

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Βιοχημείας και  
Βιοτεχνολογίας**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ  
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**ΦΙΚΑΤΑΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ**

**ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΟΥ  
ΚΛΩΝΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ SABIN 1 ΜΕΣΩ ΜΙΑΣ STEM-LOOP  
REVERSE TRANSCRIPTION PCR ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ RD.**

**ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΙΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΛΛΟΙΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΑ  
CCID<sub>50</sub>**

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

Κινητική ανίχνευσης του αρνητικού και θετικού κλώνου του ιού Sabin 1 μέσω μιας stem-loop reverse transcription PCR σε κύτταρα Rd.  
Συσχέτιση με τις κυτταρικές αλλοιώσεις και τα CCID<sub>50</sub>

Detection of negative and positive RNA strand of Sabin 1 virus by a stem-loop reverse transcription PCR in Rd cells.  
Correlation with the CPE and the CCID<sub>50</sub>

**Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):**

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ:**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:**

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗ ΓΕΝΩΜΙΚΗ ΤΟΥ  
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

## Abstract

---

Human enteroviruses belong to genus *enterovirus* of Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-strand RNA, which consists of a highly conserved 5'-UTR, an Open Reading Frame (ORF), a 3'-UTR and a poly(A)-tract. The members of this genus are characterized by their non-enveloped icosahedral capsid of two-, three- and five-fold symmetry, which is made up of 60 copies of pentameric intermediates of 4 proteins: VP1, VP2, VP3 and VP4. Most enterovirus infections are asymptomatic and occur more frequently in men than in women. On the other hand, these viruses can cause a range of distinct clinical syndromes leading to diseases.

The most well-studied enterovirus is poliovirus, because of poliomyelitis and the need for its urgent eradication.

In the present study, a specific stem-loop mediated reverse transcription was developed, which allowed the detection of the negative strand (replicative strand) of Sabin 1 virus. The structure of RT-primer provides high sensitivity and specificity to this molecular technique, whereas it is no time-consuming compared to cell cultures.

According to our results, the detection of the negative strand was achieved 2 hours post infection in all tested concentrations of Sabin 1 virus. The follow up of cell cultures was carried out, in order to confirm the reliability of this molecular technique by the appearance of characteristic CPE in Rd cells. Development of this approach in combination with molecular techniques, can find applications in vaccine development, making this specific RT-PCR a useful tool.

## Περίληψη

---

Οι ανθρώπινοι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών της οικογένειας *Picornaviridae*. Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά. Τα μέλη του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από το μη-ελντροφόρο εικοσαεδρικό καψίδιο που αποτελείται από 60 αντίγραφα πενταμερών 4 πρωτεϊνών. Οι περισσότερες λοιμώξεις των εντεροϊών είναι ασυμπτωματικές, και εμφανίζονται πιο συχνά σε άνδρες από ότι σε γυναίκες. Από την άλλη πλευρά, αυτοί οι ιοί μπορούν να προκαλέσουν ένα φάσμα από διακριτά κλινικά σύνδρομα οδηγώντας σε ασθένειες.

Ο καλύτερα μελετημένος εντεροϊός, είναι ο πολιοϊός, εξαιτίας της εμφάνισης της πολυμυελίτιδας και της ανάγκης για την εξάλειψή της.

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μία ειδική stem-loop αντίστροφη μεταγραφή, η οποία επέτρεψε την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος) του στελέχους Sabin 1. Η τεχνική αυτή χάρη στη χαρακτηριστική δομή του εκκινητή που χρησιμοποιείται για την διαδικασία της RT, παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία και εξειδίκευση, ενώ παράλληλα δεν είναι καθόλου χρονοβόρα συγκριτικά με τις κυτταροκαλλιέργειες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μοριακής αυτής τεχνικής, ήταν δυνατή η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας σε όλες τις υπό εξέταση συγκεντρώσεις του στελέχους, 2 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας. Η επιβεβαίωση των αξιόπιστων αποτελεσμάτων της τεχνικής αυτής πραγματοποιήθηκε μέσω της μελέτης της κυτταροκαλλιέργειας. Η ανάπτυξη της παραπάνω προσέγγισης σε συνδυασμό με μοριακές τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια έχουν βρει εφαρμογές σε μελέτες ανάπτυξης εμβολίων, καθιστώντας την ειδική αυτή RT-PCR ένα χρήσιμο εργαλείο.

## Περιεχόμενα

---

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1	ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	1
1.1.1	Ταξινόμηση των εντεροϊών.....	1
1.1.2	Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων .....	3
1.1.3	Οργάνωση και δομή του ιικού γενόματος .....	7
1.2	ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ.....	10
1.2.1	Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο. 12	
1.2.2	Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης .....	15
1.2.3	Αντιγραφή του ιικού RNA .....	18
1.2.4	Καπιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων.....	20
1.3	ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ .....	22
1.4	ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ .....	23
1.5	ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ .....	24
1.5.1	Μεταλλάξεις.....	24
1.5.2	Ανασυνδυασμός .....	26
1.5.2.1	Αντιγραφικός Μηχανισμός ή Μηχανισμός Αλλαγής Μήτρας (replicative).....	27
1.5.2.2	Μη-αντιγραφικός μηχανισμός (non-replicative).....	29
2	ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	30
3	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	31
3.1	ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ – ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΥ .....	31
3.2	ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ .....	31
3.3	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA.....	32
3.4	ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ .....	32
3.5	ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).....	34
3.6	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR) .....	34
3.7	NESTED PCR .....	36
3.8	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ NESTED-PCR .....	36
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	38
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	44
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48

# 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Οι εντεροϊοί, όπως οι Echoviruses αλλά και οι Coxsackieviruses A και B, ανήκουν στην οικογένεια ιών *Picornaviridae*. Είναι ιοί χωρίς πρωτεϊνικό έλυτρο και το γένωμά τους είναι ένα μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας, το οποίο αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'-αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης, μία 3'-αμετάφραστη περιοχή και μία πολύ(A)-ουρά. Η οικογένεια αυτή των ιών περιλαμβάνει κι άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως ο ιός της ηπατίτιδας A, ο πολιοϊός, ο ρινοϊός και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα της οικογένειας αυτής των ιών είναι σύνθετο, καθώς αναφέρεται στο μικρό μέγεθος των ιών (*pico*), και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που απαρτίζει το ιικό γένωμα (RNA)[Adams M.J. et al (2013)].

### 1.1.1 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια των ιών Picorna αποτελείται από 31 γένη: *Aphthovirus*, *Aquamavirus*, *Avihepatovirus*, *Avisivirus*, *Cardiovirus*, *Cosavirus*, *Dicpivirus*, *Enterovirus*, *Erbovirus*, *Gallivirus*, *Hepatovirus*, *Hunnivirus*, *Kobuvirus*, *Kunsagivirus*, *Limnipivirus*, *Megrivirus*, *Mischivirus*, *Mosavirus*, *Oscivirus*, *Parechovirus*, *Pasivirus*, *Passerivirus*, *Potamipivirus*, *Rosavirus*, *Sakobuvirus*, *Salivirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Sicinivirus*, *Teschovirus* and *Tremovirus* [Adams M.J. et al. (2015), Knowles N.J. et al. (2012)]. Όσον αφορά τους εντεροϊούς, υπάρχουν δώδεκα διακριτά γένη με διάφορους ορότυπους ο καθένας (πίνακας 1.1.1.2)

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και απαρτίζεται από τους πολιοϊούς (3 ορότυποι), αλλά και από μη-πολιοϊοιούς: τους ιούς Coxsackie A (24 ορότυποι) και B (6 ορότυποι), τους Echo ιούς (33 ορότυποι) [Knipe and Howley, 2007], αλλά και άλλους εντεροϊούς που δεν έχουν ταξινομηθεί σε αυτές τις κατηγορίες, αλλά έχουν αριθμηθεί με βάση τη σειρά αναγνώρισής τους (εντεροϊοί 68-71). Με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη, με διάφορους

οροτύπους ο καθένας. Οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον πεπτικό σωλήνα, και είναι ανθεκτικοί στο χαμηλό pH.

Οι ιοί picorna είναι από τους πιο απλούς RNA ιούς, έχοντας ένα ισχυρά δομημένο καψίδιο. Άσχετα από το μικρό και περιορισμένο τους μέγεθος, η εξέλιξη στους ιούς picorna οδηγεί στη δημιουργία ενός μεγάλου αριθμού εύκολα διακριτών μελών, των επονομαζόμενων αντιγονικών οροτύπων.

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων, αλλά και σε μικρότερο βαθμό με το φάσμα της νόσου. Ο ορότυπος προσδιορίζεται από τις συνδετικές θηλίες και τα C-τελικά άκρα των καψιδιακών πρωτεϊνών που περιβάλλουν την εξωτερική επιφάνεια του ιοσωμάτιου. Αυτά περιλαμβάνουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού. Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς coxsackie A ή B και ιούς echo, η οποία έγινε αρχικά βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί coxsackie A) – σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντι-ορών.

**Πίνακας 1.1.1.2:** Νέα ταξινόμηση των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποί τους (Πηγή: ICTV-2013)

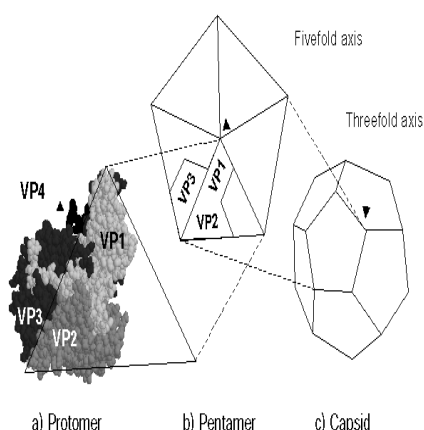
Γένος Εντεροϊών	Αριθμός Οροτύπων
<i>Enterovirus A</i>	25
<i>Enterovirus B</i>	61
<i>Enterovirus C</i>	23
<i>Enterovirus D</i>	5
<i>Enterovirus E</i>	4
<i>Enterovirus F</i>	6
<i>Enterovirus G</i>	11
<i>Enterovirus H</i>	1
<i>Enterovirus J</i>	6
<i>Rhinovirus A</i>	80
<i>Rhinovirus B</i>	32
<i>Rhinovirus C</i>	54



Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διακρίνει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [Flanengan *et al.*, (1977), Racaniello V (2007)].

### 1.1.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Τα ιοσωμάτια του εντεροϊού είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα ιοσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητά τους είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες [Melnick JL (1990)]. Οι εντεροϊοί είναι σταθεροί σε όξινο περιβάλλον και διατηρούν τη μολυσματικότητά τους σε τιμές pH 3 και μικρότερες.



Τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις αρχές δόμησης των ιών [Caspar DL, Klug A. (1962)], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [Rueckert RR (1969)]. Η αντίληψή μας για την δομή των

**Εικόνα 1.1.2.1:** Απεικόνιση αξόνων συμμετρίας για το σχηματισμό εικοσαεδρικού καψιδίου στους *Picornia* ιούς [Ruecker (1996)]

βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους οδήγησε στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [Rueckert RR (1969)]. Η αντίληψή μας για την δομή των

πολιοϊών έκανε ένα μεγάλο άλμα το 1985 όταν οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 καθορίστηκαν μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών X [Hogle JM et al (1985)].

Ο βασικός λίθος του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Το κέλυφος σχηματίζεται από την VP1 έως τη VP3 και η VP4 υπάρχει στην εσωτερική επιφάνεια [Stanway G. 1990]. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία αλληλουχική ομολογία, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελιού. Η περιοχή αυτή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β'-φύλλα. Το ένα β'-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας και το δεύτερο, που έχει μια κάμψη στο κέντρο, σχηματίζει τόσο τον «τοίχο» όσο και το «πάτωμα» της γωνίας. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β'-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο επαφών πρωτεΐνης-πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Το δίκτυο αυτό, που σχηματίζεται από τις N-τελικές προεκτάσεις των VP1, VP2, VP3 και VP4, είναι απαραίτητο για την σταθερότητα του ιοσωματίου. Η VP4 διαφέρει σημαντικά από τις άλλες τρεις πρωτεΐνες στο ότι παρουσιάζει μια εκτεταμένη διαμόρφωση. Η πρωτεΐνη αυτή είναι παρόμοια στη θέση και τη διαμόρφωση με τις N-τελικές αλληλουχίες των VP1 και VP3 και λειτουργεί σαν μια αποσπώμενη N-τελική επέκταση της VP2 παρά σαν μια ανεξάρτητη πρωτεΐνη του καψιδίου. Περαιτέρω τροποποίηση του N-τελικού άκρου της VP4, έχει προταθεί στην συμβολή στην προσκόλληση του ιού σε κυτταρικούς υποδοχείς, στην αποδιάταξη του καψιδίου, την απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον αλλά και στη δημιουργία του καψιδίου, κατά τη συγκρότηση του ώριμου πλέον ιού (εικόνα 1.1.2.2).

Οι κύριες δομικές διαφορές μεταξύ των VP1, VP2 και VP3 οφείλονται στους βρόγχους που συνδέουν τα β'-strands και τις N- και C-τελικές αλληλουχίες που εξέχουν της περιοχής του β'-βαρελιού. Αυτές οι αμινοξικές αλληλουχίες δίνουν σε κάθε *picorna* ιό την ξεχωριστή μορφολογία και αντιγονικότητα. Τα C-τελικά άκρα βρίσκονται στην επιφάνεια του ιοσωματίου και τα N-τελικά στο εσωτερικό του, δείχνοντας ότι προκύπτουν σημαντικές αναδιατάξεις του P1 προδρόμου κατά τον πρωτεολυτικό τεμαχισμό. Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Στους πολιοϊούς έχουν αναγνωριστεί τέσσερις

αντιγονικές θέσεις , οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIΑ και N-AgIIIΒ. **[Σφάλμα! Το αρχείο προέλευσης της αναφοράς δεν βρέθηκε. (1999)].**

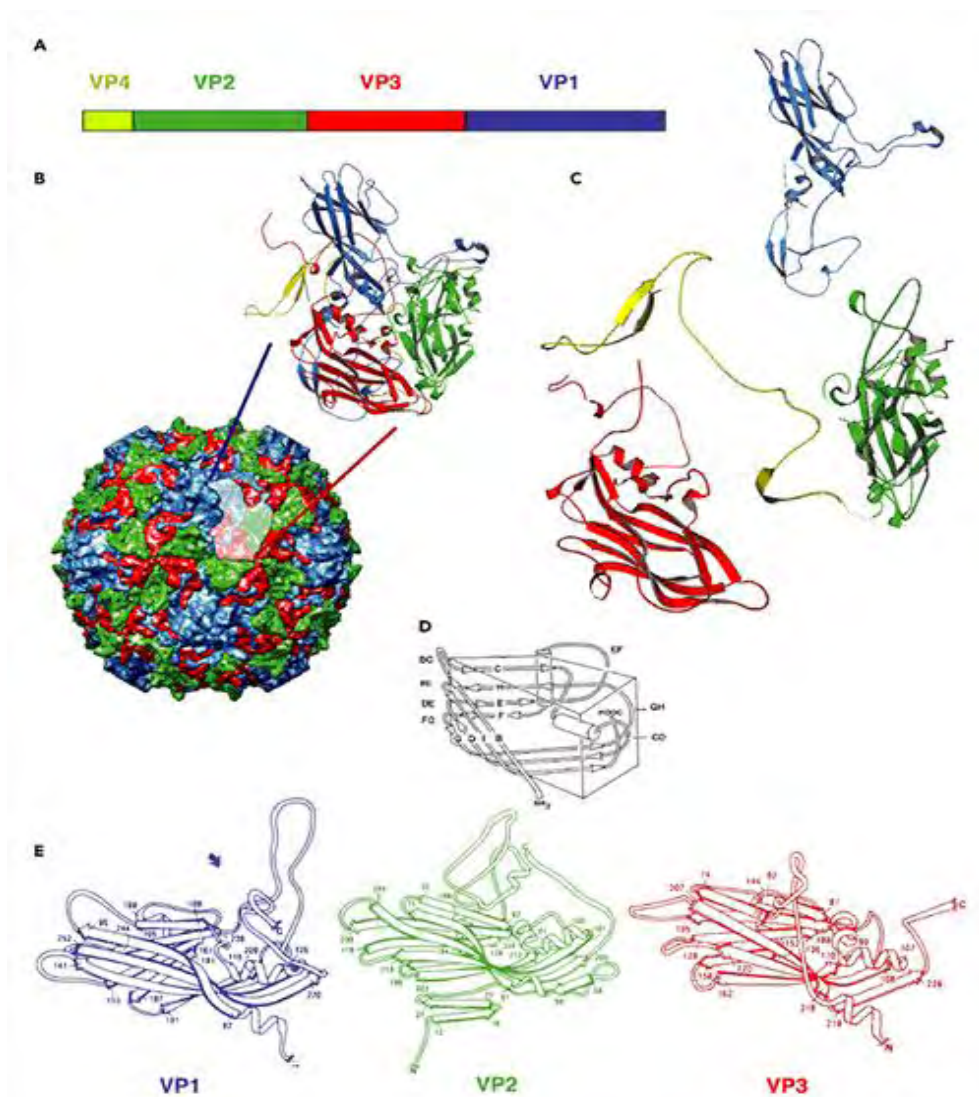
- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.
- Η N-AgIIIΑ αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIIIΒ από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.

Σχετικά με την επιφάνεια του ιοσωματίου ανάλυση των δομών των πολιοϊών αποκάλυψε ότι έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή, βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενος από μία αυλάκωση (canyon) και ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας. Η αύλακα αυτή που βρίσκεται σε σταθερή ακτίνα γύρω από τον άξονα πενταπλούς συμμετρίας και στα πλάγια της βρίσκονται τμήματα των VP1, VP2 και VP3, αποτελεί την θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς και είναι αρκετά μικρή, ώστε να αποφευχθεί η προσκόλληση των ογκωδών αντισωμάτων.

Στο εσωτερικό των ιοσωμάτων, στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα πέντε μορίων της VP3 πρωτεΐνης σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β'-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β'φύλλων σχηματισμένα από το N-τελικό άκρο των VP4 και VP1. Η ομάδα του μυριστικού οξέος συνδεδεμένη στο N-άκρο της VP4 επάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ των δυο αυτών δομών [Chow M. et al (1987)]. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται από ένα πλέγμα β'-φύλλων, που συντίθεται από τέσσερα β'-πλέγματα του VP3 βαρελιού και ένα πλέγμα από το N-άκρο της VP1 που περιβάλλει ένα διπλό πλέγμα β'-φύλλου του N-άκρου της VP2 ενός γειτονικού πενταμερούς [Filman DJ et al (1989)].

Έχει προταθεί ότι τα καψίδια των Picorna ιών σταθεροποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων με το γενωμικό RNA, πρόταση βασιζόμενη σε ευρήματα με τον ιό bean pod, ο οποίος σχετίζεται με τους ιούς picorna [Chen ZG et al (1989)]. Ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με την διάταξη του RNA των ιών Picorna. Μελέτες που αφορούσαν την ατομική δομή του πολιοϊού P2, έδειξαν ότι οι βάσεις του RNA, αλληλεπιδρούν με συντηρημένα αρωματικά κατάλοιπα της VP4 [Lentz

KN. et al (1997)]. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να παίζει ένα ρόλο στην σταθερότητα του καψιδίου ή την απέκδυση.



**Εικόνα 1.1.2.2:** Δομικά χαρακτηριστικά των εντεροϊών.

A. Η οργάνωση των δομικών πρωτεϊνών στο γένωμα του ιού.

B. Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου του πολιοϊού, όπου φαίνεται το πακετάρισμα των VP1, VP2 και VP3 πρωτεϊνών. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου.

C. Τρισδιάστα μοντέλα των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4.

D. Διάγραμμα που απεικονίζει το πώς τα οχτώ β'-πλέγματα κάθε πρωτεΐνης σχηματίζουν μια σφηνοειδή δομή με βρόγχους που συνδέουν τα πλέγματα μεταξύ τους.

E. Διάγραμμα τύπου ribbon των VP1, VP2 και VP3 όπου φαίνεται η κοινή δομή β'-βαρελίου.

### 1.1.3 Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος

Το γένωμα των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας RNA, μήκους περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων [Melnick J.L., 1990]. Το ιικό RNA είναι μολυσματικό καθώς μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο με σκοπό να παράγει όλες τις ικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το RNA των εντεροϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο( πλούσιο σε G+C) με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [Flanegan JB et al (1977), Lee YF et al (1977)].

Η VPg διαφορετικών picorna ιών ποικίλλει σε μέγεθος από 22-24 κατάλοιπα αμινοξέων και κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιϊκό γονίδιο. Η VPg είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με το 5'-ουριδυλιωμένο τμήμα του ιικού RNA με δεσμό O<sub>4</sub>-(5'-ουριδύλιο)-τυροσίνης. 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 ιικό RNA μόνο στην έλλειψη της VPg. Τα ιικά mRNA που αλληλεπιδρούν με τα κυτταρικά ριβοσώματα δεν φέρουν τη VPg πρωτεΐνη, αλλά περιέχουν μόνο ουριδινο-5'-φωσφορικό (pU) στα 5' άκρα τους. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [Nomoto A, et al (1977), Pettersson RF. et al (1978)].

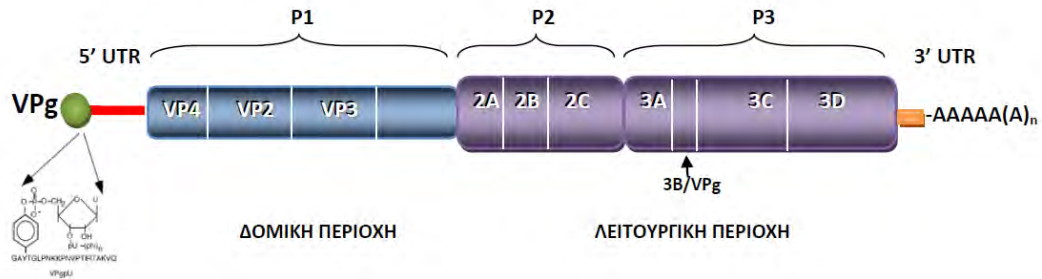
Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας απεκάλυψε αρχικά ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μακριές και υψηλά δομημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος, ενώ η ύπαρξη δευτεροταγούς δομής φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητα του RNA. Η 5' μη-κωδική περιοχή περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNA με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [Racaniello V. (2007)].

Βιοχημικές μελέτες που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες [Summers DF, Maizel JV (1968)]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του

γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ιικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [Kitamura N. et al (1981)]. Παρόμοια στρατηγική γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιείται κατά την αντιγραφή όλων των picornaviruses. Η αρχική πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά την μετάφραση, έτσι ώστε το πλήρες προϊόν να μην εμφανίζεται. Ο τεμαχισμός γίνεται από πρωτεΐνάσες που κωδικοποιούνται από το ιικό γένωμα για να αποδώσουν στο τέλος 11 με 12 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα πρόδρομα ατεμάχιστα μόρια έχουν επίσης ορισμένες λειτουργίες κατά την αντιγραφή.

Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις περιοχές: P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιικού καψιδίου, ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία ( $2^{Apro}$ ,  $3C^{pro}$ ,  $3CD^{pro}$ ) και την αντιγραφή του γενώματος ( $2B$ ,  $2C$ ,  $3AB$ ,  $3B^{VPg}$ ,  $3CD^{pro}$ ,  $3D^{pol}$ ), ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από την περιοχή που κωδικοποιεί για τις δομικές-καψιδιακές πρωτεΐνες. (εικόνα 1.1.3.2)

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια, και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA [Jacobson SJ et al (1993)]. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA [Oberste et al.,(2006)]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [Brown DM. et al (2005), Todd S. et al (1997)]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρει μια πολύ(A) ουρά [Yogo Y, Wimmer E. (1972)]. Το αρνητικής πολικότητας RNA φέρει μια 5' πολύ(U) ουρά, η οποία αντιγράφεται για να σχηματίσει την πολύ(A) του θετικού κλώνου [Yogo Y. et al (1974)]. Ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η πολύ(A) ουρά δεν είναι πια μολυσματικό [Spector DH, Baltimore D. (1974)].



**1.1.3.2:** Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Διάγραμμα του ιικού RNA γενώματος, με την VPg πρωτεΐνη στο 5' άκρο, το 5'UTR, τα γονίδια των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών, την 3' UTR και την πολύ(A) ουρά. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα τις περιοχές P1, P2 και P3. Η P1 κωδικοποιεί τις δομικές περιοχές του ιού, ενώ οι P2 και P3 τις λειτουργικές περιοχές [De Jesus, (2007)].

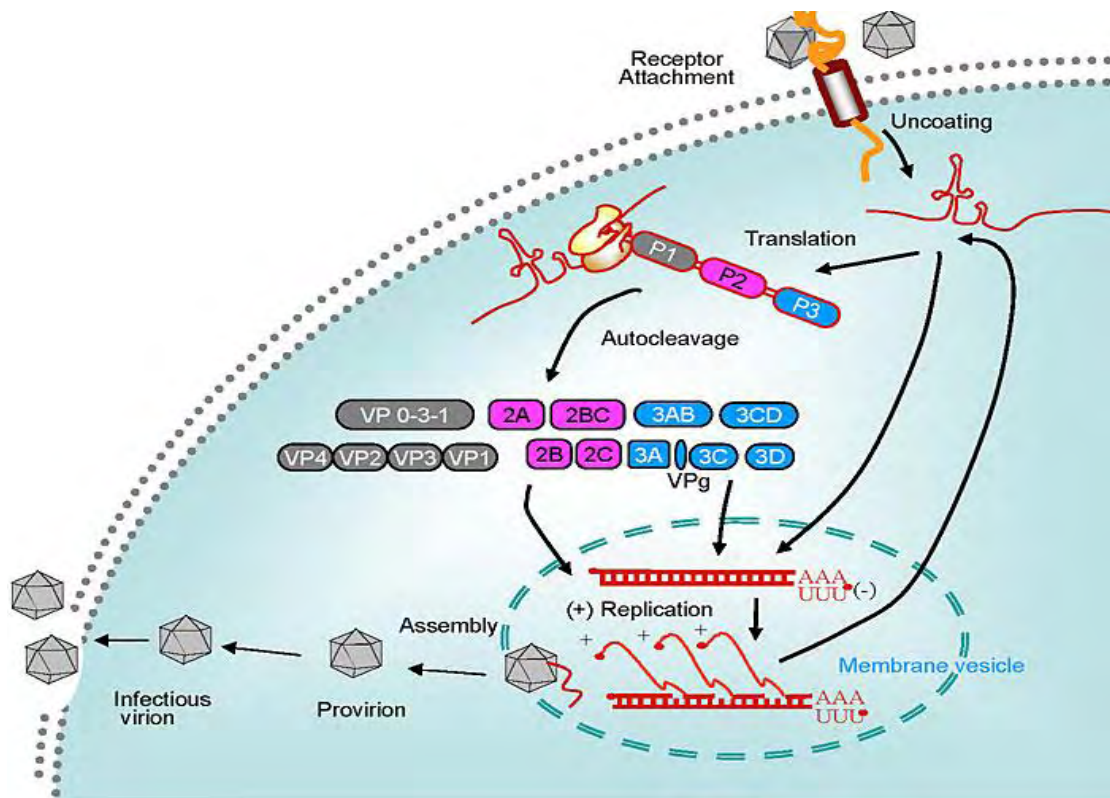
## 1.2 ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η αντιγραφή των εντεροϊών πραγματοποιείται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων. Το πρώτο βήμα είναι η σύνδεση σε ένα κυτταρικό υποδοχέα. Στη συνέχεια, το RNA απεκδύεται, μια διαδικασία που περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο. Μόλις, το θετικής πολικότητας ιικό RNA (λειτουργεί απευθείας ως mRNA), εισέλθει στο κυτταρόπλασμα, μεταφράζεται με σκοπό να παραχθούν ικές πρωτεΐνες απαραίτητες για την αντιγραφή του ιικού γενώματος και την παραγωγή νέων ιοσωματίων. Οι ικές πρωτεΐνες συνθέτονται από μια πρόδρομη πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται κατά την σύνθεσή της. Οι τεμαχισμοί γίνονται κυρίως από δύο ικές πρωτεΐνες: την 2A<sup>pro</sup> και την 3C<sup>pro</sup> ή 3CD<sup>pro</sup>. Μεταξύ όλων των πρωτεϊνών που συντίθενται είναι και η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 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 RNA κλώνο (ενδιάμεσο μορίο). Το βήμα αυτό ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων θετικών κλώνων, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το νεοσυντιθέμενο RNA αρνητικής πολικότητας. Πρόκειται για ένα σημαντικό βήμα στον κύκλο ζωής του ιού, που τον καθιστά ικανό για περαιτέρω μόλυνση. Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε μικρά μεμβρανικά κυστίδια που επάγονται από αρκετές ικές πρωτεΐνες. Όταν πλέον ο αριθμός των πρωτεϊνών του καψιδίου είναι αρκετός, αρχίζει η καψιδίωση. Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 τεμαχίζεται ώστε να παράγει ένα ανώριμο πρωτομερές, το οποίο στη συνέχεια συγκροτείται σε πενταμερή, σχηματίζοντας τελικά το εικοσαεδρικό καψίδιο. Τα νέο-συντεθειμένα, θετικής πολικότητας RNA εισέρχονται στα καψίδια με τα πενταμερή και σχηματίζουν το μολυσματικό ιό. Τελευταίο στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού έχει η έξοδος του από τον κύτταρο ξενιστή, μέσω της διαδικασίας της λύσης.

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, το κύτταρο ξενιστή και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [Racaniello V. (2007)].

Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια (εικόνα 1.2.1.1):





**Εικόνα 1.2.1.1:** Σύνοψη του κύκλου ζωής του εντεροϊού. Σύνδεση σε κυτταρικό υποδοχέα (1), είσοδος και απέκδυση του ιικού γενώματος (2). Αφαιρείται η VPg από το ιικό RNA, το οποίο στη συνέχεια μεταφράζεται (3). Η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη σύνδεσή της και παράγονται οι μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (4). Η σύνθεση του RNA γίνεται σε μεμβρανικά κυστίδια. Ο ιικός (+) 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 σωμάτια απελευθερώνονται από το κύτταρο με λύση (9) [Hober et al., (2013)].

### 1.2.1 Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο.

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων μέσω της προσκόλλησής τους σε έναν ή περισσότερους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή. Οι ιοί έχουν προσαρμοστεί εξελικτικά για να χρησιμοποιούν τους υποδοχείς του κυττάρου, ως σημεία εισόδου στο κυτταρικό περιβάλλον. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [Mendelsohn CL et al (1989)]. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με συντηρημένα αμινοξέα των VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη «αυλάκωση» και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [Rossman *et al.* (2002)]. Παρόλα αυτά, η ύπαρξη και αλληλεπίδραση του ιού με τον υποδοχέα δεν καθιστά πάντα δυνατή την είσοδό του μέσα στο κύτταρο. Σε αυτή την περίπτωση απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου πρωτεϊνικού μορίου, του συνυποδοχέα.

Πολλοί τύποι μορίων κυτταρικής επιφάνειας λειτουργούν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους *picorna* ιούς, όπου και μερικοί μοιράζονται μεταξύ μελών άλλων οικογενειών. Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει επίσης, εν μέρει, την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών απεκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπεροικογένειας των ανασοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών [Koike S. et al (1991), Racaniello VR., Baltimore D. (1992)]. Μοντέλα των συμπλόκων πολιοϊών-PVR που παρήχθησαν από δεδομένα κρυοηλεκτρονικής μικροσκοπίας δείχνουν ότι η πρώτη περιοχή έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ιού.

Οι αύλακες στο καψίδιο των πολιοϊών περιλαμβάνουν τις θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς. Οι αύλακες αυτές είναι πάρα πολύ

βαθιές ώστε να μην επιτρέψουν τη διείσδυση αντισωμάτων. Αυτό το φυσικό εμπόδιο πιστεύεται ότι κρύβει αμινοξέα, κρίσιμα για δέσμευση από το ανοσοποιητικό σύστημα του υποδοχέα. Μεταλλάξεις στα αμινοξέα που σχηματίζουν την αύλακα μπορούν να αλλάξουν την συγγένεια σύνδεσης με τους υποδοχείς [Colston E, Racaniello VR. (1994), Colston EM, Racaniello VR. (1995), Harber J. et al (1995), Liao S, Racaniello V. (1997)]

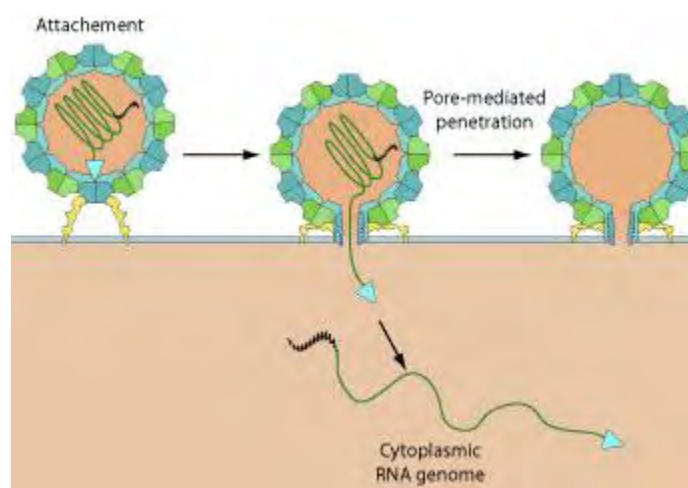
Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του οδηγεί σε μείζονες δομικές αλλαγές του ιού. Τα επακόλουθα σωματίδια που ονομάζονται *altered* ή *σωμάτια A*, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική πρωτεΐνη του καψιδίου VP4. Επιπροσθέτως, το N-άκρο της VP1, που συνήθως βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται πλέον στην επιφάνεια του σωματίου A [Fricks CE, Hogle JM (1990)]. Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα. Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του πολιοϊού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση του πολιοϊού που οδηγούν στην απέκδυσή του επάγονται από τον PVR [Racaniello V. (2007)].

Δεν είναι γνωστό εάν η VP4 που απελευθερώνεται από το ιικό καψίδιο εγκαταλείπει το κύτταρο ή συμμετέχει στο σχηματισμό του πόρου. Είναι όμως ξεκάθαρο ότι η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται στα αρχικά στάδια της εισόδου του ιού στο κύτταρο. Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η αποτελεσματικότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ των εντεροϊών και του PVR καθορίζεται, εν μέρει, από την αλληλουχία των αμινοξέων των αντιγονικών περιοχών και πιθανώς από την χωροταξική διαμόρφωση των αμινοξέων που βρίσκονται προσκείμενα σε αυτές τις περιοχές.

Αξίζει να σημειωθεί, πως πολλοί από τους ιούς αυτούς χρησιμοποιούν συστήματα σηματοδότησης του κυττάρου-ξενιστή για την ενεργοποίηση σε συνυποδοχείς, την επαγωγή ενδοκυτταρικών αποκρίσεων αλλά και την επαγωγή ενδοκυτταρικών συνθηκών, ευνοϊκών για την μόλυνση. Η σηματοδότηση που ξεκινά στην κυτταρική μεμβράνη πιθανότατα μπορεί να συνεχίσει σε κυτταροπλασματικά

οργανίδια (πχ ενδοσώματα) [Kew O. et al (1993)]. Ανάλογα με τον ιό, τους υποδοχείς και το κύτταρο-ξενιστή, η αρχική σύνδεση στους υποδοχείς μπορεί να οδηγήσει σε ενεργοποίηση κινασών τυροσίνης ή άλλων κινασών, οι οποίες με τη σειρά τους, θα εκκινήσουν καταρράκτες αποκρίσεων στην πλασματική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα [Pelkmans L. et al (2004), Greber UF (2002), Tagawa A. et al (2005)]. Η επαγόμενη από τον ιό σηματοδότηση εξαρτάται από δεύτερους αγγελιαφόρους (phosphatidylinositides, διακυλογλυκερίδια, και ασβεστίου), και άλλους ρυθμιστές της μεταφοράς διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Πολλοί από τους ιούς αυτής της κατηγορίας χρειάζονται μόνο την ύπαρξη ενός υποδοχέα για την είσοδό τους εντός της κυτταρικής μεμβράνης, ενώ παράλληλα, για την είσοδο άλλων απαιτείται η παρουσία ενός δεύτερου μορίου, που ονομάζεται συνυποδοχέας. Για παράδειγμα, μερικοί από τους Coxsackieviruses B χρησιμοποιούν ως συνυποδοχέα τους, τις ιντεγκρίνες, ενώ πολλοί echoviruses την μικροσφαιρίνη για την πιο γρήγορη είσοδό τους εντός του κυττάρου.



**Εικόνα 1.2.1.2:** Μοντέλο εισόδου των εντεροϊών στο κύτταρο. Το αρχικό ιοσωμάτιο προσδένεται στον PVR και υφίσταται μια αλλαγή στην διαμόρφωση επαγόμενη από τον υποδοχέα, η οποία οδηγεί στην παραγωγή των τροποποιημένων σωμάτων A. Το ιικό RNA εξέρχεται από το σωμάτιο από την πλασματική μεμβράνη ή διαμέσω των ενδοσωμάτων.[Viral Zone]

### 1.2.2 Μετάφραση του ιϊκού RNA και επεξεργασία της ιϊκής πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση. 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 V, Baltimore D. (1980)]. Η αλληλούχιση του θετικού κλώνου του πολιοϊού αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [Kitamura N. et al (1981), Racaniello VR, Baltimore D. (1981)], κάτι που αργότερα βρέθηκε και σε άλλους picornaviruses, δείχνοντας και την ύπαρξη υψηλά δομημένων RNA-δομών [Rivera *et al.*, (1988), Skinner *et al.*, (1989)]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος *IRES* (*Internal Ribosome Entry Site*).

Τα IRES των ιών έχουν κατηγοριοποιηθεί σε πέντε ομάδες με βάση ένα αριθμό κριτηρίων όπως: η αρχική αλληλουχία, η δευτεροταγής δομή, η τοποθεσία του κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα σε διάφορα κύτταρα. Μπορούμε να διακρίνουμε 2 τύπους IRES στους picorna ιούς. Τον τύπο I όπου ανήκουν οι εντεροϊοί και οι ρινοϊοί, τον τύπο II στον οποίο συγκαταλέγονται οι καρδοϊοί και αφθοϊοί. Στα τύπου I IRES το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50 με 100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES.

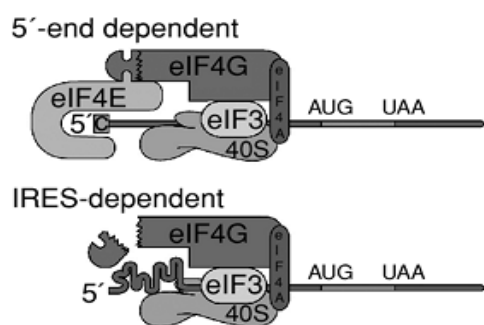
Η έναρξη της μετάφρασης μέσω του τύπου I IRES περιλαμβάνει τη σύνδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας στο IRES και την ανίχνευση του κωδικονίου έναρξης. Η 40S υπομονάδα μπορεί να συνδεθεί απ' ευθείας στο RNA, ή στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με μεταφραστικές πρωτεΐνες έναρξης. Στην δεύτερη περίπτωση, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με την eIF3 συνδεδεμένη στην C- τελική περιοχή της eIF4G, που συνδέεται απευθείας στο IRES (εικόνα 1.2.2.1).

Υπάρχει μία μικρή διατήρηση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μεταξύ των IRES. Τα IRES των picorna ιών περιέχουν εκτεταμένες περιοχές δευτερεύουσας

δευτεροταγούς δομής του RNA, που δεν είναι αυστηρά συντηρημένες μεταξύ των εντεροϊών αλλά είναι ζωτικής σημασίας για τη δέσμευση του ριβοσώματος. Ένα μοτίβο που είναι συντηρημένο μεταξύ των IRES των picorna ιών, είναι μία αλληλουχία GNRA (G, γουανίνη N, οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο R, πουρίνη A, αδερίνη) στη θηλεία IV του τύπου I. Ένα άλλο συντηρημένο στοιχείο είναι ένα μοτίβο YN-Xm-AUG, στο οποίο η Yn είναι μία περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνη και το Xm είναι ένα διάστημα (spacer) 15 έως 25 νουκλεοτιδίων που ακολουθείται από ένα κωδικόνιο AUG.

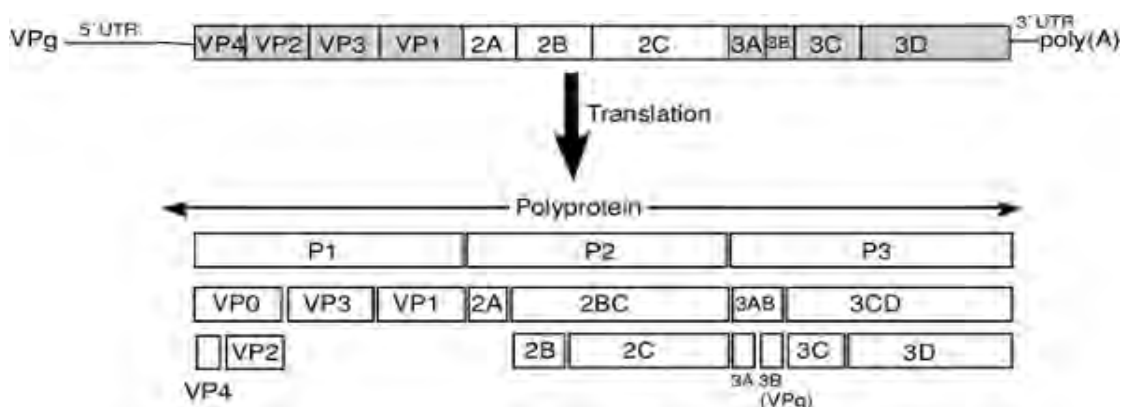
Οι πρωτεΐνες των εντεροϊών συνθέτονται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται από ενδομοριακές αντιδράσεις (*in cis*) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες *in cis* ή *in trans* (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για τρεις πρωτεϊνάσες: την Lpro, την 2A<sup>pro</sup> και την 3C<sup>pro</sup> ή 3CD<sup>pro</sup> [Racaniello V. (2007)].

Σε μολυσμένα με εντεροϊό κύτταρα ο αρχικός τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης μεταξύ P1 και P2 γίνεται από την 2A<sup>pro</sup>. Διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες πρωτεολύονται από την 2A<sup>pro</sup>, όπως οι eIF4GI, eIF4GII και Pabp. Στην πρόδρομη πρωτεΐνη των εντεροϊών, η θέση τεμαχισμού για την 2A<sup>pro</sup> είναι μεταξύ της τυροσίνης και της γλυκίνης. Η 3C<sup>pro</sup> είναι η πρωτεΐνάση που κάνει τον αρχικό τεμαχισμό μεταξύ 2C και 3A περιοχής. Σε αντίθεση με την 2A<sup>pro</sup>, η 3C<sup>pro</sup> τεμαχίζει και σε δεύτερο στάδιο τα P1 και P2 πρόδρομα μόρια. Η 3C<sup>pro</sup> των εντεροϊών τεμαχίζει μόνο διπεπτίδια Gln-Gly.



**Εικόνα 1.2.2.1:** Μοντέλα σχηματισμού συμπλόκων έναρξης της μετάφρασης. Πάνω φαίνεται η 5'-καλύπτρα- εξαρτώμενη έναρξη ενώ κάτω φαίνεται η IRES-εξαρτώμενη έναρξη της μετάφρασης. Το eIF3-40S σύμπλοκο στρατολογείται στο RNA μέσω αλληλεπίδρασης του eIF4G με το IRES. [Knipe DM, Howley PM. (2007)]

Τόσο η  $3C^{pro}$  όσο και η  $2A^{pro}$  είναι ενεργές στο πολυπεπίδιο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από την πολυπρωτεΐνη με αυτό-τεμαχισμό. Αφού απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Ο αρχικός τεμαχισμός στον καταρράκτη επεξεργασίας της πολυπρωτεΐνης ξεκινάει με την απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της  $2A^{pro}$ . Στη συνέχεια η  $3CD^{pro}$  απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Η πρωτεΐνη αυτή, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ιικής RNA πολυμεράσης, κάνει δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την  $3C^{pro}$ . Τόσο η  $3C^{pro}$  όσο και η  $3CD^{pro}$  επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την  $3CD^{pro}$ , 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 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η  $3D^{pol}$  αλληλουχία μέσα στην  $3CD^{pro}$  απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το  $3C^{pro}$  μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Η παρουσία πολλαπλών δράσεων σε μια μοναδική πρωτεΐνη δεν υπάρχει στις ευκαρυωτικές πρωτεΐνες και είναι ένα παράδειγμα του πως η χωρητικότητα των μικρών ικών γενωμάτων μπορεί να μεγιστοποιηθεί [Racaniello V. (2007)].



**Εικόνα 1.2.2.2:** Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης. Ο τεμαχισμός της αρχικής πολυπρωτεΐνης αρχικά σε τρεις περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού. [Knipe DM, Howley PM. (2007)]

### 1.2.3 Αντιγραφή του ιικού RNA

Με την ολοκλήρωση της μετάφρασης του ιικού γενώματος και την έκφραση των ιικών γονιδίων, το ικό RNA χρησιμεύει σαν μήτρα για την παραγωγή ενός συμπληρωματικού μορίου RNA(-) πολικότητας, το οποίο χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για τη σύνθεση πολλών νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας της θυγατρικής γενιάς [Murray and Barton, (2003)]. Ένα απλό μοντέλο της αντιγραφής θα μπορούσε να είναι το εξής: ικό RNA(+)→σύνθεση RNA(-)→RF→ σύνθεση RNA(+)->RI-> RNA(+) όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη. Η

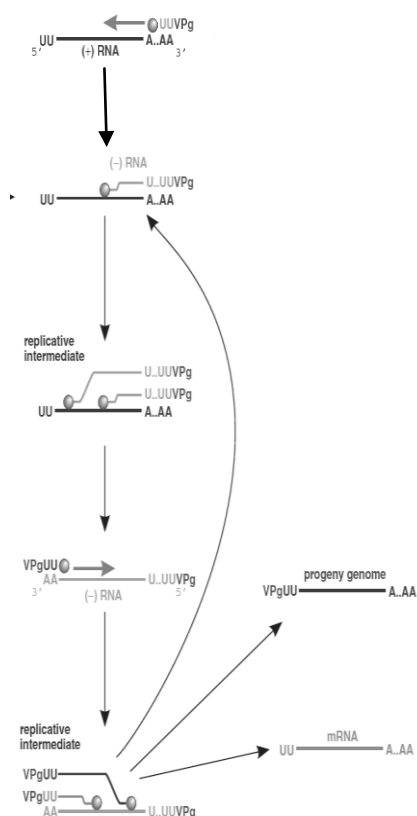
σύνθεση των θετικών κλώνων είναι σχεδόν 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [Giachetti C, Semler BL (1991), Novak JE, Kirkegaard K. (1991)].

Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση της αντιγραφής είναι η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Η RNA πολυμεράση του ιού ( $3D^{pol}$ ) παράγεται έπειτα από τεμαχισμό της πρόδρομης πρωτεΐνης  $3CD^{pro}$ , η οποία είναι άκρως δραστική ως πρωτεϊνάση αλλά δεν έχει δράση πολυμεράσης (εικόνα 1.2.3.1).

Η 3D<sup>pol</sup> είναι ένα ένζυμο που εξαρτάται από εκκινητή. Σε πειράματα *in vitro* η 3D<sup>pol</sup> δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινητή. Τον ρόλο του εκκινητή στους εντεροϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι

**Εικόνα 1.2.3.1:** Ο μηχανισμός συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο αντιγραφής του ιικού RNA.

5'-άκρο τον νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών [Rieder E. et al (2000), Paul AV. et al (2000),

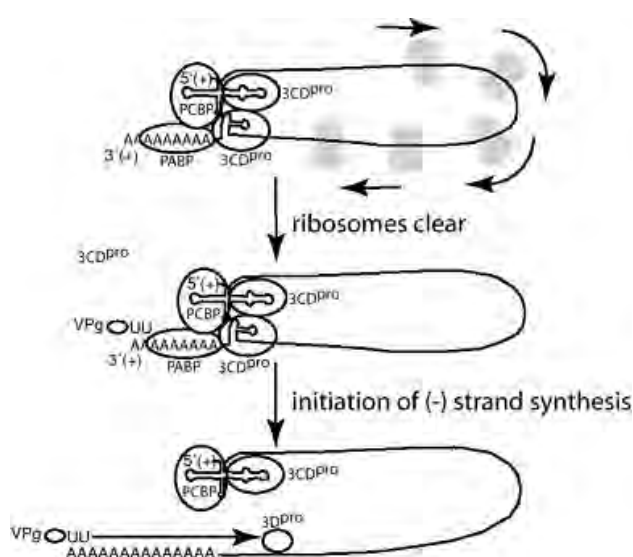




Yin J et al. (2003)]. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η cre-εξαρτώμενη ουριδιλίωση της VPg γίνεται μόνο κατά τη σύνθεση των θετικών κλώνων και όχι στη σύνθεση των αρνητικών [Morasco BJ. et al (2003), Murray KE, Barton DJ. (2003)].

Η σύνθεση του ιικού γενώματος γίνεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων ξενιστών. Μία μόλυνση με εντεροϊό οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδοκυτταρικών μεμβρανών των μολυσμένων κυττάρων. Έτσι το ΕΔ και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται κατά τη διαδικασία αυτή και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια διπλής μεμβράνης [Schlegel A. et al (1996)]. Η ιική σύνθεση του RNA γίνεται στην επιφάνεια των κυστιδίων αυτών [Cho MW et al (1994), Egger D. et al (2000)]. Ο μεμβρανικός εντοπισμός των ιικών πρωτεϊνών αντιγραφής του RNA διασφαλίζει υψηλές τοπικές συγκεντρώσεις των συστατικών της αντιγραφής, αυξάνοντας τα επίπεδα δραστηριότητας των αντιδράσεων της αντιγραφής.

Τουλάχιστον δύο ικές πρωτεΐνες, η 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την  $3D^{pol}$  και την  $3CD^{pro}$ , στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [Echeverri AC. et al (1995)].

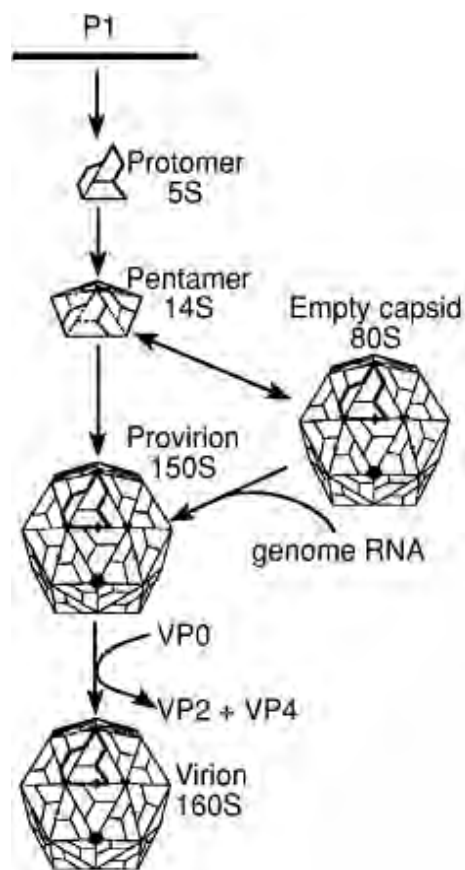


**Εικόνα 1.2.3.2:** Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου. Οι ικές πρωτεΐνες  $3CD^{pro}$ , VPg, PABP και PCBP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με τα άκρα του RNA, σχηματίζοντας ένα κυκλικό RNP. Κατά την αναστολή της μετάφρασης, αρχικά, απομακρύνονται τα ριβοσώματα από το ικό RNA. 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  $3D^{pol}$ . [Knipe DM, Howley PM. (2007)]

Το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας RNA. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή και των δυο διαδικασιών, δηλαδή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει, τότε το RNA αντιγράφεται και τότε μεταφράζεται. Στο μοντέλο αυτό, στις αρχές της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (*PCBP*-βοηθητική κυτταρική πρωτεΐνη) στην δομή αυτή επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CD<sup>pro</sup> συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει την μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα [Gamarnik AV, Andino R. (1998)].

#### 1.2.4 Καψιδίωση και απελευθέρωση νέων ιικών σωματιδίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, της πρόδρομης καψιδιακής πρωτεΐνης, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Όταν η P1 απελευθερώνεται από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 τεμαχίζονται από την πρωτεΐνάση 3CD<sup>pro</sup>. Αυτές οι θέσεις τεμαχισμού βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελίων. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο της VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο τους βρίσκεται στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Η επεξεργασία αυτή παράγει το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δηλαδή δομική μονάδα αποτελούμενη από ένα αντίγραφο των VP0, VP3 και VP1. Πέντε πρωτομερή στη συνέχεια σχηματίζουν ένα πενταμερές.



**Εικόνα 1.2.4.1:** 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 ικά καψίδια 80S. Τέλος, το (+)RNA εισέρχεται στο καψίδιο και η VP0 τεμαχίζεται σε VP2+VP4 σχηματίζοντας έτσι το μολυσματικό 160S ιοσωμάτιο. [Wimmer E. (1996)]

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τον τεμαχισμό των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνωση που πραγματοποιεί αυτόν τον τελευταίο τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που κόβεται βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και ώριμων ιοσωματίων και δεν είναι προσιτός σε ικές ή κυτταρικές πρωτεΐνες [Novak JE, Kirkegaard K. (1991)].

Η διαδικασία καψιδίωσης του εντεροϊού είναι πολύ ειδική, καταλήγοντας στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι των ικών mRNA, αρνητικών ικών RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [Nomoto A. et al (1977), Novak JE, Kirkegaard K. (1991)]. Επιπλέον μελέτες έδειξαν, ότι η καψιδίωση του ικού γονιδιώματος συνδέεται με τη σύνθεση του RNA, και θα μπορούσε να εξηγήσει γιατί μόνο τα RNA που περιέχουν VPg καψιδιώνονται.

Κατά τη σύνθεσή της, η P1 πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, συνδέεται με μυριστικό οξύ, σε ένα κατάλοιπο γλυκίνης στο αμινοξυτελικό άκρο της VP4 [Chow M. et al., (1987)]. Οι ομάδες μυριστικού, που

σχηματίζουν μέρος του δικτύου αλληλεπιδράσεων μεταξύ των υπομονάδων, όταν τα πρωτομερή συγκροτούνται σε πενταμερή, συγκεντρώνονται γύρω από τον πενταπλό άξονα συμμετρίας και σταθεροποιούν τον β-κύλινδρο που σχηματίζεται από τα αμινοξυτελικά άκρα πέντε αντιγράφων της VP3. Μεταλλάξεις υποδεικνύουν ότι οι ομάδες μυριστικού διαδραματίζουν ρόλο στη σταθεροποίηση των πενταμερών και έτσι των ικών σωματιδίων [Ansardi DC. et al., (1994), Marc D. et al., (1989), Moscufo N, Chow M. (1992)]

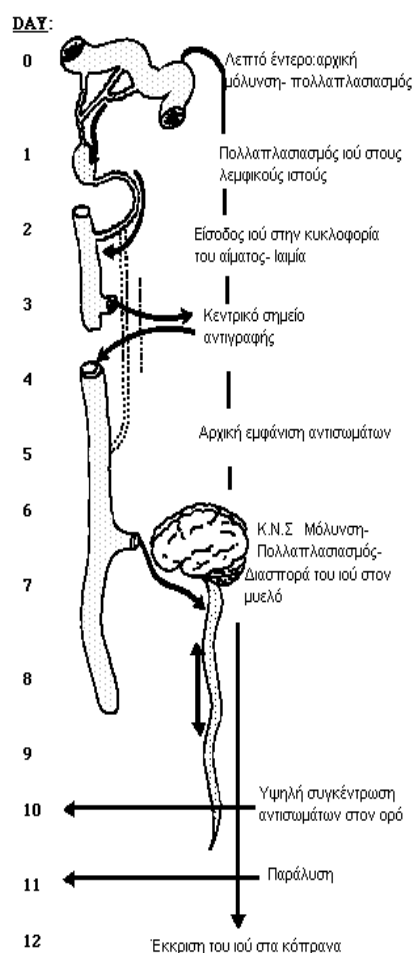
Κάτω από πειραματικές συνθήκες ο κύκλος ζωής των εντεροϊών είναι πολύ γρήγορος, καταλήγοντας στο θάνατο του κυττάρου ξενιστή. Είναι κοινώς αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [Tucker S.P. et al (1993)]. Όταν τα κύτταρα μολυνθούν παραγωγικά με εντεροϊό, αναπτύσσουν τις χαρακτηριστικές μορφολογικές αλλοιώσεις, γνωστές και ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Αυτές περιλαμβάνουν τη συμπύκνωση της χρωματίνης, τον πολλαπλασιασμό των μεμβρανώδων κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τη σταδιακή αποικοδόμηση ολόκληρου του κυττάρου.

### 1.3 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η ιική παθογένεια είναι η διαδικασία που λαμβάνει χώρα όταν ένας ιός μολύνει έναν ξενιστή. Μιλώντας για ιούς, αναφερόμαστε σε υποχρεωτικά ενδοκυτταρικά παράσιτα των ζωντανών κυττάρων και των ιστών. Τα κύτταρα που στοχεύονται από ιούς κατά την μόλυνση επιβιώνουν, διαφοροποιούνται, και λειτουργούν σε έναν ιστό που έχει μια περίπλοκη σχέση με άλλους ιστούς και φυσιολογικές διεργασίες στον ανέπαφο ξενιστή.

Η παθογένεση ως όρος αναφέρεται συχνά στην επαγωγή της ασθένειας από έναν ιό, παρά τη διαδικασία της μόλυνσης.

Η ιική παθογένεια είναι το ολοκληρωμένο αποτέλεσμα πολλών πολύπλοκων παραγόντων που είναι μοναδικοί για ένα συγκεκριμένο ιό, ένα συγκεκριμένο είδος, και ένα συγκεκριμένο ξενιστή. Η αλληλεπίδραση αυτών των παραγόντων καθορίζει την φύση της λοίμωξης, κατά πόσο μπορεί να οδηγήσει σε ασθένεια, αλλά και τη σοβαρότητα αυτής.



**Εικόνα 1.4.1:** Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών [Melnick JL (1990)]

Οι εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται στον λεμφικό ιστό του φάρυγγα και στο λεπτό έντερο και προκαλείται ιαιμία, που οδηγεί σε περαιτέρω πολλαπλασιασμό του ιού σε κύτταρα του ενδοθηλιακού συστήματος και τελικά στο όργανο-στόχο. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [Melnick JL. (1990)].

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπεται από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [G.Palacios and MS Oberste (2005)].

## 1.4 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Μελέτες της μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊνικών οξέων, προσφέρουν σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες.

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς:

- A. παρέχουν την ευκαιρία για αναμφισβήτητη ταυτοποίηση του στελέχους
- B. παρέχουν γνώσεις σχετικά με την κατάταξη των εντεροϊών και την ταξινόμησή τους
- Γ. διευκρινίζουν την προέλευση των κρουσμάτων.

Για τους εντεροϊούς, η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχιση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μόνο μεταξύ στενών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων άγριων στελεχών εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει

επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη των μοριακών μελετών [Rico-Hesse R. et al (1987)].

Η τεχνολογία αλληλούχισης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PV, όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης της πολιομυελίτιδας [Kew O. et al (1993), Kew OM et al (1995)]. Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των απομονώσεων σε μια επιδημία, και (γ) διαφορές μεταξύ των προϊόντων απομόνωσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση ενός ιού [Lipskaya G. et al (1995), Mulders MN et al (1995), Zheng DP. et al (1993)].

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες χρησιμοποιώντας την αλληλούχιση έχουν αναφερθεί για CVB1, CVB5, EV30, και EV71 [Brown BA et al (1999), Drebot MA et al (1999), Kopecka H. et al (1995), Oberste MS et al (1999)]. Οι γονότυποι του Echovirus 30 έχουν δείξει μία αλληλεπικαλυπτόμενη διαδοχή μεταξύ των απομονώσεων από τις Ηνωμένες Πολιτείες [Oberste MS et al (1999)].

Αντίθετα στην Ελλάδα, έχουν αναφερθεί διάφορα περιστατικά ανά περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, ένα από τα στελέχη που ευθύνονταν για τα περιστατικά της άσηπτης μηνιγγίτιδας το 2007 ήταν το E6 [Logotheti Maria et al (2007), Z.Kyriakopoulou et al (2011)]. Το 2001 ανιχνεύθηκαν τα στελέχη EV30/EV13/E7, που προκάλεσαν άσηπτη μηνιγγίτιδα, στην περιοχή της κεντρικής Ελλάδας. [Christine Kottaridi et al (2005), Nikolaos Siafakas et al (2004)].

## **1.5 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ**

Η γενετική αλλαγή είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την εξέλιξη. Οι μηχανισμοί οι οποίοι ευθύνονται για την μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των εντεροϊών είναι δύο: i) οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του ιικού RNA, αλλά και ii) ο μοριακός ανασυνδυασμός [Domingo E, Holland JJ. (1997)].

### **1.5.1 Μεταλλάξεις**

Με τον όρο μετάλλαξη αναφερόμαστε σε μία εντοπισμένη, συχνά κληρονομήσιμη μεταβολή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ενός νουκλεϊκού οξέος.

Οι μεταλλάξεις μπορεί να προκύψουν είτε από χημικές βλάβες στα ιικά γενώματα, είτε από διάφορα κυτταρικά ένζυμα (APOBEC), που μπορεί να εμπλέκονται σε κυτταρικές λειτουργίες επεξεργασίας και αποτελούν μέρος ενός έμφυτου μηχανισμού άμυνας έναντι των ιογενών λοιμώξεων [Sheehy AM et al (2002)].

Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων ( $4,5 \times 10^{-4}$  μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) οφείλεται στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ( $3D^{pol}$ ) η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα  $10^3$  έως  $10^4$  νουκλεοτίδια ανά κύκλο αντιγραφής και στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει ως συνέπεια την εξέλιξη των εντεροϊών και οδηγεί στην αντιγραφή τους κοντά στο όριο της καταστροφής [Wimmer E. *et al.*, (1993)]. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων οδηγεί και στην ύπαρξη πληθυσμών πολλών διαφορετικών γενοτύπων που χαρακτηρίζονται ως 'quasi-species' (περίπου είδη). Ο όρος αυτός έχει εισαχθεί για να περιγράψει το φαινόμενο της ύπαρξης μιας μεγάλης ομάδας συσχετιζόμενων γονιδιωμάτων, που έχουν γενικά μία κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους σε μία ή περισσότερες περιοχές [Domingo *et al.*, (1985)]. Αυτή η γενετική ετερογένεια επιτρέπει στους εντεροϊούς να προσαρμόζονται γρήγορα σε ένα νέο περιβάλλον.

Οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις αποτελούν τις συχνότερες μεταλλάξεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [Figlerowicz M. *et al.*, (2003)].

Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών (π. χ στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων). Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό

συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού. Επίσης, υπάρχουν διάφορα cis-acting γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ιική αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην ιική μετάφραση (IRES) και δέχονται ακόμα πιο μικρή εξελικτική πίεση. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο έχουμε διατήρηση χαρακτηριστικών δευτεροταγούς δομής μεταξύ διαφορετικών ιών, παρά τις νουκλεοτιδικές διαφορές τους (λόγω μεταλλάξεων).

Γενικά, μία μετάλλαξη μπορεί να μειώνει ή να αυξάνει την αρμοστικότητα του ιού για μία συγκεκριμένη οικολογική θέση ή να την αφήνει ανεπηρέαστη. Η εγκαθίδρυση μεταλλάξεων που παρέχουν ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι εύκολα κατανοητή στα πλαίσια της θετικής επιλογής του Δαρβίνου. Αντίθετα, μεταλλάξεις που παρέχουν ένα επιλεκτικό μειονέκτημα εξαλείφονται μέσω της αρνητικής επιλογής [Domingo E., Holland J.J (1997)].

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που ερμηνεύει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης των διαφόρων γενωμικών περιοχών ενός εντεροϊού είναι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών συνυπαρχόντων γενεαλογιών, ο οποίος όμως δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Η ευκολία με την οποία συμβαίνει ο ετεροτυπικός ανασυνδυασμός δείχνει ότι ο ομοτυπικός συμβαίνει ακόμα πιο συχνά [Cherkasova *et al.*, (2002)].

### 1.5.2 Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης από τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός [Guillot *et al.*, (2000)]. Με τον όρο ανασυνδυασμό αναφερόμαστε στον σχηματισμό νέων, ομοιοπολικά συνδεδεμένων συνδυασμών γενετικού υλικού προερχόμενα, είτε από δύο διαφορετικά πατρικά γενώματα, είτε από διαφορετικές πλευρές του ίδιου γενώματος. Πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μηχανισμό γενετικής ποικιλομορφίας, που συμβάλλει σε πολύ σημαντικές και κρίσιμες φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες των κυττάρων. Γενετικός ανασυνδυασμός έχει βρεθεί τόσο στους DNA όσο και στους RNA ιούς [Boehmer PE,



Nimonkar AV. (2003), King AMQ (1988), Nagy PD, Simon AE. (1997) , Domingo E. (2006) Plyusnin A. *et al.*, (2002)].

Μελέτες προσδιόρισαν ότι η ανταλλαγή γενετικών στοιχείων συμβαίνει με συχνότητα ισότιμη με αυτή της ενσωμάτωσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή, και επίσης ότι η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται από το βαθμό της ομολογίας μεταξύ των πατρικών RNA κλώνων και από την απόσταση μεταξύ των γενετικών δεικτών. In vivo μελέτες έδειξαν ότι το 10-20% των ιικών γενωμάτων μπορεί να υφίστανται γενετικό ανασυνδυασμό κατά τη διάρκεια ενός μόνο κύκλου αναδιπλασιασμού [Duggal *et al.*, (1997)]. Το ποσοστό του ανασυνδυασμού ποικίλλει μεταξύ των διαφόρων ιών.

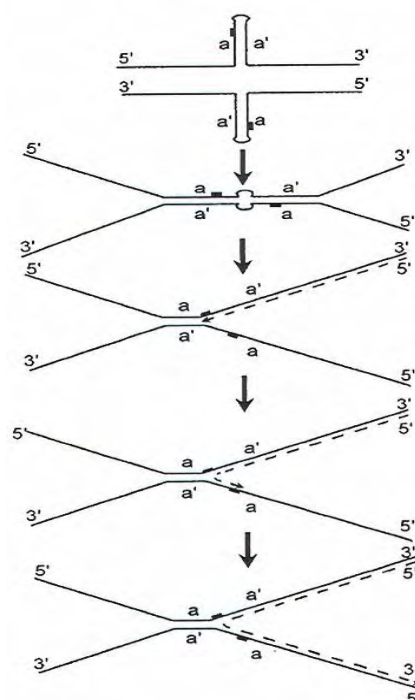
Η ικανότητα λειτουργίας της RNA-πολυμεράσης, οι αμινοξικές υποκαταστάσεις στο ένζυμο, η πρωτογενής ακολουθία του RNA αλλά και η ομολογία ακολουθίας μεταξύ του αρχικού κλώνου και του κλώνου-δέκτη επηρεάζουν την εμφάνιση ανασυνδυασμού στο ιικό RNA [G.Palacios and MS Oberste (2005)].

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επίσης, συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) [Kyriakopoulou *et al.*, (2010), Dedepsidis *et al.*, (2008), Kottaridi *et al.*, (2007)].

Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό:

#### **1.5.2.1 Αντιγραφικός Μηχανισμός ή Μηχανισμός Αλλαγής Μήτρας (replicative)**

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό το εκμαγείο αλλάζει κατά τη διάρκεια της αντιγραφής δηλαδή η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σε ένα ιικό RNA και ξαφνικά σταματά και συνεχίζει ξανά πάνω σε ένα άλλο ιικό RNA. Γι' αυτό το λόγο αυτός ο μηχανισμός είναι γνωστός και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch). Η ιική 3D πολυμεράση χρησιμοποιεί για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας σαν καλούπι τον κλώνο θετικής πολικότητας του ιού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός δίκλωνου μορίου RNA, γνωστό ως αντιγραφικό ενδιαμέσο. Ωστόσο κατά τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου η ιική πολυμεράση μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα την αποδέσμευσή της μαζί με τον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο αρνητικής πολικότητας, από τον θετικής που χρησιμοποιείται σαν καλούπι, τη δέσμευσή τους σε περιοχές υψηλής ομολογίας



**Εικόνα 1.5.2.1:** Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδυασμό μεταξύ RNA γενωμάτων. Οι μαύρες γραμμές αντιστοιχούν στα δύο RNA μόρια. Οι αυτοσυμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως *a* και *a'*. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντιθέμενο RNA μόριο [Ago/V.I. (1997)]

ενός διαφορετικού κλώνου θετική πολικότητας, που θα αποτελεί το νέο καλούπι και την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Το εμπόδιο μπορεί να αποτελεί είτε μία σταθερή δευτεροταγή RNA δομή [Romanova *et al.*, (1986)], είτε η προσθήκη λάθος νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο [Pilipenko *et al.*, (1995)]. Όταν η μετάβαση από το ένα στο άλλο εκμαγείο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος [Kirkegaard and Baltimore, (1986)]. Αντίθετα, μία μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς. Αυτού του είδους ο ανασυνδυασμός είναι πιο πιθανός στις μη-κωδικές περιοχές του ιικού γενώματος. Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-

)RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία. Όσον αφορά τον αντιγραφικό μηχανισμό, πρέπει να υπάρχουν κάποιοι παράγοντες που διευκολύνουν τον τερματισμό της RNA σύνθεσης πάνω στο πρώτο εκμαγείο, τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου κλώνου (πιθανόν μαζί με την RNA πολυμεράση) και την αναγνώριση της σωστής θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο. Ο πρώτος τερματισμός της RNA σύνθεσης είναι πιθανόν ότι προκαλείται από κάποιες δευτεροταγείς δομές του εκμαγείου ή/και από την ενσωμάτωση ενός μη-συμπληρωματικού νουκλεοτιδίου. Ο εμπλουτισμός μιας RNA περιοχής με U (και πιθανόν A) είναι πιθανόν ότι διευκολύνει τον διαχωρισμό του αναπτυσσόμενου RNA κλώνου μετά τον πρώτο τερματισμό [Agol V.I. (2002)]. Είναι πιθανόν ότι η ακριβής αναγνώριση της θέσης σύνδεσης πάνω στο δεύτερο εκμαγείο εξασφαλίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του 3' άκρου του αναπτυσσόμενου κλώνου και της συμπληρωματικής περιοχής του δεύτερου εκμαγείου. Ωστόσο, αυτή η αλληλεπίδραση φαίνεται πως εμπλέκει μόνο λίγα νουκλεοτίδια και έτσι η σύνδεση μπορεί εύκολα να είναι μη ακριβής λόγω των πολλαπλών μικρών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στο ιικό RNA. Ένας παράγοντας που ενδεχομένως μπορεί να φέρει τις κατάλληλες περιοχές των δύο εκμαγείων κοντά είναι ο σχηματισμός ενός ετεροδιμερούς από ανεστραμμένες επαναλήψεις που αντιστοιχούν σε ομόλογες περιοχές φουρκετών (εικόνα 1.5.2.1) [Agol V.I. (1997)].

#### **1.5.2.2 Μη-αντιγραφικός μηχανισμός (non-replicative)**

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση προσυντεθειμένων RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Θεωρητικά υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκύπτουν αυτά τα RNA τμήματα: i) από την πρόωμη λήξη της αντιγραφής, ii) από την αποικοδόμηση του ιικού RNA από κυτταρικές RNases, iii) από δραστικότητα ριβοενζύμου του ίδιου του ιικού RNA [Agol V.I. (2002)]. Κατόπιν, η σύνδεση των RNA τμημάτων είναι πιθανόν ότι εμπλέκει είτε μία RNA λιγάση είτε κάποια δραστικότητα ριβοενζύμου [de Quadros CA et al (1992), Domingo E. et al (2006), Gmyl AP et al (2003), King AMQ. et al (1988), Nagy PD, Simon AE. et al (1997), Plyusnin A. et al (2002)].

## **2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η κινητική ανίχνευσης του αρνητικού και θετικού κλώνου του ιού Sabin 1, μέσω μίας ειδικής stem-loop reverse transcription PCR σε κύτταρα Rd και η συσχέτιση της ανίχνευσης αυτής με τις κυτταρικές αλλοιώσεις που προκαλεί ο ιός Sabin 1 βάσει των CCID<sub>50</sub> που χρησιμοποιήθηκαν για τον ενοφθαλμισμό της κυτταρικής σειράς Rd.

### **3 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ – ΤΙΤΛΟΠΟΙΗΣΗ ΙΟΥ**

Στο πειραματικό μέρος της πτυχιακής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το εμβολιακό στέλεχος Sabin 1. Η κυτταρική σειρά Rd (rhabdomyosarcoma) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του στελέχους. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις του Sabin 1, με σκοπό την απόκτηση του στελέχους σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις  $10^5$ , 1, και  $10^{-2}$  CCID<sub>50</sub>. Με τον όρο CCID<sub>50</sub> αναφερόμαστε στον τίτλο του ιού που μπορεί να προκαλέσει καταστροφή της κυτταροκαλλιέργειας στο 50% αυτής. Απαραίτητος ήταν ο έλεγχος ποιότητας κυτταρικής σειράς Rd, έτσι ώστε να είναι δυνατή η μόλυνσή της από το δείγμα ιού, ενώ ταυτόχρονα το δείγμα του ιού αποψύχθηκε. Για τη μόλυνση, τα κύτταρα αναπτύσσονται σε θρεπτικό υλικό D-MEM με 1% περιεκτικότητα σε Fetal Bovine Serum (FBS). Πραγματοποιήθηκε μεταφορά 100 μl από την κυτταροκαλλιέργεια Rd (D-MEM 2%) σε κάθε πηγαδάκι σε μία μικροπλάκα 96-θέσεων και έπειτα από την μόλυνση της μικροπλάκας, ακολούθησε επώαση στους 37 °C. Παράλληλα, παρατηρούσαμε καθημερινά για εμφάνιση πλήρους κυταροπαθογόνου δράσης (cytopathic effects-CPE).

#### **3.2 ΚΥΤΤΑΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ**

Με σκοπό την μελέτη της κινητικής της αντιγραφής του ιού, πραγματοποιήθηκαν 9 διαφορετικές απομονώσεις (κύτταρα και υπερκείμενο) από την μικροπλάκα κυτταροκαλλιέργειας για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού. Πιο συγκεκριμένα, 100 μl του στελέχους Sabin 1, προστέθηκαν σε μικροπλάκα 96 θέσεων. Μία ώρα μετά τη μόλυνση (p.i), πραγματοποιήθηκαν δύο πλύσεις της μικροπλάκας με το υλικό κυτταροκαλλιέργειας D-MEM. Το στάδιο αυτό ήταν απαραίτητο, για να απομακρυνθούν όσα ιικά σωματίδια δεν μπόρεσαν να προσδεθούν στους κυτταρικούς υποδοχείς και επομένως να εισέλθουν μέσα στα κύτταρα. Έπειτα,

ακολουθήθηκε η διαδικασία των απομονώσεων στα κύτταρα αλλά και στο υπερκείμενο στις παρακάτω ώρες μετά τη μόλυνση : 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h, 24h, 48h αλλά και στους 72h p.i.

### 3.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο RNeasy mini kit της QIAGEN. Συγκεκριμένα, ύστερα από φυγοκέντρηση του κάθε δείγματος για 5 λεπτά σε 300g, προστέθηκαν 350μl RLT και πραγματοποιήθηκε vortex και ομογενοποίηση για 1min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 350μl 70% αιθανόλης και ο συνολικός όγκος των 700ml τοποθετήθηκε σε μία στήλη όπου και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα στα 8000g. Μετά την αφαίρεση του υλικού που προέκυψε από την φυγοκέντρηση, προστέθηκαν 700 ml RWI και φυγοκεντρήθηκαν για 15 δευτερόλεπτα στα 8000g. Μετά την αφαίρεση του υλικού, προστέθηκαν 500 ml RPE δύο φορές και φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στα 8000g. Η στήλη μεταφέρθηκε σε νέο tube 1.5 ml και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 50μl RNase free water. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20 °C για μελλοντική χρήση.

### 3.4 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΙΔΙΚΩΝ ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ

Στην παρούσα μελέτη, έξι εκκινητικά μόρια (primers) χρησιμοποιήθηκαν. Η αλληλουχία, πολικότητα αλλά και η θέση πρόσδεσης τους στο ιικό RNA απεικονίζονται στο Πίνακα 1. Για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (κλειδί στην αντιγραφή του ιού) σχεδιάστηκαν δύο primers. Πιο συγκεκριμένα, ο EntNS3-RT είναι ένας DNA-ολιγομερής εκκινητής με μία χαρακτηριστική δομή stem-loop (φουρκέτας) στο 5'-άκρο. Περιέχει επίσης και μία ειδική ιική αλληλουχία στο 3'-άκρο του (εικόνα 3.4.1) . Μόλις ολοκληρωθεί η διαδικασία της RT, ακολουθεί η PCR με το εκκινητικό ζεύγος EntNS1-f/UC53-flap. Ο εκκινητής EntNS1-f σχεδιάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να συνδέεται απόλυτα πάνω σε ένα συγκεκριμένο



### 3.5 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA είναι απαραίτητη προκειμένου να ακολουθήσει PCR για την ενίσχυση της περιοχής του γενώματος που μας ενδιαφέρει. Δύο διαφορετικές διαδικασίες RT πραγματοποιήθηκαν, μία για κάθε κλώνο ξεχωριστά.

Ο συνολικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 20  $\mu$ l. Αρχικά προετοιμάζεται μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 1 $\mu$ l specific primer (Macrogen, North Korea) (50 $\mu$ mol) ανάλογα με τον κλώνο που θέλουμε να ανιχνεύσουμε (EntNS3-RT και UC53-flap για την ανίχνευση του αρνητικού και θετικού κλώνου αντίστοιχα), 1 $\mu$ l dNTPs (2mM) και ddH<sub>2</sub>O (5 $\mu$ l/tube). Σε eppendorf των 500 $\mu$ l προστέθηκαν 7 $\mu$ l/tube του παραπάνω μίγματος και 5 $\mu$ l από το ιικό RNA (από την εκχύλιση). Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Eppendorf. Μετά την επώαση, τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο και προετοιμάζεται το δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει για κάθε αντίδραση 4 $\mu$ l first strand Buffer (5X) , 2 $\mu$ l DTT (0,01M), 0,5 $\mu$ l RNase out (20U), 0,5 $\mu$ l Superscript II (100U) (Invitrogen, Life Technologies Paisley, UK) και 1 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Αφού προστέθηκαν 8 $\mu$ l του δεύτερου μίγματος σε κάθε eppendorf, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση και εν συνεχεία ακολούθησε επώαση διαδοχικά σε δύο διαφορετικές συνθήκες: 50 λεπτά στους 42 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

### 3.6 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Όλες οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν στο (Eppendorf-MastercyclerI). Η ανίχνευση και στις δύο περιπτώσεις (αρνητικός και θετικός κλώνος) γίνεται στην 5'-UTR γενωμική περιοχή, καθώς αποτελεί την πιο συντηρημένη περιοχή των εντεροϊών. Συγκεκριμένα για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών EntNS1-f/UC53 flap με το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος να είναι στις 438 bp, ενώ για την ανίχνευση του θετικού κλώνου χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος UG52-flap/UC53-flap με το αντίστοιχο μέγεθος προϊόντος να είναι στις 450 bp. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο



προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 1 μl MgCl<sub>2</sub> (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 1x), 0.2 μl από τον κάθε εκκινητή (10pmol), 0.1 μl από Taq Polymerase (KAPABiosystems) (0.5 Unit ενζύμου) και ddH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA. Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή στις εξής συνθήκες:

ΓΙΑ ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΛΩΝΟ

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
	-30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA.
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 55 °C, για τον υβριδισμό των εκκινητών
	-30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

ΓΙΑ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΛΩΝΟ

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
	-30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA.
45 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 63 °C, για τον υβριδισμό των εκκινητών
	-30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3.7 NESTED PCR

Η Nested-PCR είναι μία διαδικασία που προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από την απλή PCR. Βασικό μεινέκτημα της είναι η αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης επιμολύνσεων. Η παραπάνω διαδικασία εφαρμόστηκε για την ανίχνευση μόνο του κλώνου αρνητικής πολικότητας, καθώς ήταν αδύνατος ο εντοπισμός του σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις του ιού. Χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό ζεύγος ENV-1/ENV-2 με αντίστοιχο μέγεθος προϊόντος στις 148 bp. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μίγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: 5μl διαλύματος dNTPs (τελικής συγκέντρωσης 1mM), 1 μl  $MgCl_2$  (τελικής συγκέντρωσης 2mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 1X), 0.2 μl από τον κάθε εκκινητή (10pmol), 0.1 μl από Taq Polymerase (KAPABiosystems) (0.5 Unit ενζύμου) και  $ddH_2O$  μέχρι τελικού όγκου 47μl Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl από το προϊόν της πρώτης PCR. Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιήθηκε η διαδικασία είναι οι εξής:

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του DNA
	-30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του DNA.
30 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 55 °C, για τον υβριδισμό των εκκινητών
	-30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	2 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

### 3.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ PCR ΚΑΙ NESTED-PCR

Για την ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αгарόζης σε συγκέντρωση 2%, ενώ για τα προϊόντα της NESTED-PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή σε συγκέντρωση 3%. Συγκεκριμένα, 1,2 και 1,8 gr αгарόζης αντίστοιχα (Invitrogen Ultra-Pure Gel Agarose) μαζί με 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 αгарόζη. 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. 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 από κάθε PCR προϊόν 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. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο 50 bp και ο 100 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 30 min. Το πήκτωμα αгарόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

## 4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω, αξιολογήθηκε η κινητική του στελέχους Sabin 1, ώστε να διαπιστωθεί το χρονικό σημείο ανίχνευσης του κλώνου αρνητικής πολικότητας. Επιπλέον μέσω της ανίχνευσης του θετικού κλώνου, μπορέσαμε να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη εντεροϊού στα κύτταρα αλλά και στο υπερκείμενο. Αξίζει να σημειωθεί πως η Nested-PCR χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας, στις συγκεντρώσεις [1] και  $[10^{-2}]$  του ιού. Όπως μπορεί να απεικονιστεί στους Πίνακες 4.1, 4.2 και 4.3 η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής και θετικής πολικότητας παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με την συγκέντρωση του στελέχους.

**Πίνακας 4.1:** Κινητική ανίχνευσης κλώνου αρνητικής και θετικής πολικότητας, σε κύτταρα και υπερκείμενο σε συγκέντρωση ιού  $10^5$  CCID<sub>50</sub>.

<i>Αρνητικός κλώνος</i>	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h	72h
κύτταρα	+	+	+	+	+	+	+	Δεν έγινε	
υπερκείμενο	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Θετικός κλώνος</i>	2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h	72h
κύτταρα	+	+	+	+	+	+	+	Δεν έγινε	
υπερκείμενο	+	+	+	+	+	+	+		

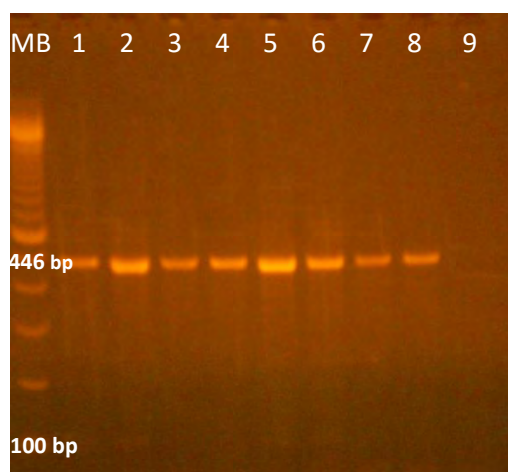
**Πίνακας 4.2:** Κινητική ανίχνευσης κλώνου αρνητικής και θετικής πολικότητας, σε κύτταρα και υπερκείμενο σε συγκέντρωση ιού 1 CCID<sub>50</sub>.

<i>Αρνητικός κλώνος</i>	2h		4h		6h		8h		10h		12h		24h		48h		72h	
	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes
κύτταρα	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
υπερκείμενο	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>Θετικός κλώνος</i>	2h		4h		6h		8h		10h		12h		24h		48h		72h	
κύτταρα	+		+		+		+		+		+		+		+		+	
υπερκείμενο	-		-		-		-		-		-		+		+		+	

**Πίνακας 4.3:** Κινητική ανίχνευσης κλώνου αρνητικής και θετικής πολικότητας, σε κύτταρα και υπερκείμενο σε συγκέντρωση ιού  $10^{-2}$  CCID<sub>50</sub>

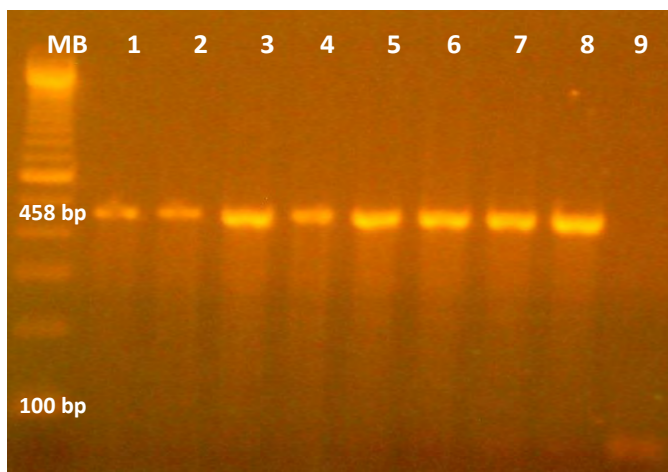
<b>Αρνητικός κλώνος</b>	2h		4h		6h		8h		10h		12h		24h		48h		72h	
	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes	Sin	Nes
κύτταρα	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
υπερκείμεν	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<b>Θετικός κλώνος</b>	2h		4h		6h		8h		10h		12h		24h		48h		72h	
κύτταρα	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
υπερκείμεν	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Όπως φαίνεται από τους παραπάνω πίνακες, η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ σύντομα (2 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας). Στην υψηλότερη συγκέντρωση του ιού  $10^5$  CCID<sub>50</sub>, η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου γίνεται εφικτή μέσω απλής PCR έπειτα από 2 ώρες σε κύτταρα αλλά και υπερκείμενο. Στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις του ιού, η κατάσταση διαφοροποιείται καθώς η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας πετυχαίνεται μόνο μέσω της Nested PCR έπειτα από 2 ώρες στα κύτταρα αλλά και μετά από τουλάχιστον 24 ώρες στο υπερκείμενο. Ενδεικτικά, στις παρακάτω εικόνες απεικονίζονται αποτελέσματα, όσον αφορά την ανίχνευση του αρνητικού και θετικού κλώνου στις διάφορες συγκεντρώσεις του στελέχους Sabin 1:



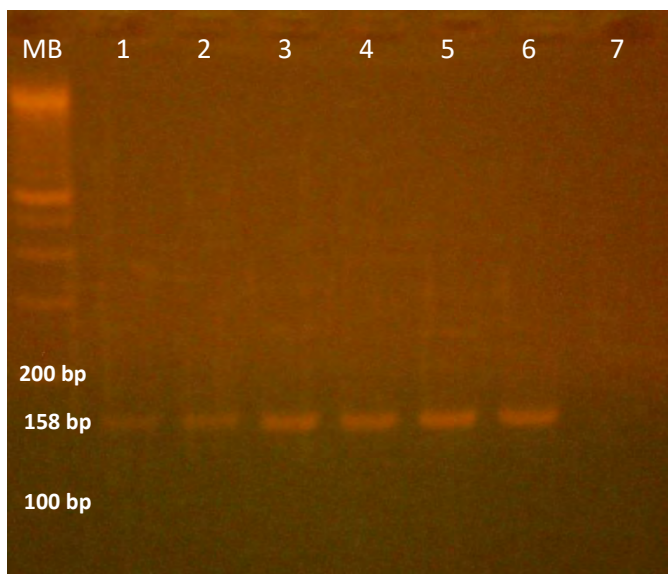
<b>1</b>	<b><math>10^5</math> 2h A</b>
<b>2</b>	<b><math>10^5</math> 2h B</b>
<b>3</b>	<b><math>10^5</math> 2h As</b>
<b>4</b>	<b><math>10^5</math> 2h Bs</b>
<b>5</b>	<b><math>10^5</math> 4h A</b>
<b>6</b>	<b><math>10^5</math> 4h B</b>
<b>7</b>	<b><math>10^5</math> 4h As</b>
<b>8</b>	<b><math>10^5</math> 4h Bs</b>
<b>9</b>	<b>DdH<sub>2</sub>O</b>

**Εικόνα 4.1** Ανίχνευση κλώνου αρνητικής πολικότητας μέσω απλής PCR, σε κύτταρα και υπερκείμενο έπειτα από 2 και 4 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας σε συγκεντρώσεις [ $10^5$  CCID<sub>50</sub>].



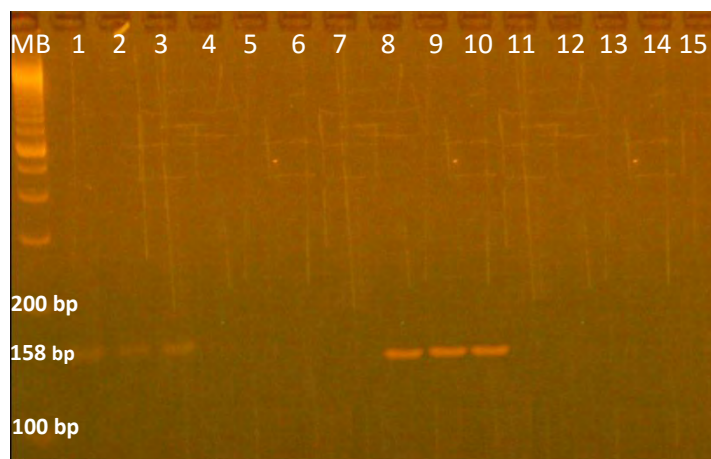
**Εικόνα 4.2** Ανίχνευση κλώνου θετικής πολικότητας μέσω απλής PCR, σε κύτταρα και υπερκείμενο έπειτα από 2 και 4 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας.

1	$10^5$ 2h A
2	$10^5$ 2h B
3	$10^5$ 2h As
4	$10^5$ 2h Bs
5	$10^5$ 4h A
6	$10^5$ 4h B
7	$10^5$ 4h As
8	$10^5$ 4h Bs
9	DdH <sub>2</sub> O



**Εικόνα 4.3** Ανίχνευση κλώνου αρνητικής πολικότητας του στελέχους Sabin 1 (1 CCID<sub>50</sub>) μέσω Nested-PCR, σε κύτταρα 2, 4 και 6 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας.

1	1 2h A
2	1 2h B
3	1 4h A
4	1 4h B
5	1 6h A
6	1 6h B
7	DdH <sub>2</sub> O



**Εικόνα 4.4** Ανίχνευση κλώνου αρνητικής πολικότητας του στελέχους Sabin 1 ( $10^{-2}$  CCID<sub>50</sub>) μέσω Nested-PCR, σε κύτταρα και υπερκείμενο 8 και 10 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας.

1	$10^{-2}$ 8h A
2	$10^{-2}$ 8h B
3	$10^{-2}$ 8h C
4	$10^{-2}$ 8h As
5	$10^{-2}$ 8h Bs
6	$10^{-2}$ 8h Cs
7	ddH <sub>2</sub> O
8	$10^{-2}$ 10h A
9	$10^{-2}$ 10h B
10	$10^{-2}$ 10h C
11	$10^{-2}$ 10h As
12	$10^{-2}$ 10h Bs
13	$10^{-2}$ 10h Cs
14	Rd
15	ddH <sub>2</sub> O

Τα αποτελέσματα αυτά μέσω της stem loop RT-PCR ελέγχθηκαν ως προς την ειδικότητα των εκάστοτε προϊόντων τους σε κύτταρα αλλά και σε υπερκείμενο. Για το λόγο αυτό ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε δύο επίπεδα. Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστές PCR. Στην πρώτη προσπαθήσαμε να ανιχνεύσουμε τον αρνητικό κλώνο μέσω του εκκινητικού ζεύγους EntNS1-f/UC53-f κατευθείαν από το υλικό εκχύλισης και χωρίς την χρήση του ειδικού εκκινητή EntNS3 για την διαδικασία της RT. Η δεύτερη PCR ακολούθησε την φυσιολογική διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιήθηκε RT με τον ειδικό εκκινητή και στη συνέχεια PCR με το ζεύγος εκκινητών που προαναφέρθηκε. Όπως ήταν αναμενόμενο η ενίσχυση του τμήματος έγινε μόνο στη δεύτερη περίπτωση, όπου και παρατηρήσαμε την αναμενόμενη ζώνη στο gel ηλεκτροφόρησης. Κατά το δεύτερο έλεγχο για τον κλώνο αρνητικής πολικότητας, πραγματοποιήθηκαν πάλι δύο αντιδράσεις PCR. Στην πρώτη, μετά την ολοκλήρωση της RT με τον EntNS3-RT, χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό ζεύγος UG52-flap/UC53-flap (ειδικό για ανίχνευση θετικού κλώνου), ενώ στη δεύτερη το εκκινητικό ζεύγος EntNS1-f/UC53-flap (ειδικό για ανίχνευση αρνητικού κλώνου). Στην περίπτωση αυτή, ενίσχυση προϊόντος παρατηρήθηκε μόνο στην δεύτερη PCR. Η ίδια ακριβώς διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τον έλεγχο ειδικότητας των προϊόντων για τον κλώνο

θετικής πολικότητας. Στους παρακάτω πίνακες (4.4 και 4.5), συνοψίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν τον έλεγχο ειδικότητας των προϊόντων του κλώνου αρνητικής πολικότητας.

**Πίνακας 4.4:** Έλεγχος ειδικότητας προϊόντων αρνητικού κλώνου χωρίς και με τη χρήση του ειδικού RT-εκκινητή

<i>εκκινητής RT</i>	<i>Ζεύγος εκκινητών (PCR)</i>	<i>Αποτέλεσμα PCR</i>
No EntNS3	EntNS1-f/UC53-flap	-
EntNS3	EntNS1-f/UC53-flap	+

**Πίνακας 4.5:** Έλεγχος ειδικότητας προϊόντων αρνητικού κλώνου με διαφορετικό ζεύγος εκκινητικών μορίων

<i>εκκινητής RT</i>	<i>Ζεύγος εκκινητών (PCR)</i>	<i>Αποτέλεσμα PCR</i>
EntNS3	UG52-flap/UC53-flap	-
EntNS3	EntNS1-f/UC53-flap	+

Παράλληλα με τις μοριακές τεχνικές που ακολουθήθηκαν για να διαπιστωθεί η ύπαρξη του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1, πραγματοποιήθηκε και μελέτη της κυτταροκαλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα, μετά την μόλυνση της καλλιέργειας Rd με το συγκεκριμένο στέλεχος, παρατηρούνταν καθημερινά η πιθανή εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE) σε αυτήν. Όπως ήταν αναμενόμενο, υπήρχαν διαφορές ως προς την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης για κάθε μία από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του ιού. Στην μεγαλύτερη συγκέντρωση του στελέχους [ $10^5 \text{CCID}_{50}$ ], παρατηρήθηκε πλήρης καταστροφή της κυτταροκαλλιέργειας ( $\text{CPE} = 4^+$ ), 24 ώρες μετά την μόλυνσή της. Αντίθετα την ίδια χρονική στιγμή, και όταν η συγκέντρωση του Sabin 1 είναι  $1 \text{CCID}_{50}$ , περίπου το 25% ( $\text{CPE} = 1^+$ ) της καλλιέργειας, υφίσταται κυτταρικές αλλοιώσεις. Τέλος για την μικρότερη συγκέντρωση του στελέχους [ $10^{-2}$ ], παρατηρήθηκε καταστροφή περίπου του 25% της κυτταροκαλλιέργειας, 48 ώρες μετά την μόλυνση. Παρακάτω απεικονίζεται μία μικροπλάκα 96-θέσεων που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση εμφάνισης CPE.



		<table><tr><th>2h</th><th>4h</th><th>6h</th><th>8h</th><th>10h</th><th>12h</th><th>24h</th><th>48h</th><th>72h</th><th>c.c</th><th>c.c</th></tr><tr><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th></tr></table>												2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h	72h	c.c	c.c	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h	72h	c.c	c.c																										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12																									
A							4 <sup>+</sup>						10 <sup>5</sup>																							
							4 <sup>+</sup>																													
							4 <sup>+</sup>																													
D							1 <sup>+</sup>						1																							
							1 <sup>+</sup>																													
							1 <sup>+</sup>																													
G								1 <sup>+</sup>					10 <sup>-2</sup>																							
								1 <sup>+</sup>																												
									1 <sup>+</sup>																											

**Εικόνα 4.5:** Πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων. Στο πάνω μέρος της πλάκας, αναγράφονται οι ώρες απομόνωσης των κυττάρων και του υπερκείμενου, ενώ μέσα σε κάθε πηγαδάκι έχει σημειωθεί το CPE για κάθε μία από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις του ιού

## 5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ένας μεγάλος αριθμός εντεροϊών έχει ανιχνευθεί τόσο σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα καθώς και σε διάφορα τρόφιμα [Nicholson F. et al (1994), Kopecka H. et al (1993), Iritani N. et al (2014)]. Για αυτό το λόγο είναι απαραίτητη η συνεχής παρακολούθηση των δειγμάτων καθώς και ο έλεγχος της αντιγραφικής ενεργότητας των διαφόρων στελεχών εντεροϊών.

Κατά τον κύκλο ζωής ενός εντεροϊού, αυτό που τον καθιστά αντιγραφικά ενεργό και επομένως ικανό να μολύνει το κύτταρο ξενιστή είναι η ύπαρξη του κλώνου αρνητικής πολικότητας [Li Y. et al (2002)].

Μία προσέγγιση μέσω της οποίας, θα μπορούσε να ελεγχθεί η παρουσία αλλά και η αντιγραφή του ιού, είναι η ανάπτυξή τους σε κυτταροκαλλιέργεια. Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή αν και μπορεί να προσφέρει μία καλή εικόνα για το πώς ένας εντεροϊός μπορεί να ολοκληρώσει τον κύκλο ζωής του μέσα στο κύτταρο (μέσω διαδικασίας λύσης και την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης), δεν παρουσιάζει μεγάλη ειδικότητα αλλά και ευαισθησία. Ο χρόνος ανάπτυξης επίσης αποτελεί ένα βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου, καθώς διάφορα στελέχη εντεροϊών δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις σε σύντομο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, υπάρχουν πολλά στελέχη που δεν μπορούν να αναπτυχθούν στις ήδη υπάρχουσες κυτταροκαλλιέργειες, καθιστώντας αυτές μία μέθοδο που δεν ενδείκνυται για τον έλεγχο της άμεσης αντιγραφικής ενεργότητας των εντεροϊών. Για τον λόγο αυτό, μη χρονοβόρες τεχνικές οι οποίες προσφέρουν μεγάλη εξειδίκευση αλλά και ευαισθησία έχουν αντικαταστήσει τις κυτταροκαλλιέργειες.

Μέθοδοι υβριδισμού καθώς και μοριακές τεχνικές όπως η direct PCR, είχαν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας εντεροϊών. Το βασικό μειονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η αδυναμία διάκρισης μεταξύ αντιγραφικά ενεργών και μη-αντιγραφικά ενεργών στελεχών στο εκάστοτε δείγμα [Richards GP. (1999)]. Η παρουσία εντεροϊού δεν αντανάκλα αυτόματα την αντιγραφική ενεργότητά του και συνεπώς την ικανότητά του να μολύνει κύτταρα. Η

ανάπτυξη επιπλέον μοριακών τεχνικών έχει οδηγήσει στην γρήγορη και ειδική ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας [Bhattacharya SS. et al (2004)].

Στην παρούσα μελέτη μία ειδική stem-loop αντίστροφη μεταγραφή επέτρεψε την γρήγορη και ειδική ανίχνευση του αρνητικού κλώνου του στελέχους Sabin 1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ύστερα από τον ενοφθαλμισμό του σε κυτταροκαλλιέργεια Rd.

Στην συγκεκριμένη εργασία, σχεδιάστηκαν δύο ειδικοί εκκινητές, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (αντιγραφόμενος κλώνος). Πιο συγκεκριμένα, ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής περιείχε μία ειδική ιική αλληλουχία στο 3'- άκρο του καθώς και μία stem-loop δομή κοντά στο 5'- άκρο του. Ο σχεδιασμός των εκκινητών βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη [Anwar A. et al (2006)]. Η δομή που περιγράφηκε μαζί με την θερμοδυναμική σταθερότητα του RT-εκκινητή καθιστά την τεχνική αυτή εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική [Riccelli PV. et al (2001)] Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την διαδικασία της PCR διέθετε την ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία με ένα τμήμα του RT-εκκινητή (το τμήμα αυτό κάλυπτε την stem-loop δομή). Αυτός ο σχεδιασμός επέτρεψε τη σύνδεση του ενός εκκινητή της PCR πάνω στον RT-εκκινητή και όχι πάνω στο γονιδίωμα του ιού, καθιστώντας την διαδικασία εξαιρετικά ειδική.

Η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας πραγματοποιήθηκε σε όλες τις υπό μελέτη συγκεντρώσεις του στελέχους Sabin 1. Όπως προαναφέρθηκε, ο αρνητικός κλώνος μπόρεσε να ανιχνευτεί μέσα σε 2 ώρες μετά την μόλυνση της κυτταροκαλλιέργειας, χωρίς να εμφανιστεί κάποια κυτταρική αλλοίωση. Κάτι τέτοιο καθιστά την συγκεκριμένη stem loop reverse transcription μία μη-χρονοβόρα τεχνική με αξιόπιστα αποτελέσματα. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις του ιού, η ανίχνευση πραγματοποιήθηκε μέσω της Nested-PCR, καθώς ήταν αδύνατος ο εντοπισμός του αρνητικού κλώνου μέσω της απλής PCR (χαμηλότερη ευαισθησία από τη Nested-PCR).

Η εικόνα των κυτταροκαλλιιεργειών βοήθησε στο να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της παραπάνω μοριακής τεχνικής. Συγκεκριμένα, μόνο στην χαμηλότερη συγκέντρωση του ιού ( $10^{-2}$  CCID<sub>50</sub>) παρατηρήθηκαν κυτταρικές

αλλοιώσεις τη 2<sup>η</sup> ημέρα μετά την μόλυνση ενώ για τις άλλες δύο συγκεντρώσεις (10<sup>5</sup> και 1 CCID<sub>50</sub>) παρατηρήθηκε κυτταροπαθογόνος δράση από την 1<sup>η</sup> ημέρα.

Η ειδική αυτή stem-loop reverse transcription μπορεί να βρει εφαρμογή σε ένα μεγάλο αριθμό μελετών. Πραγματοποιήθηκαν επιπλέον πειραματικές διαδικασίες, έτσι ώστε να μπορέσουμε να διαπιστώσουμε την χρησιμότητα και το εύρος της παραπάνω τεχνικής. Αρχικά, επιτεύχθηκε η ανίχνευση του κλώνου αρνητικής πολικότητας του Sabin 1, έπειτα από ενοφθαλμισμό του σε κυτταροκαλλιέργειες όπου η χρήση τους δεν ενδείκνυται για την ανάπτυξη εντεροϊών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι καρκινικές κυτταρικές σειρές SiHa και Caski και πραγματοποιήθηκε απομόνωση από την κυτταροκαλλιέργεια 6 ώρες μετά την μόλυνση της. Με αυτό τον τρόπο έγινε εφικτή, η ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου μέσα σε λίγες ώρες, ενώ η αντίστοιχη εικόνα της καλλιέργειας μας έδωσε αποτέλεσμα έπειτα από 6 ημέρες.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου σε στελέχη εντεροϊών, τα οποία παρουσιάζουν δυσκολίες ως προς την ανάπτυξή τους σε ήδη γνωστές κυτταροκαλλιέργειες και δεν εμφανίζουν κυτταροπαθογόνο δράση σε αυτές. Μερικά παραδείγματα τέτοιων στελεχών αποτελούν τα CAV στελέχη [Bolanaki E. et al (2005)]. Μέσω της παραπάνω μοριακής τεχνικής μπορέσαμε να ελέγξουμε την αντιγραφική ενεργότητα του CAV13 σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (6 ώρες μετά την μόλυνση).

Τέλος, η συγκεκριμένη τεχνική ανίχνευσης του κλώνου αρνητικής πολικότητας χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιγραφικής ενεργότητας του Sabin 1 σε κυτταροκαλλιέργεια Rd, έπειτα από αδρανοποίηση του στελέχους σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Η επίδραση της θερμοκρασίας σε ένα στέλεχος εντεροϊού πιθανολογείται ότι επηρεάζει κατά κύριο λόγο το καψίδιο του στελέχους και συγκεκριμένα την διαδικασία πρόσδεσης του ιού στον αντίστοιχο κυτταρικό υποδοχέα. Για τον λόγο αυτό, προσπαθήσαμε να ελέγξουμε σε ποιες θερμοκρασίες δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί ο αντιγραφόμενος κλώνος μέσα στα κύτταρα και συνεπώς κατά πόσο επηρεάζει η θερμοκρασία την διαδικασία πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα [Nuanualsuwan S, Cliver DO (2003) (a), Nuanualsuwan S, Cliver DO (2003) (b), Bertrand I et al (2012)]. Συγκεκριμένα, η αδρανοποίηση του

στελέχους Sabin 1 δοκιμάστηκε σε δυο συγκεντρώσεις  $10^5$  και 1 CCID<sub>50</sub> και σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες (42°C, 52°C, 62°C, 72°C, 82°C) για 10 λεπτά. Στην υψηλότερη συγκέντρωση του ιού ( $10^5$  CCID<sub>50</sub>) ήταν δυνατή η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου έπειτα από αδρανοποίηση ακόμα και στους 72°C, ενώ αντίθετα στην χαμηλότερη συγκέντρωση του ιού (1 CCID<sub>50</sub>), η ανίχνευση ήταν ακόμη εφικτή μετά από αδρανοποίηση του στελέχους μέχρι και στους 52°C. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και με τη χρήση κυτταροκαλλιιεργειών, επιβεβαιώνοντας ότι η τεχνική αυτή είναι μια γρήγορη, εξειδικευμένη και ιδιαίτερα αξιόπιστη.

Όπως είναι αναμενόμενο, εξαιτίας της συχνής εμφάνισης και κυκλοφορίας στελεχών εντεροϊών σε διάφορα δείγματα (περιβάλλον, τρόφιμα) η απαίτηση για την ανάπτυξη μίας σχετικά γρήγορης τεχνικής με εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα εμφανίζεται αναγκαία για τον έλεγχο της ενεργότητας των εντεροϊών στα δείγματα αυτά, καθώς η χρήση των κυτταροκαλλιιεργειών αν και παρουσιάζει μία καλή ευαισθησία, υστερεί σε χρόνο ενώ χρειάζονται διάφορες επιβεβαιωτικές δοκιμασίες.

Ένας μεγάλος αριθμός μοριακών τεχνικών έχει αναπτυχθεί την τελευταία δεκαετία, προσφέροντας εναλλακτικές μεθόδους με σκοπό την γρήγορη και εξειδικευμένη ανίχνευση του αντιγραφόμενου κλώνου σε περιβαλλοντικά και κλινικά δείγματα [Yeh HY. et al (2008), Jothikumar N. et al (2005), Jiang YJ. et al (2004)]. Τεχνικές όπως real-time PCR, integrated cell-culture/reverse transcription και η stem-loop mediated reverse transcription που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές και στις βιομηχανίες ανάπτυξης εμβολίων, όπου το ενδιαφέρον τους επικεντρώνεται στο κατά πόσο οι τεχνικές αδρανοποίησης που έχουν εφαρμοστεί στα διάφορα στελέχη έχουν επιτύχει, καθιστώντας τον ιό αντιγραφικά ανενεργό.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Bamford DH, Breitbart M, Davison AJ, Ghabrial SA, Gorbalenya AE, Knowles NJ, Krell P, Lavigne R, Prangishvili D, Sanfaçon H, Siddell SG, Simmonds P, Carstens EB. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). *Archives of Virology* 160: 1837–50.
2. Afonina I, Ankoudinova I, Mills A, Lokhov S, Huynh P, Mahoney W. Primers with 5' flaps improve real-time PCR. *Biotechniques* 2007; 43: 770, 772, 774
3. Agol V. I. 1997. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
4. Agol V. I., 2002. Picornavirus genome:an overview. In: Semler B. L., Wimmer E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 127-148.
5. Ambros V, Baltimore D. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'- terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*1980: 255:6739–6744
6. Ansardi DC, Luo M, Morrow CD. 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*1994;199: 20-34.
7. Anwar A, August JT, Too HP. A stem-loop-mediated reverse transcription real-time PCR for the selective detection and quantification of the replicative strand of an RNA virus. *Anal Biochem* 2006;352 (May (1)):120-8
8. Bertrand I, Schijven JF, Sánchez G, Wyn-Jones P, Ottoson J, Morin T, Muscillo M, Verani M, Nasser A, de Roda Husman AM, Myrmel M, Sellwood J, Cook N, Gantzer C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl Microbiol* 2012;112 (Jun (6)):1059-74
9. Bhattacharya SS, Kulka M, Lampel KA, Cebula TA, Goswami BB. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *J Virol Methods* 2004;116(Mar (2)):181-7
10. Boehmer PE, Nimonkar AV. Herpes virus replication. *IUBMB Life* 2003;55:13-22.
11. Bolanaki E, Kottaridi C, Markoulatos P, Margaritis L, Katsorchis T. A comparative amplification of five different genomic regions on Cocksackie A and B viruses. Implications in clinical diagnostics. *Mol Cell Probes* 2005;19:127-35
12. Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
13. Brown BA, Oberste MS, Alexander JP Jr, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol* 1999;73:9969-9975.
14. Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1–22.
15. Chen ZG, Stauffacher C, Li Y, et al. Protein-RNA interactions in an icosahedral virus at 3.0 Å resolution. *Science* 1989;245:154-159

16. Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Ereemeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.
17. Chow, M., J. F. Newman, D. Filman, J. M. Hogle, D. J. Rowlands, and F. Brown. 1987. Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature.* 327:482-6.
18. Cho MW, Teterina N, Egger D, et al. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 1994;202:129–145.
19. Colston E, Racaniello VR. Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *EMBO J* 1994;13:5855–5862.
20. Colston EM, Racaniello VR. Poliovirus variants selected on mutant receptor-expressing cells identify capsid residues that expand receptor recognition. *J Virol* 1995;69:4823–4829.
21. Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulis C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/ Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:343 - 351.
22. De Jesus N.H. Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virol J.* 2007;4:70-88
23. De Quadros CA, Andrus JK, Olive JM, et al. Polio eradication from the Western Hemisphere. *Annu Rev Public Health* 1992;13:239–252.
24. Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
25. Domingo E, ed. Quasispecies: Concepts and implications for virology. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 2006;299:.
26. Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.
27. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol* 2000;74:6570–6580.
28. Figlerowicz M, Magdalena Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518 (2003)
29. Filman DJ, Syed R, Chow M, et al. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* 1989;8:1567–1579.
30. Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. 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* 1977;74:961–965.
31. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.

32. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998;12:2293–2304.
33. Gmyl AP, Korshenko SA, Belousov EV, et al. Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces?. *RNA* 2003;9:1221-1231.
34. Greber UF. Signaling in viral entry. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(4):608-626.
35. Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpyroux, and R. Crainic.. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 2000;74(18):8434-8443.
36. Harber J, Bernhardt G, Lu H-H, et al. Canyon rim residues, including antigenic determinants, modulate serotype-specific binding of polioviruses to mutants of the poliovirus receptor. *Virology* 1995;214: 559–570.
37. Hober D., Sané F., Riedweg K., Moumna I., Goffard A., Choteau L., Alidjinou E. K. and Desailoud R. Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the Enteroviruses, Type 1 Diabetes, Dr. Alan Escher (Ed.), 2013 ISBN: 978-953-51-1017-0, InTech, DOI: 10.5772/52087.
38. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229:1358–1365.
39. Iritani N, Kaida A, Abe N, Kubo H, Sekiguchi J, Yamamoto SP, Goto K, Tanaka T, Noda M. Detection and genetic characterization of human enteric viruses in oyster-associated gastroenteritis outbreaks between 2001 and 2012 in Osaka City, Japan. *J Med Virol* 2014;86(Dec (12)):2019-25
40. Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. 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* 1993;67:2961–2971.
41. Jiang YJ, Liao GY, Zhao W, Sun MB, Qian Y, Bian CX, Jiang SD. Detection of infectious hepatitis A virus by integrated cell culture/strand-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 2004;97 (5):1105-12
42. Jothikumar N, Lowther JA, Henshilwood K, Lees DN, Hill VR, Vinjé J. Rapid and sensitive detection of noroviruses by using TaqMan-based one-step reverse transcription-PCR assays and application to naturally contaminated shellfish samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;71 (Apr (4)):1870-5
43. Kew O, De L, Yang C-F, et al. The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* 1993;215-246.
44. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al. Molecular epidemiology of polioviruses. In: Kew OM, Nathanson N, eds. *Molecular Epidemiology. Seminars in Virology*, Vol 6. New York: Academic Press; 1995:401-414
45. King AMQ. Genetic recombination in positive strand RNA viruses. In: *Domingo E, Holland JJ, Ahlquist P, eds. RNA Genetics. Boca Raton FL: CRC Press; 1988.*
46. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981;291: 547–553.



47. Knipe DM, Howley PM. (2007) *Fields Virology, 5th Edition Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
48. Knowles, NJ, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T, Zell R. (2012). Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
49. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 951–955.
50. Kopecka H, Brown B, Pallansch M. Genotypic variation in coxsackievirus B5 isolates from three different outbreaks in the United States. *Virus Res* 1995;38:125-136.
51. Kopecka H, Dubrou S, Prevot J, Marechal J, López-Pila JM. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl Environ Microbiol* 1993;59(Apr (4)):1213-9
52. Kottaridi C, Bolanaki E, Siafakas N, Markoulatos P. Evaluation of seroneutralization and molecular diagnostic methods for echovirus identification. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 53 (2005) 113 – 119
53. Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P. Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn.Microbiol. Infect. Dis.* 2007;58(4): 407 – 412
54. Kyriakopoulou Z, Dedepsidis E, Pliaka V, Tsakogiannis D, Ruether I.G.A, Krikelis A, Markoulatos P.. Complete nucleotide sequence analysis of the VP1 genomic region of Echoviruses 6 isolated from sewage in Greece revealed 98% similarity with Echoviruses 6 that were characterized from an aseptic meningitis outbreak 1 year later. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1170–1173
55. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:59–63
56. Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, et al. Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* 1997;5:961–978.
57. Li Y, Pan Z, Ji Y, Peng T, Archard LC, Zhang H. Enterovirus replication in valvular tissue from patients with chronic rheumatic heart disease. *Eur Heart J* 2002;23(Apr (7)):567–73.
58. Liao S, Racaniello V. Allele-specific adaptation of poliovirus VP1 B-C loop variants to mutant cell receptors. *J Virol* 1997;71:9770–9777.
59. Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al. Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* 1995;76:1687β€“1699.
60. Marc D, Drugeon G, Haenni AL, et al. Role of myristoylation of poliovirus capsid protein VP4 as determined by site-directed mutagenesis of its N-terminal sequence. *EMBOJ*1989;8:2661-2668.

61. Melnick J. L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.) 1990;549 – 605.
62. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989;56:855–865.
63. Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003;77:5136–5144.
64. Moscufo N, Chow M. 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* 1992;66:6849–6857.
65. Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, et al. Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* 1995;171:1399–1405
66. Murray K. E., and Barton D. J. Poliovirus CRE – dependent VPg uridylylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* 2003;77(8): 4739–4750.
67. Nagy PD, Simon AE. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 1997;235:1–9.
68. Nicholson F, Meetoo G, Aiyar S, Banatvala JE, Muir P. Detection of enterovirus RNA in clinical samples by nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of enterovirus infection. *J Virol Methods* 1994;48(Jul (2-3)):155–66
69. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature* 1977;268:208–213.
70. Novak JE, Kirkegaard K. 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* 1991;65:3384–3387.
71. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. *Appl Environ Microbiol* 2003;69 (Mar (3)):1629–1632
72. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl Environ Microbiol* 2003;69 (Jan (1)):350–7
73. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1):119–28.
74. Oberste MS, Maher K, Kennett ML, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* 1999;37:3928–3933
75. Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 2000;74:10359–10370.

76. Pelkmans L, BřOrli T, Zerial M, et al. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 2004;118(6):767-780.
77. Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357–365
78. Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e. 1999
79. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 1995;23(11): 1870–1875.
80. Plyusnin A, Kukkonen SK, Plyusnina A, et al. Transfection-mediated generation of functionally competent Tula hantavirus with recombinant S RNA segment. *EMBO J* 2002;21:1497-1503
81. Racaniello V. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. Fields Virology 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830
82. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916–919
83. Riccelli PV, Merante F, Leung KT, Bortolin S, Zastawny RL, Janeczko R, Benight AS. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res* 2001;29 (Feb (4)):996-1004
84. Richards GP. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J Food Prot* 1999;62 (Jun (6)):691-7
85. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160:311-322.
86. Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000;74: 10371–10380.
87. Rivera V, Welsh J, Maizel JJ. Comparative sequence analysis of the 5'UTR-noncoding region of the enteroviruses and rhinoviruses. *Virology* 1988;165:42-50.
88. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. The primery structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*.1986;155: 202–213.
89. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 2002;10(7): 324–331.
90. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:912–919.
91. Schlegel A, Giddings Jr TH, Ladinsky MS, et al. Cellular origin and ultrastructure of membranes induced during poliovirus infection. *J Virol* 1996;70:6576–6588.

92. Sheehy AM, Gaddis NC, Choi JD, et al. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 2002;418:646-650.
93. Siafakas N, Markoulatos P, Levidiotou-Stefanou S. Molecular identification of enteroviruses responsible for an outbreak of aseptic meningitis; implications in clinical practice and epidemiology. *Molecular and Cellular Probes* 18 (2004) 389–398
94. Skinner MA, Racaniello VR, Dunn G, et al. A new model for the secondary structure of the 5'UTR noncoding RNA of poliovirus is supported by biochemical and genetic data which also show that RNA secondary structure is important to neurovirulence. *J Mol Biol*1989;207:379-392.
95. Spector DH, Baltimore D. Requirement of 3'-terminal poly(adenylic acid) for the infectivity of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*1974;71:2983–2987.
96. Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*1990;71(11): 2483-2501
97. Summers DF, Maizel JV. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
98. Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, et al. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 2005;170(5):769-779.
99. Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol.* 1997;71:8868–8874.
100. Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
101. Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
102. Yeh HY, Hwang YC, Yates MV, Mulchandani A, Chen W. Detection of hepatitis A virus by using a combined cell culture-molecular beacon assay. *Applied and Environmental Microbiology* 2008;74:2239–2243
103. Yin J, Paul AV, Wimmer E, et al. 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* 2003;77:5152–5166
104. Yogo Y, Teng MH, Wimmer E. Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101–1109.
105. Yogo Y, Wimmer E. Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1877–1882.
106. Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, et al. Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis* 1993; 168:1361-1367.