprocal tertiary interactions between conserved motifs involved in organizing RNA structure essential for internal initiation of translation. *RNA* Volume 12(2), 223-234.

Fields B.N., (1985). *Virology*. New York, USA: Raven press.

Filman, D.J, Syed, R., Chow, M., Macadam, A.J., Minor, P.D., Hogle, J.M., (1989). Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8, 1567-1579.

Flanegan, J.B., Petterson, R.F., Ambros, V., Hewlett, N.J., Baltimore, D., (1977). Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 961-965.

Fricks, C.A., (1990). Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J. Virol.* 64, 1934-1945.

Gamarnik, A.V, Andino, R., (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev.* 12, 2293-2304.

Giachetti, C., Semler, B.L., (1991). Role of a viral membrane polypeptide in strand-specific initiation of poliovirus RNA synthesis. *J. Virol.* 65(7) & 65(10), 2647-2654.

Goodfellow, I.C., (2000). Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74, 4590-4600.

Grimwood, K. , Huang, Q.S., Sadleir, L.G., Nix, W.A., Kilpatrick, D.R., Oberste, M.S., Pallansch, M.A., (2003). Acute Flaccid Paralysis from Echovirus Type 33 Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 41(5), 2230-2232.

Haller, A.A., Nguyen, J.H., Semler, B.L., (1993). Minimum internal ribosome entry site required for poliovirus infectivity. *J. Virol.* 67, 7461-7471.

Hamzaa, I.A., Jurzik, L., Überla, K., Wilhelm, M., (2011). Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples, *International Jour.of Hyg. Environ. Health* 214, 424-436.

Harris, K.S., Reddigari, S.R., Nicklin, M.J., Hammerle, T., Wimmer, E., (1992). Purification and characterization of poliovirus polypeptide 3CD, a proteinase and a precursor for RNA polymerase. *J. Virol.* 66, 7481-7489.

Heim, A., (2005). From Poliovirus surveillance to enterovirus surveillance: a complete picture. *J. Med. Microbiol.* 54, 1-2.

Hellen, C.U., (1995a). Enterovirus genetics. Chapter 2 in *Human Enterovirus Infections* ed. Rotbart A.H. *Washington D.C: ASM Press.*, 25-72.

Hendry, E.H., (1999). The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure* 7, 1527-1538.

Hogle, J.M., Chow, M., Filman, D.J., (1985). Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 229, 1358-1365.

Hogle, J.M., (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 677-702.

Iizuka, N.Y., (1991). Nucleotide sequences important for translation initiation of enterovirus RNA. *J. Virol.* 65, 4867-4873.

- Jackson, R.H., (1994). Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol. Biol. Rep.* 19, 147-159.
- Jang, S.D., (1989). Initiation of protein synthesis by internal entry of ribosomes into the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA in vivo. *J. Virol.* 63, 1651-1660.
- Kerkvliet, J., Educulla, R., Rodriguez, M., (2010). Novel roles of the picornaviral 3D polymerase in viral pathogenesis. *Adv. Virol.* 2010, 368068.
- Kew, O, De, L., Yang C-F., (1993). The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res*, 215-246.
- Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.G., Larsen, G.R., Adler, C.J., Dorner, A.J., Emini, E.A., Hanecak, R., Lee, J.J., van der, W.S., Anderson, C.W., Wimmer, E., (1981). Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 291, 547-553.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., (2007). *Fields Virology, 5th Edition*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Lawson, M.A., (1992). Alternate poliovirus nonstructural protein processing cascades generated by primary sites of 3C proteinase cleavage. *Virology* 191, 309-320.
- Le, S.C., (1992). Conserved tertiary structure elements in the 5' untranslated region of human enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* 191, 858-866.
- Lee, YF, Nomoto, A., Detjen, B.M., Wimmer, M., (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A* 74, 59–63.
- Lin, J.Y., Chen, T.C., Weng, K.F., Chang, S.C., Chen, L.L., Shih, S.R., (2009). Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle. *J. Biomed. Sci.* 16, 103.
- Lopez, d.Q., Lafuente, E., Martinez-Salas, E., (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA*. 7, 1213-1226.
- Ma, J.F., Straub, T.M., Pepper, I.L., Gerba, C.P., (1994). Cell culture and PCR determination of poliovirus inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4203-4206.
- Melchers, W.Z., (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, 1671-1682.

Melnick, J.L., In: Fields BN, K.D., (1996). *Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses*. Philadelphia: Lippincott-Raven.

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

Morasco, B.J., Sarma, N., Parilla, J., Flanagan, J.B., (2003). Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9), 5136–5144.

Moscufo, N., Chow, M., (1992). Myristate-protein interactions in poliovirus: interactions of VP4 threonine 28 contribute to the structural conformation of assembly intermediates and the stability of assembled virions. *J. Virol.* 66, 6849-6857.

Mueller, S., Wimmer, E., (2003). Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J. Biol. Chem.* 278, 31251-31260.

Newcombe, N.G., Andersson, P., Johansson, E.S., Au, G.G., Lindberg, A.M., Barry, R.D., Shafren, D.R., (2003). Cellular receptor interactions of C-cluster human group A coxsackieviruses. *J. Gen. Virol.* 84, 3041-3050.

Newcombe, N.G., Beagley, L.G., Christiansen, D., Loveland, B.E., Johansson, E.S., Beagley, K.W., Barry, R.D., Shafren, D.R., (2004). Novel role for decay-accelerating factor in coxsackievirus A21-mediated cell infectivity. *J. Virol.* 78, 12677-12682.

Nicholson, F., Meetoo, G., Aiyar, S., Banatvala, J.E., Muir, P., (1994). Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *Jour. of Virol. Meth.* 48, 155-166.

Nicholson, R., Pelletier, J., Le, S.Y., Sonenberg, N., (1991). Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type 2: in vivo translation studies. *J. Virol.* 65, 5886-5894.

Nomoto, A., Kitamura, N., Golini, F., Wimmer, E., (1977). The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5345-5349.

- Novak, J.E., Kirkegaard, K., (1991). Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.* 65, 3384–3387.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O.,(2002). Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus, *Appl. & Environ. Microb.* 69, 350-357.
- Nuanualsuwan, S., Cliver, D.O., (2003). Infectivity of RNA from Inactivated Poliovirus, *Applied & Environmental Microbiology* 69, 1629–1632.
- O'Brien, R.T., Newman, J.S., (1977). Inactivation of Polioviruses and Coxsackieviruses in Surface Water, *Appl. & Environ. Microb.* 33, 334-340.
- Oberste, M.S., Maher, K., Williams, A.J., Dybdahl-Sissoko, N., Brown, B.A., Gookin, M.S., Peñaranda, S., Mishrik, N., Uddin, M., Pallansch, M.A., (2006). Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *Journal of General Virology* 87, 119-128.
- Oberste, M.S., Palacios, G.B., (2005). Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of neurovirology* 11, 424-433.
- Ohka, S.M., (2004). Receptor (CD155)-dependent endocytosis of poliovirus and retrograde axonal transport of the endosome. *J. Virol.* 78, 7186-7198.
- Orthopoulos, G.T., (2004). Coxsackie B viruses use multiple receptors to infect human cardiac cells. *J. Med. Virol.* 74, 291-299.
- Papanastasiopoulou, M., (1997). Polymerase Chain Reaction - Method Description and application on virus detection. *Hellenic Veterinary Medical Society Journal* 1997, 48(2), 61-69.
- Parsley, T.C., (1999). Modulation of the RNA binding and protein processing activities of poliovirus polypeptide 3CD by the viral RNA polymerase domain. *J. Biol. Chem.* 274, 2867-12876.
- Pathak, H.O., (2008). Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oril-dependent VPg uridylylation. *J. Biol. Chem.* 283, 30677-30688.
- Paul, A.P., (2003). Biochemical and genetic studies of the VPg uridylylation reaction catalyzed by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Virol.* 77, 891-904.

- Pelkmans, L., Bürli, T., Zerial, M., Helenius, A., (2004). Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118(6), 767-780.
- Pelletier, J.A., (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Perez, L. A., (1993). Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *J. Virol.* 67, 4543-4548.
- Pestova, T.H., (1996). Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry. . *Mol. Cell Biol.* 16, 6859-6869.
- Pettersson, R.F., Flanagan, J.B., Rose, J.K., Baltimore D., (1977). 5'-Terminal nucleotide sequences of polio virus polyribosomal RNA and virion RNA are identical. *Nature* 268, 270-272.
- Pfister T., Mirzayan, M., Wimmer, E., (1999). *Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.*
- Pilipenko, E.M., (1992). Towards identification of cisacting elements involved in the replication of enterovirus and rhinovirus RNAs: a proposal for the existence of tRNA-like terminal structures. *Nucleic Acids Res.* 20, 1739-1745.
- Racaniello, V., (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*, 344.
- Racaniello, V., (1981.,). Molecular cloning of poliovirus cDNA and determination of the complete nucleotide sequence of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.* 78, 4887-4891.
- Racaniello, V., (2007). Picornaviridae: The viruses and their replication. At H.P. In: Knipe, D., *Fields Virology 5th edition* Lippincott Williams & Wilkins, 796-830.
- Ratka, M., Lackmann, M., Ueckermann, C., et al., (1989). Poliovirus-associated protein kinase: destabilization of the virus capsid and stimulation of the by Zn²⁺. *J. Virol.* 63, 3954-3960.
- Rodríguez, R.A., Pepper, I.L., Gerba, C.P., (2009). Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples, *Applied & Environmental Microbiology.* 75, 297–307.

- Rossmann, M., (2002). Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 10, 324-331.
- Rossmann, M., (1994). Viral cell recognition and entry. *Protein Sci.* 3, 1712-1725.
- Rueckert, R.R., Dunker, A.K., Stoltzfus, C.M., (1969). The structure of mouse-Elberfeld virus : a model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62, 912-919.
- Rueckert, R.R., (1984). Systematic nomenclature of picornavirus proteins. *J. Virol.* 50, 957-959.
- Saunders, J.B., (2007). Picornavirus Virion. *VIROLOGY PRINCIPLES AND APPLICATIONS*. John Wiley & Sons Ltd., 160-162.
- Selinka, H.C., Zibert, A., Wimmer, E., (1991). Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3598-602.
- Selinka, H.C., Wolde, A., Pasch, A., Klingel, K., Schnorr, J.J., Kupper, J.H., Lindberg, A.M., Kandolf, R., (2002). Comparative analysis of two coxsackievirus B3 strains: putative influence of virus-receptor interactions on pathogenesis. *J. Med. Virol.* 67, 224-233.
- Semler, B.L., (2004). Poliovirus proves IRES-istible in vivo. *J. Clin. Invest.* 113, 1678-1681.
- Shafren ,D.R., Dorahy, D.J., Thorne, R.F., Barry, R.D., (2000). Cytoplasmic interactions between decay-accelerating factor and intercellular adhesion molecule-1 are not required for coxsackievirus A21 cell infection. *J. Gen. Virol.* 81, 889-894.
- Sharma, R., Raychaudhuri, S., Dasgupta, A., (2004). Nuclear entry of poliovirus protease-polymerase precursor 3CD: implications for host cell transcription shut-off. *Virology* 320, 195-205.
- Shieh, J.T., Bergelson, J.M., (2002). Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 76, 9474-9480.
- Strauss, D.M., Wuttke, D.S., (2007). Characterization of protein-protein interactions critical for poliovirus replication: analysis of 3AB and VPg binding to the RNA-dependent RNA polymerase. *J. Virol.* 81, 6369-6378.

- Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L., Helenius, A., (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J. Cell Biol.* 170(5), 69-779.
- Todd, S., Towner, J.S., Brown D.M., Semler, B.L., (1997). Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol.* 71, 8868–8874.
- Tryfonos, C., (2012). Molecular mapping of mutations of a CVB5 strain that caused a meningitis epidemic in 1996 and Epidemiology of Enteroviruses from 2003 to 2011 in Cyprus. Doctoral thesis, 1-6, 9, 14-16, 20.
- Tsolis, K., (2008). Molecular detection and identification of enteroviruses in the 5' non-coding region. Bachelor's thesis, 19.
- Greber, U.F., (2002). Signaling in viral entry. *Cell Mol Life Sc.* 59(4), 608-626.
- Ververidis, F., (2003). Laboratory Applications of Plant Biotechnology, T.I. of Crete, Heraklion, 60-66.
- Wimmer, E., (1982). Genome-linked proteins of viruses. *Cell*, 199-201.
- Yin, J., Paul, A.V., Wimmer, E., Rieder, E., (2003). Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J. Virol.* 77, 5152-5166
- Yogo, Y., Teng, M.H., Wimmer, E., (1974). Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res. Commun.* 61, 1101–1109.
- Yogo, Y., Wimmer, E., (1972). Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 69, 1877–1882.
- Zhang, P.M., Zhang, P., Mueller, S., Morais, M.C., Bator, C.M., Bowman, V.D., Hafenstein, S., Wimmer, E., Rossmann, M.G., (2008). Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105, 18284-18289.