



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΘΕΤΙΚΟΥ
ΚΛΩΝΟΥ ΤΟΥ ΙΟΥ SABIN 1 ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ SiHa ΚΑΙ CaSki

ΝΙΚΟΛΟΠΟΥΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Κινητική ανίχνευσης του αρνητικού και θετικού κλώνου του ιού Sabin 1 σε κύτταρα SiHa και CaSki.

Kinetic detection of the positive and negative strand of Sabin 1 virus in SiHa and CaSki cells.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: Καθηγητής Εφαρμοσμένης
Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοτεχνολογίας
Μικροβίων του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη
Γενωμική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ABSTRACT

The Picornaviridae family includes 50 species of viruses, which are classified in 29 genus. One of them are the enteroviruses. Enteroviruses are small RNA viruses which are surrounded by a non-enveloped icosahedral capsid. This capsid consists of 60 copies of 4 proteins. The genome of the enteroviruses is positive sense single-stranded-RNA and contains the 5'-UTR (untranslated region) which is linked with the VPg protein (Virion Protein), 3'-UTR which is linked with a poly-A tail and a unique ORF (Open Reading Frame) which is processed later to form the virus proteins. When the Enterovirus infects the host cell and begins to copy its genome, the positive sense RNA produces a negative strand sense RNA. The negative sense RNA produces more copies of the positive sense RNA and they behave like mRNAs and then takes place the transcription of the rest genes of the virus. In the present study SiHa and CaSki cells were infected with the reference strain Sabin 1. In the beginning, cells were harvested in 6h & 12h post infection and RNA isolation was performed. Subsequently, RNA was reverse transcribed to cDNA using the RT-PCR technique. A different primer for the transcription of the positive strand and a different primer for the transcription of the negative strand was used. The primer we used for the negative strand has a specific loop structure. Then, PCR was held with different primers for the amplification of positive and negative strands. One of the two primers that we used for the amplification of the negative strand target the loop structure that was mentioned before. Furthermore, NESTED-PCR took place only for the samples of the SiHa cells that were used to amplify the negative strands. In the end, the products were electrophoresed. The results that arise, show that Sabin1 can infect SiHa & CaSki cells and it is active, when the concentration is 10^5 TCID₅₀ and 1 TCID₅₀ as well.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οικογένεια Picornaviridae περιλαμβάνει 50 είδη ιών, τα οποία ταξινομούνται σε 29 γένη. Ένα από αυτά τα γένη, είναι οι εντεροϊοί. Οι εντεροϊοί είναι μικροί RNA ιοί, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το καψίδιο συνίσταται από 60 αντίγραφα 4 πρωτεϊνών. Το γένωμα των εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας. Αυτό, αποτελείται από την 5'-αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) η οποία συνδέεται με μια πρωτεΐνη VPg (Virion Protein), την 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) η οποία συνδέεται με μια πολύ-A ουρά και ένα μοναδικό και μεγάλο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες. Όταν ένας εντεροϊός μολύνει το κύτταρο-ξενιστή και μπαίνει στη διαδικασία να αντιγράψει το γονιδίωμα του, το θετικής πολικότητας RNA που διαθέτει, περνάει πρώτα από ένα στάδιο αρνητικής πολικότητας και στη συνέχεια θα δώσει ξανά RNA θετικής πολικότητας, ώστε το τελευταίο να λειτουργήσει ως mRNA και να γίνει η μεταγραφή των υπόλοιπων γονιδίων του ιού. Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε μόλυνση κυττάρων SiHa και CaSki με το πρότυπο στέλεχος Sabin 1. Αρχικά, έγινε απομόνωση των κυττάρων στις 6h & 12h και ακολούθησε απομόνωση του RNA του ιού και RT-PCR για τη μετατροπή του RNA σε cDNA. Χρησιμοποιήθηκε διαφορετικός εκκινητής για να μεταγραφεί ο θετικός κλώνος και διαφορετικός εκκινητής για τη μεταγραφή του αρνητικού κλώνου. Όσο αφορά τον αρνητικό κλώνο ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε φέρει μια δομή-θηλιάς. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε PCR με διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για την ενίσχυση του θετικού & του αρνητικού κλώνου. Ένας εκ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR για τον αρνητικό κλώνο στοχεύει στη δομή θηλιάς που αναφέρθηκε πριν. Ακόμη, έγινε NESTED-PCR μόνο για τα δείγματα που αφορούν το RNA αρνητικής πολικότητας στα κύτταρα SiHa. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν δείχνουν πως ο ιός Sabin1 περνάει στα κύτταρα SiHa & CaSki και είναι ενεργός, όταν η συγκέντρωσή του είναι 10^5 TCID₅₀ όπως επίσης και όταν είναι 1 TCID₅₀.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....σελ. 8	
i. Βιολογία των εντεροϊών.....σελ. 8	
a) Ταξινόμηση.....σελ. 8	
b) Δομή και αντιγονικότητα ιικών σωματίων...σελ. 8	
c) Οργάνωση και δομή του ιικού γενώματος...σελ. 11	
ii. Κύκλος ζωής των εντεροϊών....σελ. 14	
a) Πρόσδεση στους κυτταρικούς υποδοχείς, είσοδος στα κύτταρα & απέκδυση των ιών....σελ. 15	
b) Μετάφραση του ιικού RNA.....σελ. 18	
c) Επεξεργασία της ιικής πολύ-πρωτεΐνης...σελ. 22	
d) Αντιγραφή του γονιδιώματος και σύνθεση του νέου ιικού mRNA.....σελ. 24	
e) Σχηματισμός καψιδίου.....σελ. 29	
iii. Παθογένεια.....σελ. 30	
iv. Θεραπεία.....σελ.33	
v. Επιδημιολογία & Μοριακή Επιδημιολογία.....σελ.34	
vi. Εξέλιξη.....σελ.37	
a) Εξέλιξη στους πολιοϊούς.....σελ. 37	
b) Ανασυνδυασμός.....σελ. 38	
2. Στόχος της εργασίας.....σελ. 42	
3. Υλικά & Μέθοδοι.....σελ. 43	
a) Στελέχη εντεροϊών.....σελ. 43	
b) Κυτταρικές σειρές.....σελ. 43	
c) Απομόνωση κυττάρων.....σελ. 43	
d) RNA extraction.....σελ. 44	
e) Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR).....σελ. 44	
f) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)...σελ. 45	

g) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης φωλιάς (Nested-PCR).....σελ. 46	
h) Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....σελ. 48	
4. Αποτελέσματα.....σελ. 49	
a) Αποτελέσματα της PCR για τα κύτταρα SiHa....σελ. 49	
b) Αποτελέσματα της Nested-PCR για τα κύτταρα SiHa.....σελ. 51	
c) Αποτελέσματα της PCR για τα κύτταρα CaSki...σελ. 52	
5. Συζήτηση.....σελ. 55	
6. Βιβλιογραφία.....σελ.57	

1)ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ι. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΙΩΝ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae. Το όνομα αυτής της οικογένειας είναι σύνθετο και προέρχεται από τα εξής συνθετικά: (α) pico-, το οποίο αναφέρεται στο μικρό μέγεθος του γονιδιώματος των ιών αυτών, (β) από τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος που διαθέτει ως γένωμα, δηλαδή το RNA. Άλλα μέλη της οικογένειας των Picornaviridae είναι ο ρινοϊός, ο ιός της ηπατίτιδας Α και ο FMDV (foot-and-mouth-disease virus). Όσο αφορά το γένωμα των εντεροϊών, αυτό είναι μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας (δηλαδή ίδιας πολικότητας με το mRNA).

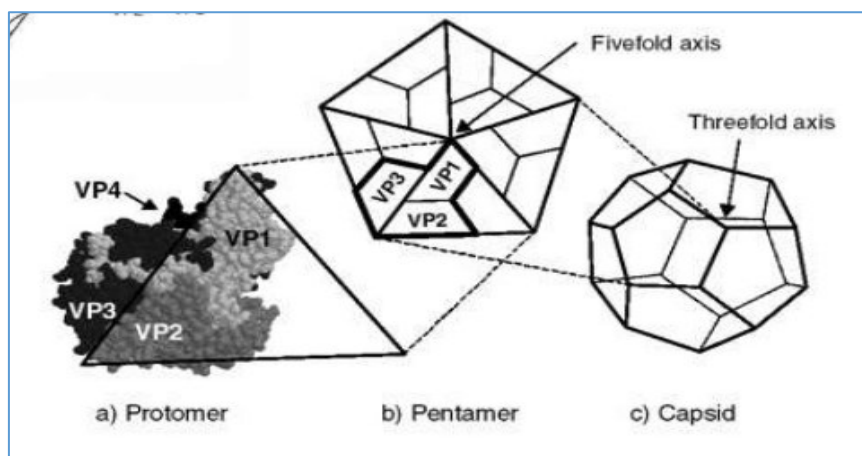
(α) ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η οικογένεια των Picorna-ιών περιλαμβάνει 50 είδη, τα οποία ταξινομούνται σε 29 γένη. Τα γένη είναι τα εξής: Arthonvirus, Aquamavirus, Avihepatovirus, Avisivirus, Cardiovirus, Cosavirus, Dicipivirus, Enterovirus, Erbovirus, Gallivirus, Hepatovirus, Hunnivirus, Kobuvirus, Kunsagivirus, Megrivirus, Mischivirus, Mosavirus, Oscivirus, Parechovirus, Pasivirus, Passervirus, Rosavirus, Sakobuvirus, Salivirus, Sapelovirus, Senecavirus, Sicinivirus, Teschovirus, Tremovirus. Οι εντεροϊοί αποτελούν ίσως το πιο σημαντικό γένος και απαρτίζονται από πολιοϊούς (3), Coxsackie A (23), Coxsackie B (6), Echovirus (28), καθώς και εντεροϊούς που δεν έχουν ταξινομηθεί ακόμα (68-71).

(β) ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Οι εντεροϊοί, όπως και όλοι οι Picorna ιοί, είναι εξ' ορισμού μικροί RNA ιοί, οι οποίοι περιβάλλονται από ένα μη ελυτροφόρο καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Τα καψίδια των Picorna ιών είναι σφαιρικά, με διάμετρο περίπου 30nm (εικόνα 1). Τα σωματίδια είναι απλά και αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA. Τα καψίδια στερούνται λιπιδικού φακέλου και έχουν χαμηλή μολυσματικότητα σε οργανικούς διαλύτες. Ακόμη, είναι σταθερά σε τιμές pH από 3 και κάτω. Σε

αυτές τις τιμές pH διατηρούν και τη μολυσματικότητα τους. Αποτελούνται από 4 δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 & VP4. Ύστερα από πολλές μελέτες με περίθλαση ακτίνων Χ, όπως επίσης και βιοχημικές μελέτες, οι επιστήμονες κατέληξαν στην υπόθεση ότι το καψίδιο των εντεροϊών αποτελείται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρικό πλέγμα.

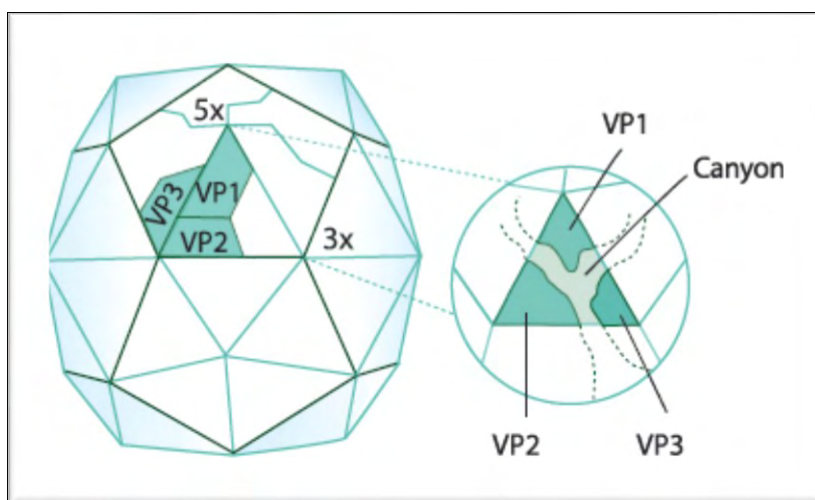


Εικόνα 1: Δομική οργάνωση του καψιδίου ενός εντεροϊού. (α) Κάθε πρωτομερές σχηματίζεται από τα προϊόντα της πρωτεολυτικής πέψης της πολύ-πρωτεΐνης P1, δηλαδή από τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1 έως VP4. Η επιφάνεια του ιικού σωματιδίου σχηματίζεται από τις VP1, VP2, VP3 ενώ η VP4 είναι τοποθετημένη εσωτερικά. (β) Πέντε πρωτομερή ενώνονται σε ένα πενταμερές. Απεικονίζεται ο άξονας πενταμερούς συμμετρίας αυτών. (γ) Ένα εικοσαεδρικό καψίδιο συνίσταται από 12 πενταμερή. Σημαίνεται ένας από τους 20 άξονες τριμερούς συμμετρίας του καψιδίου. Ανατύπωση από: *The VP1 intracapsid hook and uncoating of Enterovirus*. Antero Airaksinen 2000

Το βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου είναι το πρωτομερές. Το πρωτομερές συντίθεται από 4 δομικές πρωτεΐνες, τις VP1, VP2, VP3 και VP4. Το κέλυφος σχηματίζεται από τις VP1, VP2 και VP3, ενώ η VP4 εντοπίζεται στην εσωτερική επιφάνεια αυτού (εικόνα 1). Οι VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία στην αλληλουχία τους, παρόλα αυτά και οι 3 πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β-βαρελίου. Η περιοχή αυτή είναι μια γωνιακή δομή που σχηματίζεται από δύο αντιπαράλληλα β-φύλλα. Το ένα β-φύλλο σχηματίζει τον «τοίχο» της γωνίας, ενώ το άλλο β-φύλλο (το οποίο έχει μια κάμψη στο κέντρο) σχηματίζει ταυτόχρονα και τον «τοίχο» αλλά και το «πάτωμα» της γωνίας. Η γωνιακή αυτή δομή διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων, έτσι ώστε να σχηματίσουν ένα πυκνό, άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα. Το πακετάρισμα των περιοχών των β-βαρελίων ενισχύεται από ένα δίκτυο αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης - πρωτεΐνης στο εσωτερικό του καψιδίου, και πιο συγκεκριμένα γύρω από τον πενταπλό άξονα. Αυτό το δίκτυο, το οποίο σχηματίζεται από τα N-τελικά άκρα των πρωτεϊνών VP1, VP3 & VP4, είναι απαραίτητο για τη

σταθερότητα του ισωματίου. Η πρωτεΐνη VP4 διαφέρει από τις υπόλοιπες τρεις. Έχει παρόμοια τοποθέτηση και διαμόρφωση όπως οι N-τελικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών VP1 & VP3 και λειτουργεί ως μια απομονωμένη N-τελική επέκταση της VP2, παρά ως μια ξεχωριστή καψιδιακή πρωτεΐνη. Οι κύριες δομικές διαφορές που παρατηρούνται στις πρωτεΐνες VP1, VP2 & VP3, εντοπίζονται στις θηλιές που συνδέουν τα β-strands με τις N-τελικές και C-τελικές αλληλουχίες που προεξέχουν από την περιοχή του β-βαρελιού. Αυτές οι αμινοξικές αλληλουχίες είναι που δίνουν στους ρικορνα-ιούς διακριτή μορφολογία και αντιγονικότητα. Το C-τελικό άκρο εντοπίζεται στην επιφάνεια του ισωματίου και το N-τελικό άκρο στο εσωτερικό.

Σχετικά με την επιφάνεια του ισωματίου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δομών των πολιοϊών και των ανθρώπινων ρινοϊών, η οποία αποκάλυψε πως έχουν μια συρρικνωμένη τοπογραφία. Μια προεξοχή (plateau), βρίσκεται στον πενταπλό άξονα συμμετρίας, περιβαλλόμενη από μία αυλάκωση (canyon) και υπάρχει ακόμη μια προεξοχή στον τριπλό άξονα συμμετρίας (εικόνα 2). Αρχικά, προτάθηκε πως το canyon είναι το σημείο πρόσδεσης του ιού με τον υποδοχέα, και η υπόθεση αυτή έχει αποδειχθεί για ένα μεγάλο αριθμό εντεροϊών.



Εικόνα 2: Απεικόνιση του canyon. Ανατύπωση από *Initiation à la virologie*.

Όσο αφορά το εσωτερικό του ισωματίου, υπάρχει ένα δίκτυο το οποίο σχηματίζεται από τα N-τελικά άκρα του εσωτερικού του καψιδίου και παίζει σημαντικό ρόλο στην σταθερότητα του ισωματίου. Στον πενταμερή άξονα συμμετρίας, τα N-τελικά άκρα 5 μορίων VP3, σχηματίζουν ένα κυλινδρικό παράλληλο β-φύλλο. Η δομή αυτή περιβάλλεται από 5 β-φύλλα τα οποία

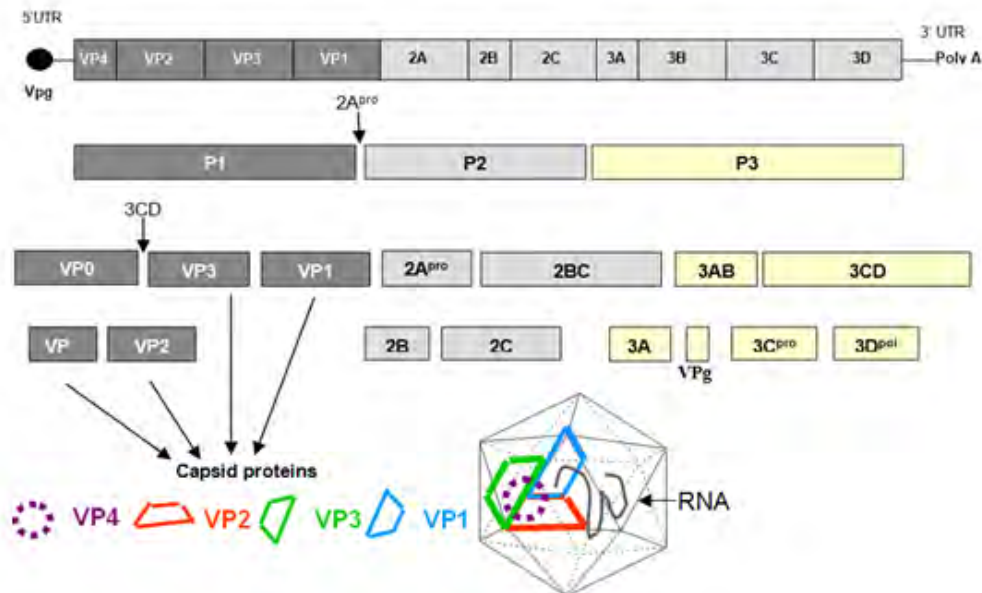
σχηματίζονται από τα N-τελικά άκρα των πρωτεϊνών VP1 & VP4. Η δομή αυτή περιβάλλεται από πέντε τριπλά πλέγματα β-φύλλων, τα οποία σχηματίζονται από τα N-τελικά άκρα των VP4 & VP1. Η ομάδα του μυριστικού η οποία είναι προσκολλημένη στο N-τελικό άκρο της VP4, διαμεσολαβεί την αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών των δύο δομών (Chow M, Newman JF, Filman D 1987).

(c) ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Το γένωμα των picorna-ιών είναι μονόκλωνο RNA (ssRNA) θετικής πολικότητας (εικόνα 3). Το ιικό RNA είναι μολυσματικό, διότι μεταφράζεται κατά την είσοδό του στο κύτταρο-ξενιστή έτσι ώστε να παράγει όλες τις ιικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για να πραγματοποιηθεί η αντιγραφή του ιού. Το RNA των picorna-ιών είναι μοναδικό γιατί συνδέεται ομοιοπολικά στο 5'-άκρο με μια πρωτεΐνη η οποία ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome-linked) (Flanegan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. 1977, Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. 1977). Το μήκος της VPg διαφέρει στους διάφορους picorna-ιούς και κυμαίνεται από 22-24 αμινοξικά κατάλοιπα. Κωδικοποιείται από ένα μοναδικό ιικό γονίδιο, εκτός από την περίπτωση του γενώματος του FMDV, που κωδικοποιείται από 3 διαφορετικά γονίδια (Forss S, Schaller H. 1982). Το ιικό mRNA συνδέεται με τα ριβοσώματα του κυττάρου-ξενιστή για να υποστεί μετάφραση. Σε αυτό το στάδιο η VPg δεν εντοπίζεται στο mRNA. Αυτό το mRNA διαθέτει μόνο την pU (5'-φωσφορική ουριδίνη) στο 5'-άκρο. Το mRNA λοιπόν διαφέρει από το ιικό RNA μόνο ως προς την έλλειψη της VPg (Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al. 1977, Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. 1978). Η VPg απομακρύνεται από το ιικό RNA με τη δράση μια πρωτεΐνης του ξενιστή που ονομάζεται ένζυμο αποσύνδεσης (unlinking enzyme) (Ambros V, Petterson RF, Baltimore D. 1978). Δεν είναι ακόμα γνωστό εάν η απομάκρυνση της VPg είναι προαπαιτούμενο για τη σύνδεση του ιικού RNA με τα ριβοσώματα, ή αν είναι αποτέλεσμα της σύνδεσης αυτής. Η VPg υπάρχει στις αριγενείς αλυσίδες RNA του αντιγραφόμενου ενδιάμεσου RNA, όπως επίσης και στο RNA αρνητικής πολικότητας. Αυτό, οδήγησε στην πρόταση πως η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του

RNA των πολιοϊών (Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al. 1977, Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. 1978).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του RNA διάφορων picorna-ιών, αποκάλυψε πως υπάρχει ένα κοινό μοτίβο οργάνωσης του γονιδιώματος τους. (εικόνα 3)



Εικόνα 3: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών. Πάνω: 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. Κάτω: Ο τεμαχισμός της αρχικής πολύ-πρωτεϊνής αρχικά σε τρεις περιοχές P1, P2 και P3, στη συνέχεια στα ενδιάμεσα των ιικών πρωτεϊνών και τέλος στις τελικές πρωτεΐνες του ιού. Ανατύπωση από: *Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the enteroviruses*.

Το μήκος του γονιδιώματος κυμαίνεται από 7-8.8 Kb. Η 5'- UTR έχει μεγάλο μήκος (0.5-1.5 Kb) και είναι υψηλά συντηρημένη. Η περιοχή αυτή περιλαμβάνει αλληλουχίες οι οποίες ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση. Ακόμη, διαθέτει το στοιχείο IRES (εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος), το οποίο κατευθύνει τη μετάφραση του mRNA μέσω εσωτερικής πρόσδεσης του ριβοσώματος. Η 5'- UTR των arthoviruses, cardioviruses, & erboviruses διαθέτει μια poly(C) αλληλουχία, η οποία διαφέρει σε μήκος ανάμεσα στα διάφορα στελέχη ιών. Στους cardioviruses, μεγαλύτερο μήκος της poly(C) αλληλουχίας, σχετίζεται και με υψηλότερη μολυσματικότητα στα ζώα (Hahn H, Palmenberg AC 1995, LaRue R, Myers S, Brewer L, Shaw DP, Brown C, Seal BS, Njenga MK. 2003).

Η 3'-UTR των *ricorna*-ιών είναι μικρή και κυμαίνεται σε μήκος από 40-330 νουκλεοτίδια. Η περιοχή αυτή μπορεί να διαθέτει και μια δευτεροταγή δομή, έναν ψευδοκόμβο (*pseudoknot*), η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιικού RNA (Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. 2003). Παρόλα αυτά, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3'-UTR των πολιοϊών και των ρινοϊών για τη μολυσματικότητα (Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al. 2005, Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. 1977). Το ιικό RNA, όπως και το mRNA διαθέτουν μια poly(A) ουρά στο 3'-άκρο (Yogo Y, Wimmer E. 1972). Το RNA αρνητικής πολικότητας διαθέτει μια 5'-poly(U) ουρά, με βάση την οποία θα σχηματιστεί η 3'-poly(A) ουρά στο RNA θετικής πολικότητας (Yogo Y, Teng MH, Wimmer E. 1974). Το μέσο μήκος της poly(A) ουράς ποικίλει από 35 νουκλεοτίδια στον *encephalomyocarditis virus* μέχρι 100 νουκλεοτίδια στον *arphthonivirus*. Το ιικό RNA από το οποίο έχει αφαιρεθεί η poly(A) ουρά παύει να είναι μολυσματικό.

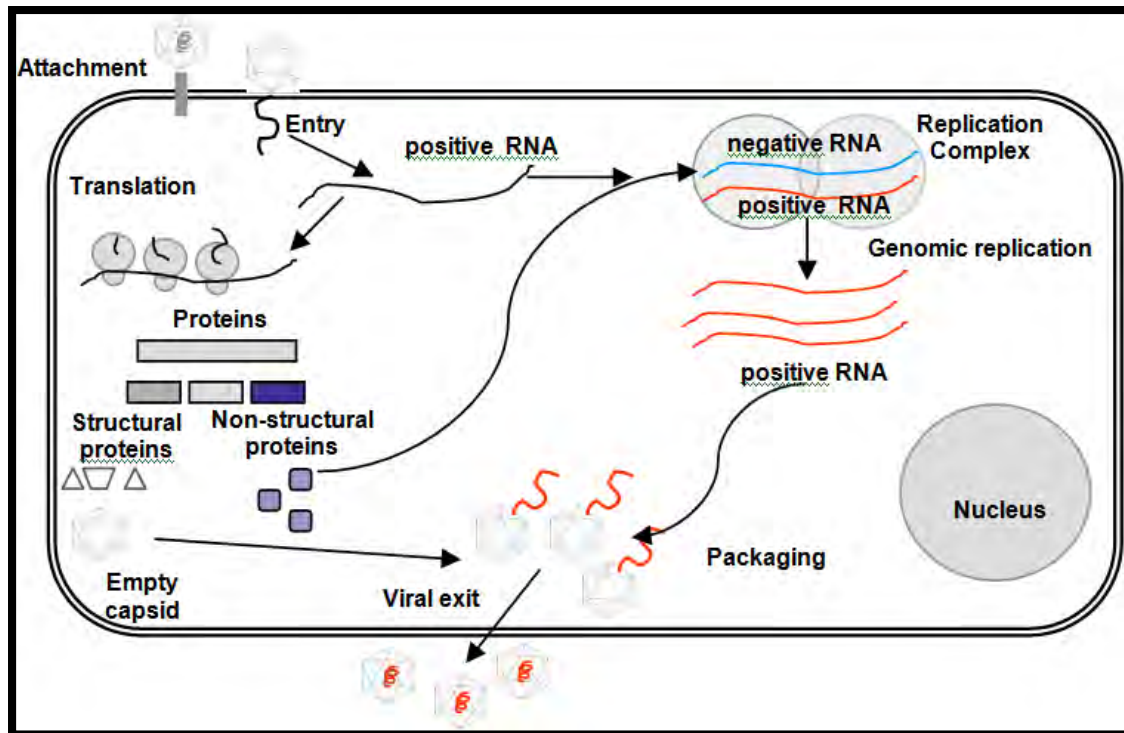
Αποτελέσματα βιοχημικών μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε κύτταρα που έχουν προσβληθεί από πολιοϊό έχουν δείξει την παρουσία ενός μοναδικού, μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ιικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται έτσι ώστε να σχηματίσει τις μεμονωμένες ιικές πρωτεΐνες (Summers DF, Maizel JV. 1968). Η υπόθεση αυτή αποδείχθηκε όταν καθορίστηκε η αλληλουχία ολόκληρου του γονιδιώματος του πολιοϊού και έδειξε ότι το γονιδίωμα του πολιοϊού κωδικοποιεί για ένα μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης. Μια παρόμοια στρατηγική για την έκφραση των ιικών γονιδίων υπάρχει και στους υπόλοιπους *ricorna*-ιούς. Η πολύ-πρωτεΐνη τεμαχίζεται κατά τη μετάφραση, συνεπώς το προϊόν πλήρους μήκους δεν παρατηρείται. Ο τεμαχισμός πραγματοποιείται από πρωτεΐνάσες οι οποίες κωδικοποιούνται από το ιικό γονιδίωμα και σαν αποτέλεσμα παράγονται 11-15 τελικά προϊόντα τεμαχισμού. Μερικά από τα προϊόντα που δεν τεμαχίζονται, παίζουν ρόλο στην

αντιγραφή.

Η πολύ-πρωτεΐνη των *ricorna*-ιών χωρίζεται σε 3 περιοχές: P1, P2 & P3 (εικόνα 3). Το γονιδίωμα ορισμένων *ricorna*-ιών κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη Leader (L) πριν την περιοχή P1. Η περιοχή P1 κωδικοποιεί για τις καψιδιακές πρωτεΐνες ενώ οι περιοχές P2 & P3 κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες εμπλέκονται στην επεξεργασία άλλων πρωτεϊνών (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) και στην αντιγραφή του γονιδιώματος (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}).

ii. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Ο πολλαπλασιασμός των ρινοφαίικών πραγματοποιείται εξ' ολοκλήρου στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων-ξενιστών. Το πρώτο βήμα του ιικού κύκλου, περιλαμβάνει την πρόσδεση του ιού σε έναν κυτταρικό υποδοχέα (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Απεικόνιση του κύκλου ζωής των εντεροϊών. Ανατύπωση από: Viruses and Type 1 Diabetes: Focus on the enteroviruses.

Ακολουθεί το ξεδίπλωμα του ιικού RNA, μια διαδικασία η οποία περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Μετά την είσοδο του RNA θετικής πολικότητας στο κυτταρόπλασμα, ακολουθεί η μετάφρασή του, προκειμένου να παραχθούν οι ιικές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του γενώματος του ιού και την παραγωγή νέων ιικών σωματίων. Οι ιικές πρωτεΐνες συντίθενται από ένα πολύ-πρωτεϊνικό πρόδρομο μόριο, το οποίο πρωτεολύεται με τη δράση κυρίως των πρωτεϊνολυσών 2A^{pro} & 3C^{pro} ή 3CD^{pro}. Μεταξύ των πρωτεϊνών που προκύπτουν από την πέψη, περιλαμβάνεται η RNA-εξαρτώμενη RNA

πολυμεράση, καθώς και πρόσθετες πρωτεΐνες οι οποίες είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του γενώματος και τη σύνθεση του ιικού mRNA.

Κατά τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος των Picorna ιών, πραγματοποιείται αρχικά η αντιγραφή του εισαχθέντος μορίου RNA θετικής πολικότητας, για την παραγωγή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA αρνητικής πολικότητας. Αυτή η διαδικασία ακολουθείται από την παραγωγή επιπρόσθετων αλυσίδων RNA θετικής πολικότητας. Τα προαναφερθέντα γεγονότα λαμβάνουν χώρα πάνω στην επιφάνεια μικρών μεμβρανικών κυστιδίων του κυττάρου-ξενιστή. Από τη στιγμή που θα παραχθεί ένα ικανοποιητικό μέγεθος καψιδιακών πρωτεϊνών αρχίζει η διαδικασία της καψιδίωσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει μια αρχική πρωτεόλυση του πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου P1, για το σχηματισμό ενός ανώριμου πρωτομερούς, το οποίο στη συνέχεια ενώνεται με άλλα πρωτομερή, για να σχηματίσει τα σταθερά πλέον, πενταμερή. Τα πενταμερή συνδέονται με τα νεοσυντιθέμενα μόρια RNA θετικής πολικότητας, σχηματίζοντας ένα μολυσματικό πλέον ιό.

Ο χρόνος που απαιτείται για να ολοκληρωθεί ένας πλήρης κύκλος αντιγραφής κυμαίνεται στις 5-10 ώρες. Ο χρόνος αυτός εξαρτάται από πολλές μεταβλητές, όπως για παράδειγμα τη θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο-ξενιστή, τον συγκεκριμένο ιό που προσβάλλει το κύτταρο καθώς και την πολλαπλότητα της μόλυνσης.

(a) ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΣΤΟΥΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥΣ ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ, ΕΙΣΟΔΟΣ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ & ΑΠΕΚΔΥΣΗ ΤΩΝ ΙΩΝ

Όπως οι περισσότεροι ιοί, έτσι και οι picorna-ιοί, ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με την πρόσδεση τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου-ξενιστή. Η φύση των υποδοχέων των picorna-ιών παρέμενε ασαφής μέχρι το 1989, που ταυτοποιήθηκαν οι υποδοχείς για τον πολιοϊό και τους ρινοϊούς (Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al. 1989, Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. 1989, Ohlmann T, Rau M, Morley SJ, et al. 1995). Από τότε, έχουν ταυτοποιηθεί οι υποδοχείς και για άλλα μέλη της οικογένειας αυτής. Διαφορετικοί τύποι μορίων που εντοπίζονται στη μεμβράνη του

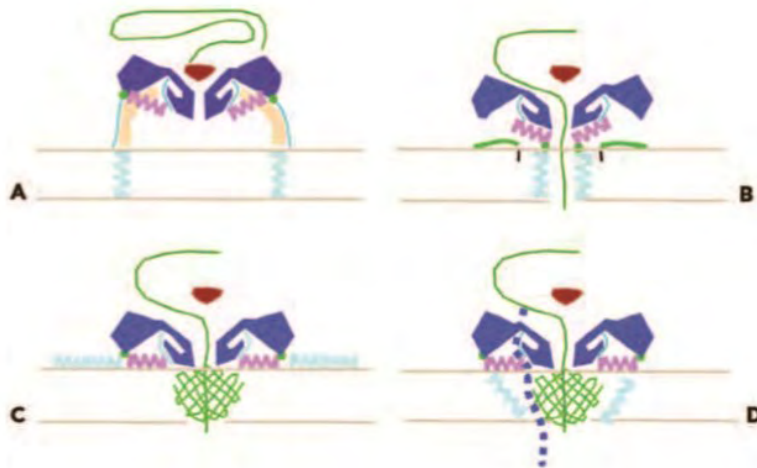
κυττάρου-ξενιστή μπορούν να λειτουργήσουν ως κυτταρικοί υποδοχείς για τους ρικορνα-ιούς. Για κάποιους ρικορνα-ιούς ένας μόνο τύπος υποδοχέα είναι επαρκής έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η είσοδος του ιού στο κύτταρο. Υπάρχουν όμως και άλλοι ιοί οι οποίοι απαιτούν την ύπαρξη και ενός δεύτερου μορίου, ή συν-υποδοχέα, για την είσοδο του ιού στο κύτταρο.

Όπως προαναφέρθηκε, το καψίδιο των ρικορνα ιών συγκροτείται από αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών, τα οποία τοποθετούνται σε εικοσαεδρική συμμετρία. Μεταξύ των διαφορετικών μελών της οικογένειας παρατηρούνται ομοιότητες ως προς την τοποθέτηση των καψιδιακών πρωτεϊνών, όμως η αρχιτεκτονική της καψιδιακής επιφάνειας διαφοροποιείται. Αυτή η διαφοροποίηση δεν σχετίζεται μόνο με τον ορότυπο, αλλά και με το διαφορετικό τρόπο αλληλεπίδρασης των διαφορετικών ειδών εντεροϊών με τους υποδοχείς τους. Μάλιστα, έχειδειχθεί πως οι θέσεις αλληλεπίδρασης με τους κυτταρικούς υποδοχείς εντοπίζονται στις αύλακες του καψιδίου με αποτέλεσμα τυχόν μεταλλαγές σε αμινοξέα της αύλακας να επηρεάζουν τη συγγένεια πρόσδεσης με τους υποδοχείς.

Μόλις πραγματοποιηθεί η σύνδεση των ρικορνα-ιών με τους υποδοχείς τους, το καψίδιο του ιού υφίσταται ενδοκύττωση και ακολουθεί η απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρόπλασμα, δηλαδή στο σημείο της αντιγραφής του. Για κάποιους ρικορνα-ιούς η αλληλεπίδραση με τον κυτταρικό υποδοχέα εξυπηρετεί μόνο τη συγκέντρωση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια. Η απελευθέρωση, στη συνέχεια, του γενώματος του ιού είναι αποτέλεσμα του χαμηλού pH ή της δράσης κάποιου συν-υποδοχέα. Για άλλους ρικορνα ιούς, ο κυτταρικός υποδοχέας επάγει την έναρξη δομικών αλλαγών στο καψίδιο οι οποίες φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιτυχή είσοδο των ιών στα κύτταρα-ξενιστές και συνεπώς τη μολυσματικότητα τους.

Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η *in vitro* πρόσδεση εντεροϊών σε διαλυτό μονομερή πρωτεϊνικό υποδοχέα, προκαλεί μια αμετάκλητη δομική αλλαγή στο ιικό σωματίο. Οι δομικές αυτές ανακατατάξεις οδηγούν στη δημιουργία σωματίων A (altered particles). Σε αυτές τις αλλαγές, περιλαμβάνονται απώλεια της VP4 καψιδιακής πρωτεΐνης και εξωτερίκευση του N-τελικού άκρου της VP1 των σωματίων A, η οποία υπό κανονικές συνθήκες (στα αρχικά ιικά σωματίια) εντοπίζεται στο εσωτερικό τμήμα του καψιδίου, περιβάλλοντας τις πενταμερείς κορυφές του ώριμου ιοσώματος

(Fricks CE, Hogle JM. 1990) . Το προεξέχον πλέον άκρο της VP1 είναι υδρόφοβο. Συνεπώς, τα σωμάτια A έχουν αυξημένη συγγένεια για σύνδεση με τη μεμβράνη, συγκριτικά με τα αρχικά ιικά σωμάτια. Θεωρείται πως τα σωμάτια A αντιπροσωπεύουν μια σταθερή ενδιάμεση δομή στη διαδικασία της εισόδου του ιού, η οποία τερματίζεται με την έξοδο του RNA και την παραγωγή άδειων (80S) καψιδίων. Το προεξέχον N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στη μεμβράνη του κυττάρου και κατά αυτόν τον τρόπο το σωμάτιο A προσδένεται σε αυτήν. Στη συνέχεια σχηματίζεται ένας πόρος, πιθανώς από τις VP4 & VP1, διαμέσου του οποίου το γένωμα του ιού εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμός για την μετατόπιση του RNA μέσα από την κυτταρική μεμβράνη:
(A) Απεικονίζεται η εγκάρσια τομή ενός ιικού σωματίου που μόλις έχει προσδεθεί στον υποδοχέα της επιφάνειας του κυττάρου-ξενιστή. Η πρόσδεση του υποδοχέα γίνεται στο canyon, πάνω από την υδρόφοβη κοιλότητα του ιοσωματίου. Το ιικό RNA βρίσκεται μέσα στο καψίδιο. Το καψίδιο είναι χρωματισμένο μπλε, η πρωτεΐνη VP4 είναι με πράσινο χρώμα, το N-τελικό άκρο της VP1 είναι το αχνό μπλε και το μωβ, το RNA είναι η πράσινη γραμμή και ο υποδοχέας το ανοιχτό καφέ. Σε αυτό το στάδιο, ο β-κύλινδρος της VP3 (κόκκινο), μπλοκάρει το κανάλι στον πενταμερή άξονα συμμετρίας. **(B)** Αμφιπαθείς έλικες στο N-τελικό άκρο της VP1, σχηματίζουν έναν πόρο διαμέσου της μεμβράνης. **(C & D)** Η VP4 παίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του πόρου. Σε αυτή την περίπτωση, η VP1 μπορεί να αγκυροβολήσει το σωμάτιο στη μεμβράνη. Ανατύπωση από: Fields Virology, 6th Ed.

Η προαναφερθείσα υπόθεση ενισχύεται από πρόσφατες πειραματικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι η προσθήκη σωματίων A σε λιπιδικές διπλοστιβάδες επάγει τη δημιουργία ιοντικών καναλιών.

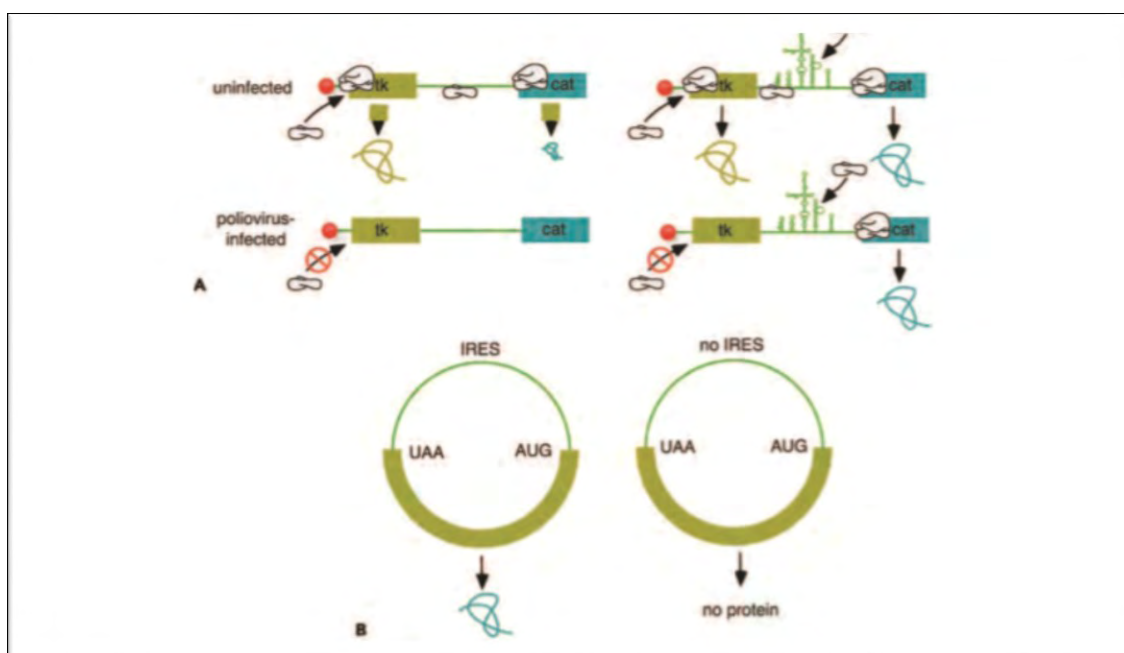
Ανεξαρτήτως του τρόπου εισόδου, διάφορα κυτταρικά μόρια πιστεύεται ότι σχετίζονται με τη ρύθμιση του ξεδιπλώματος των εντεροϊών. Έχει λοιπόν

δειχθεί ότι η υδρόφοβη κοιλότητα (hydrophobic pocket) που εντοπίζεται κάτω από την επιφάνεια κάθε πρωτομερούς, είναι βασικός ρυθμιστής των δομικών μεταβολών που επάγονται από τον υποδοχέα των εντεροϊών. Κάθε τέτοια κοιλότητα καταλαμβάνεται από έναν φυσικό συνδέτη, ο οποίος είναι λιπαρό οξύ ή κάποια παρόμοια ένωση. Η εικοσαεδρική συμμετρία του καψιδίου των εντεροϊών επιτρέπει στην κοιλότητα αυτή να περιέχει έως και 60 λιπιδικά μόρια. Πιστεύεται πως τα λιπίδια αυτά συμβάλλουν στη σταθερότητα του ιού και ελέγχουν την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές αλλαγές, κατά την προσκόλληση του σε κυτταρικούς υποδοχείς, για την τελική απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κυτταρικό περιβάλλον. Την παραπάνω υπόθεση ενισχύουν μελέτες, κατά τις οποίες η χρήση αντι-ιικών φαρμάκων (όπως το παρασκευάσμα WIN) , τα οποία έχουν τη δυνατότητα να εκτοπίζουν λιπίδια και να προσδένονται σταθερά στην υδρόφοβη κοιλότητα των εντεροϊών, παρεμποδίζουν τη μολυσματικότητα των ιών. Η αλλοίωση της χωροδιάταξης του κατώτερου τμήματος της αύλακας, που προκαλούν τα παρασκευάσματα αυτά, αναστέλλει τελικά την προσκόλληση των ιών στους κυτταρικούς υποδοχείς.

(b) ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ RNA

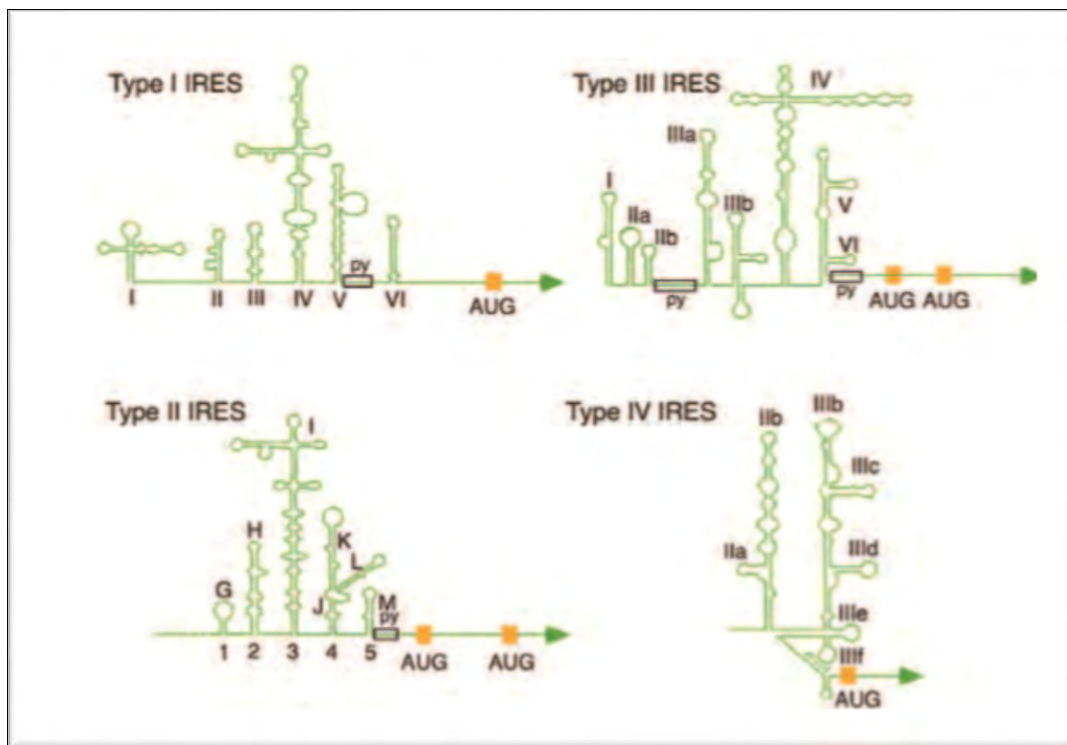
Μόλις το RNA θετικής πολικότητας του ιού εισέλθει στο κυτταρόπλασμα του κυτάρου-ξενιστή, πρέπει να μεταφραστεί γιατί δεν μπορεί να αντιγραφεί από καμία κυτταρική RNA-πολυμεράση και κανένα ένζυμο του ιού δεν έχει εισέλθει στο κυτταρόπλασμα μέσω του καψιδίου. Πολλά πειραματικά αποτελέσματα οδήγησαν στην πεποίθηση πως η μετάφραση του γενώματος των εντεροϊών επιτυγχάνεται μέσω ενός ασυνήθιστου μηχανισμού. Το RNA θετικής πολικότητας στερείται 5'-καλύμματος (5'-cap). Παρόλα αυτά, διαθέτει την VPg (ιική πρωτεΐνη) η οποία όμως απομακρύνεται από ένα κυτταρικό ένζυμο αποσύνδεσης, μόλις το RNA εισέλθει στο κύτταρο (Ambros V, Baltimore D. 1980). Επιπλέον, το γονιδίωμα των picorna-ιών μεταφράζεται στα κύτταρα-ξενιστές, παρόλο που προκαλεί αναστολή της μετάφρασης των κυτταρικών mRNAs. Ο καθορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του RNA θετικής πολικότητας του πολιοϊού, αποκάλυψε μια αλληλουχία 741 νουκλεοτιδίων

στην 5'-UTR η οποία περιέχει 7 κωδικόνια AUG. Παρόμοιες αλληλουχίες βρέθηκαν στην 5'-UTR και άλλων ρικοσπαιών και δείχθηκε πως διαθέτουν υψηλά συντηρημένες δομές RNA. Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στην πεποίθηση πως τα ριβοσώματα δεν «σκανάρουν» την 5'-UTR αλλά προσδένονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Εν συνεχεία δείχθηκε πως η 5'-UTR του RNA θετικής πολικότητας του πολιοϊού διαθέτει μια αλληλουχία η οποία προάγει την εσωτερική πρόσδεση της 40s υπομονάδας του ριβοσώματος. Η αλληλουχία αυτή ονομάστηκε IRES (Internal Ribosome Entry Site) (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ανακάλυψη του στοιχείου IRES: (A) Έγινε εφαρμογή μιας μεθόδου με τη χρήση δικιστρονικού mRNA για να ανακαλυφθεί το IRES. Κατασκευάστηκαν πλασμίδια που κωδικοποιούν δύο μόρια-μάρτυρες, την κινάση της θυμιδίνης (tk) και την ακετυλοτρανσφεράση της χλωραμφενικόλης (cat). Η αλληλουχία των δύο μαρτύρων διακόπτονταν από το IRES ή από ένα κενό διάστημα. Μετά την εισαγωγή των πλασμιδίων σε κύτταρα θηλαστικών, άρχισε η έκφραση τους και έδωσαν mRNA όπως φαίνεται στην εικόνα. Στην πάνω σειρά όπου απεικονίζονται κύτταρα που δεν έχουν μολυνθεί με πολιοϊό, και τα δύο μόρια-μάρτυρες μπορούν να ανιχνευθούν, αν και η σύνθεση της cat είναι ανεπαρκής χωρίς το IRES. Στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από πολιοϊό η έναρξη που εξαρτάται από το 5'-άκρο παρεμποδίζεται και δεν ανιχνεύονται καθόλου πρωτεΐνες. Αυτό υποδεικνύει την εσωτερική δέσμευση του ριβοσώματος. (B) Μέθοδος με κυκλικό mRNA για την ανακάλυψη του IRES. Κυκλικά mRNA κατασκευάστηκαν και μεταφράστηκαν *in vitro* σε εκχυλίσματα κυττάρων. Απουσία του IRES, δεν παρατηρήθηκε καμία πρωτεΐνη γιατί η έναρξη που εξαρτάται από το 5'-άκρο, απαιτεί ένα ελεύθερο 5'-άκρο. Όταν το IRES συμπεριλαμβάνονταν στην κατασκευή, ήταν εφικτή η παραγωγή πρωτεϊνών από το κυκλικό mRNA, υποδεικνύοντας την εσωτερική πρόσδεση του ριβοσώματος. Ανατύπωση από: *Fields Virology 6th Ed.*

Όλοι οι *ricorna*-ιοί διαθέτουν το στοιχείο IRES στο RNA τους, όπως επίσης και κάποια κυτταρικά mRNAs. Τα ιικά στοιχεία IRES έχουν ταξινομηθεί σε 4 κατηγορίες, και η ταξινόμηση αυτή βασίζεται σε κριτήρια, όπως η πρωτοταγής ακολουθία, η δευτεροταγής δομή, η θέση του κωδικονίου έναρξης και η ενεργότητα τους σε διάφορους κυτταρικούς τύπους (εικόνα 7).

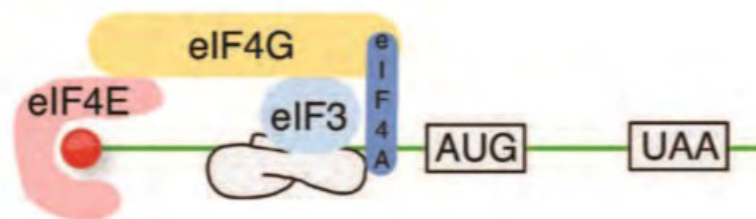


Εικόνα 7: Τέσσερις κύριοι τύποι των εσωτερικών σημείων πρόσδεσης των ριβοσωμάτων (IRES): Ο πρώτος τύπος IRES βρίσκεται στο γονιδίωμα των εντεροϊών. Το γονιδίωμα των *cardio*-ϊών & των *arhtho*-ϊών περιέχει τύπου II IRES. Το IRES του ιού της ηπατίτιδας A είναι τύπου III. Τύπου IV IRES εντοπίζονται σε *tescho*-ιούς που προσβάλλουν τους χοίρους. Ανατύπωση από *Fields Virology 6th Ed.*

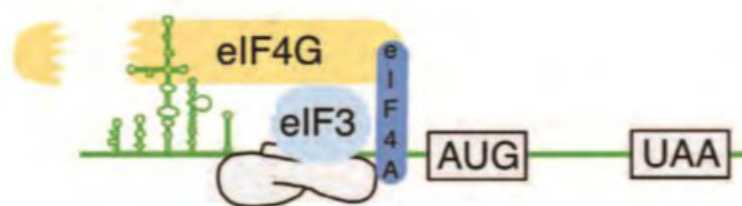
Η πρώτη κατηγορία (I IRES) εντοπίζεται στα γονιδιώματα εντεροϊών & ρινοϊών και το κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται 50-100 νουκλεοτίδια πριν το 3'-άκρο του IRES. Σε αυτή την κατηγορία, η μετάφραση ξεκινάει με την πρόσδεση της 40S υπομονάδας του ριβοσώματος στο στοιχείο IRES και «σκανάρισμα» του IRES για το κωδικόνιο έναρξης AUG. Η 40S υπομονάδα μπορεί να προσδεθεί κατευθείαν στο RNA ή να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες έναρξης της μετάφρασης και έτσι να προσδεθεί έμμεσα με το IRES. Σε κύτταρα τα οποία έχουν προσβληθεί από *ricorna*-ιούς ο παράγοντας eIF4G διασπάται, εμποδίζοντας έτσι τη μετάφραση των περισσότερων κυτταρικών mRNAs. Η παρατήρηση αυτή οδήγησε στην άποψη ότι ο eIF4G δεν απαιτείται

για τη λειτουργία του IRES του πολιοϊού και άλλων ρικορνα-ιών. Το C-τελικό άκρο του eIF4G όμως, το οποίο διαθέτει θέσεις σύνδεσης για τον eIF3 & eIF4A (εικόνα 7), επάγει τη μετάφραση η οποία διαμεσολαβείται από το στοιχείο IRES (Ohlmann T, Rau M, Morley SJ, et al. 1995).

5'-end dependent



IRES-dependent



Εικόνα 8: Μοντέλα για το σχηματισμό του συμπλόκου έναρξης της μετάφρασης: Στην έναρξη που εξαρτάται από το 5'-άκρο, η 40S υπομονάδα στρατολογείται στο mRNA μέσω της αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα eIF3, ο οποίος προσδένει τον eIF4G. Ο επόμενος παράγοντας έναρξης είναι μέρος του eIF4F, που περιλαμβάνει επίσης τον eIF4A (μια ελικάση για να ξεδιπλώσει τις δευτεροταγείς δομές RNA) καθώς και τον παράγοντα eIF4E (cap-binding πρωτεΐνη). Η πρόσδεση του παράγοντα eIF4E στην περιοχή της καλύπτρας, τον τοποθετεί κατ' επέκταση στο 5'-άκρο και με αυτόν τον τρόπο η 40S υπομονάδα προσδένεται στο mRNA. Στη μετάφραση που εξαρτάται από το IRES, η 5'-καλύπτρα δεν είναι απαραίτητη. Το σύμπλοκο eIF3-40S πιστεύεται ότι στρατολογείται στο RNA μέσω της αλληλεπίδρασης του παράγοντα eIF4G με το IRES. Ανατύπωση από: Fields Virology 6th Ed.

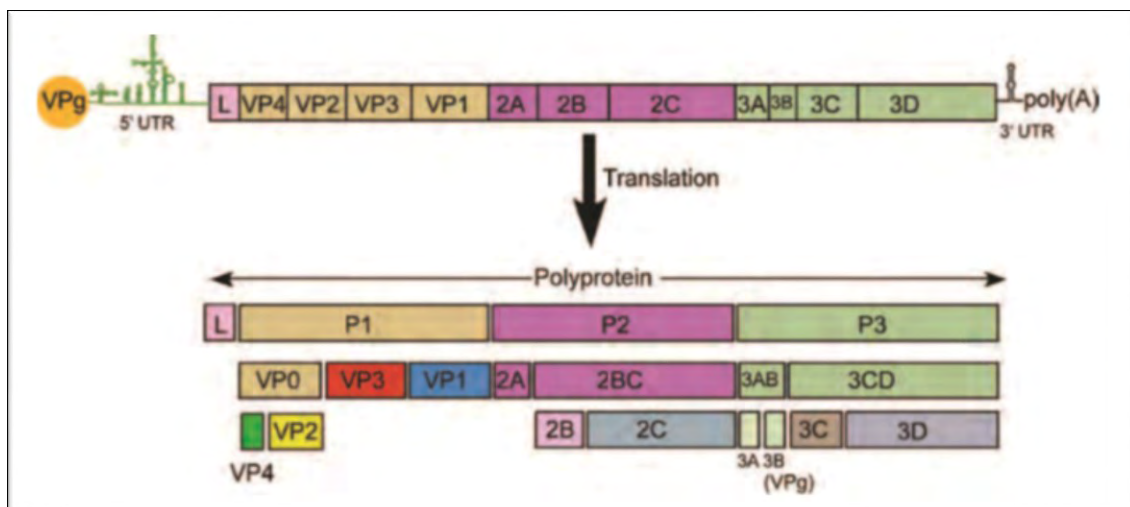
Αυτά τα ευρήματα οδήγησαν στη δημιουργία ενός μοντέλου, με βάση το οποίο η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος στρατολογείται στο στοιχείο IRES μέσω αλληλεπίδρασης με τον παράγοντα eIF3. Ο eIF3 είναι προσδεμένος στο C-τελικό άκρο του eIF4G και ο eIF4G προσδένεται απευθείας στο στοιχείο IRES.

Μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποια κυτταρική πρωτεΐνη που να είναι απαραίτητη για τη λειτουργία των στοιχείων IRES. Μια συνηθισμένη ιδιότητα

κυτταρικών πρωτεϊνών που να χρειάζεται για την ενεργότητα του IRES είναι ότι μπορούν να σχηματίσουν πολυμερή, με την πιθανότητα να επιδράσουν με το IRES σε πολλά σημεία. Η παρατήρηση αυτή έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι τέτοιες πρωτεΐνες μπορούν να λειτουργήσουν ως RNA-chaperones, διατηρώντας το IRES σε μια τέτοια δομή, έτσι ώστε να προσδεθεί απευθείας στην μεταγραφική «μηχανή». IRES τα οποία δεν χρειάζονται chaperones, μπορούν να αναδιπλωθούν κατάλληλα χωρίς αυτές τις κυτταρικές πρωτεΐνες.

(c) ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΗΣ ΙΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Το γονιδίωμα των *ricorna*-ιών κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), η μετάφραση του οποίου θα οδηγήσει στην παραγωγή των πρωτεϊνών του ιού. Αρχικά, δημιουργείται μια πολύ-πρωτεΐνη η οποία όμως διασπάται σε μικρότερα τμήματα από ιικές πρωτεϊνάσες (εικόνα 9).



Εικόνα 9: Οργάνωση του γονιδιώματος των *ricorna*-ιών: ΠΑΝΩ: Σχηματική απεικόνιση του RNA-γονιδιώματος. Απεικονίζονται: (α) η πρωτεΐνη VPg συνδεδεμένη στο 5'-άκρο (β) η 5'-UTR η οποία περιέχει και το στοιχείο IRES, (γ) η περιοχή του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του ιού, (δ) η 3'-αμετάφραστη περιοχή η οποία διαθέτει και μια δομή ψευδοκόμβου & (ε) η πολύ(A) ουρά. L είναι η πρωτεΐνη-οδηγός που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα των *erbo*-ιών *cardio*-ιών & *arhtho*-ιών αλλά όχι από άλλους *ricorna*-ιούς. **ΚΑΤΩ:** Διαδικασία επεξεργασίας της πολύ-πρωτεΐνης των *ricorna*-ιών. Ανατύπωση από: *Fields Virology 6th Ed.*

Η στρατηγική αυτή δίνει τη δυνατότητα να παραχθούν πολλές πρωτεΐνες, από ένα μόνο RNA, το οποίο αποτελεί και το γονιδίωμα του ιού. Η πολύ-πρωτεΐνη

δεν εντοπίζεται στα κύτταρα που έχουν μολυνθεί από τον ιό, διότι διασπάται κατευθείαν μόλις μεταφραστούν οι περιοχές του γονιδιώματος που κωδικοποιούν για τις πρωτεάσες. Οι πρωτεολυτικές διασπάσεις που πραγματοποιούνται, διακρίνονται σε πρωταρχικές ενδομοριακές αντιδράσεις cis-διάσπασης και δευτερογενείς διαμοριακές (cis και trans) πρωτεολυτικές αντιδράσεις. Όλοι οι ρινοη-ιοί κωδικοποιούν για τουλάχιστον μία πρωτεΐνωση 3C^{pro}/3CD^{pro}, και κάποιοι κωδικοποιούν για την L^{pro} ή την 2A^{pro}.

Σε κύτταρα τα οποία έχουν μολυνθεί από εντεροϊό, τα πρωταρχικά τμήματα που προκύπτουν είναι από την πρωτεόλυση μεταξύ P1 & P2. Η πρωτεόλυση αυτή επιτελείται από την πρωτεΐνωση 2A^{pro}. Υπάρχουν και κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες τεμαχίζονται από την 2A^{pro}, όπως οι παράγοντες eIF4GI, eIF4GII, Pabp & οι νουκλεοπορίνες (Grandi A, Svitkin YV, Imataka H, et al. 1998, Gustin KE, Sarnow P. 2001). Οι θέσεις πρωτεόλυσης για την 2A^{pro}, εντοπίζονται μεταξύ θρεονίνης-γλυκίνης και φαινυλαλανίνης-γλυκίνης σε κάποιους Coxsackie και Echo ιούς και μεταξύ τυροσίνης-γλυκίνης σε άλλους εντεροϊούς.

Σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί από εντεροϊούς και ρινοϊούς, το αρχικό πρωτεολυτικό ρήγμα της πολύ-πρωτεΐνης περιλαμβάνει την αποκοπή του πρόδρομου μορίου P1 από την αναπτυσσόμενη P2-P3 πολύ-πρωτεΐνη, με τη δράση της 2A^{pro}. Η ενεργότητα της 2A^{pro} δεν εξαρτάται από το αν θα έχει αποκοπεί από το πρόδρομο μόριο, αλλά για να δράσει η 3CD^{pro} στην P1, πρέπει η 2A^{pro} να αποκοπεί από την P1. Εν συνεχεία, η 3CD^{pro} απελευθερώνεται από την πρόδρομη πρωτεΐνη P3 μέσω αυτό-καταλυτικής διάσπασης και καταλύει δευτερογενείς διασπάσεις μεταξύ των δι-πεπτιδίων γλουταμίνης-γλυκίνης στο μόριο P1, πολύ πιο αποτελεσματικά από την 3C^{pro} (Jore J, De Geus B, Jackson RJ, et al. 1988). Η 3CD^{pro} και η 3C^{pro} επεξεργάζονται τα πρωτεϊνικά μόρια P2 & P3 με παρόμοια αποτελεσματικότητα. Η αλληλουχία της 3D^{pol} εντοπίζεται μέσα στο μόριο της 3CD^{pro} και είναι ίσως απαραίτητη για να αναγνωρίσει δομικά μοτίβα τις P1 πρωτεΐνης, επιτρέποντας έτσι στο τμήμα 3C^{pro} του ενζύμου να δράσει πιο αποτελεσματικά. Παρόλα αυτά, δεν απαιτούν όλοι οι ρινοη-ιοί την 3CD^{pro} για να επεξεργαστούν την P1 πρωτεΐνη. Οι arhtho-ιοί, οι cardio-ιοί & hepato-ιοί παράγουν την 3C^{pro}, η οποία έχει τη δυνατότητα να διασπάσει την P1 χωρίς επιπρόσθετες ιικές πρωτεϊνικές ακολουθίες.

Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής με την πολύ-πρωτεΐνη, είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το βαθμό και την έκταση της πρωτεολυτικής διαδικασίας. Αν η θραύση πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά σημεία, τότε παράγονται και πρωτεΐνες με διαφορετική δραστικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το εξής: η πρωτεΐνη 3CD^{pro} απαιτείται για την επεξεργασία της πρόδρομης πρωτεΐνης P1, η οποία ακολούθως θα δώσει τις καψιδιακές πρωτεΐνες. Η έκταση που θα συμβεί το παραπάνω γεγονός, εξαρτάται από το ποσό της 3CD^{pro} που θα παραχθεί. Επειδή η 3CD^{pro} δεν έχει δραστικότητα RNA πολυμεράσης, πρέπει να διασπαστεί έτσι ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή του RNA.

Μετά την παραγωγή των δομικών και λειτουργικών ιικών πρωτεϊνικών μορίων ακολουθεί η έναρξη της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος μέσω των πρωτεϊνών που περιγράφονται παρακάτω. Πρέπει να σημειωθεί ότι το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα, το οποίο αποτελεί και το τελευταίο στάδιο ωρίμανσης του καψιδίου και περιλαμβάνει τη δημιουργία των πρωτεϊνών VP2 και VP4 από την VP0, συντελείται αργότερα, μετά τον πολλαπλασιασμό των ιών εντός των νέο-συντιθέμενων καψιδίων και έχει προταθεί ότι πραγματοποιείται αυτό-καταλυτικά

(d) ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ & ΣΥΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΝΕΟΥ ΙΙΚΟΥ mRNA

Μετά την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο-ξενιστή, ακολουθεί η αντιγραφή του. Στους εντεροϊούς, το ιικό RNA (θετικής πολικότητας) πολλαπλασιάζεται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου αρνητικής πολικότητας και οδηγεί στην παραγωγή 50.000 περίπου αντιγράφων ανά μολυσμένο κύτταρο. Κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού, απαντούν στο κύτταρο τρεις μορφές RNA: μονόκλωνο RNA μόρια, ενδιάμεσα μόρια πολλαπλασιασμού (RI: Replicative Intermediates) και τέλος πολλαπλασιαστικές δομές (RF: Replicative Forms) . Από τις προαναφερθείσες δομές, απαντά σε μεγαλύτερο ποσοστό το μονόκλωνο RNA, το οποίο είναι αποκλειστικά θετικής πολικότητας. Η μορφή RI περιγράφεται ως μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας πάνω στο οποίο βρίσκονται συνδεδεμένες 6 έως 8 αναπτυσσόμενες αλυσίδες αρνητικής

πολικότητας, ενώ η μορφή RF αποτελεί μια δίκλωνη δομή, η οποία απαρτίζεται από ολόκληρο το ιικό RNA συνδεδεμένο με το συμπληρωματικό του αντίγραφο.

Η αναπαραγωγή του ιικού RNA είναι ασύμμετρη, καθώς η σύνθεση των θετικών μορίων RNA είναι κατά 25 έως 65 φορές μεγαλύτερη από εκείνη των αρνητικών μορίων RNA (Novak JE, Kirkegaard K. 1991).

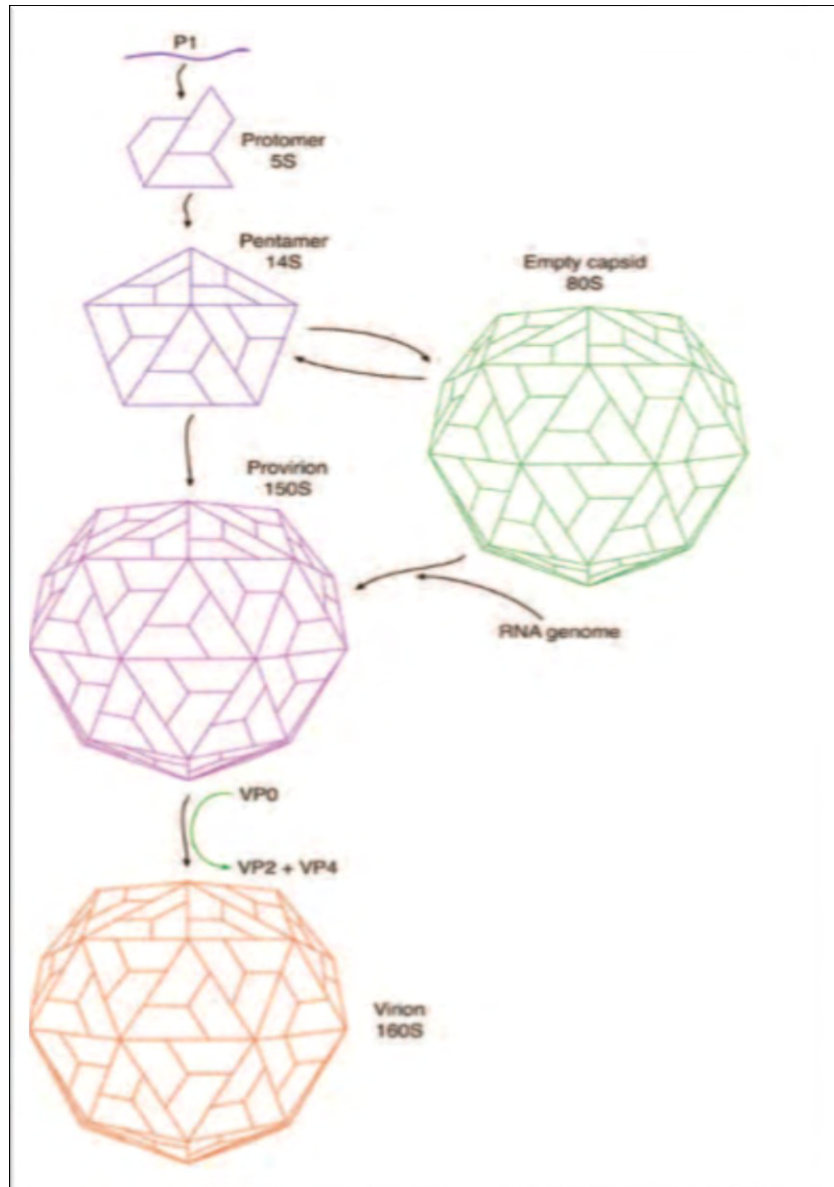
Η αντιγραφή καταλύεται από την RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση (3D^{pol}). Υπάρχουν και άλλες πρωτεΐνες, ιικές και κυτταρικές (όπως οι: 2BC, 2C, 3AB & 3C^{pro}), οι οποίες εντοπίστηκαν στο σύμπλοκο αντιγραφής του RNA. Η 3D^{pol} προκύπτει από τη διάσπαση μιας πρόδρομης πρωτεΐνης, της 3CD^{pro}. Η πρόδρομη αυτή πρωτεΐνη έχει δράση πρωτεΐνάσης, αλλά όχι πολυμεράσης. Η δράση της πολυμεράσης ξεκινάει όταν γίνει η διάσπαση και προκύψει η 3D^{pol}. Η 3D^{pol} για να ξεκινήσει την αντιγραφή του RNA χρειάζεται ως εκκινήτη μια αλληλουχία ολίγο-(U). Η ανακάλυψη ότι η πρωτεΐνη VPg είναι συνδεδεμένη στο RNA του πολιοϊού όπως επίσης και στο 5'-άκρο των νεοσυντιθέμενων αλυσίδων RNA (αρνητικής & θετικής πολικότητας), οδήγησε στην υπόθεση ότι πιθανώς η VPg εμπλέκεται στην έναρξη της σύνθεσης RNA. Η υπόθεση αυτή υποστηρίχθηκε από το ότι η VPg καθώς και η ουριδιλιωμένη της μορφή (VPg-ρUρU) βρέθηκαν σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί από πολιοϊό. Επομένως, ο ρόλος της ως εκκινήτης για την 3D^{pol} είναι ο εξής: Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται έτσι ώστε να σχηματιστεί μια αλληλουχία πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας στο RNA, ένα στοιχείο που δρα *cis*, ονομάζεται *cre* και εντοπίζεται στην κωδική περιοχή των *picorna*-ιών (Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al. 2000). Η λειτουργία του στοιχείου *cre* είναι ανεξάρτητη από τη θέση του στο γονιδίωμα και η θέση του διαφέρει μεταξύ των διάφορων ιών. Η πρωτεΐνη 3C λειτουργεί ως βασικός καθοριστής για τη δέσμευση στο RNA αλλά και η 3AB ίσως να εμπλέκεται στην αναγνώριση του στοιχείου *cre*. Το αν η ουριδιλίωση που συμβαίνει λόγω αναγνώρισης του στοιχείου *cre* συμβαίνει μόνο στο RNA θετικής πολικότητας, ή αν αφορά και τη σύνθεση του RNA αρνητικής πολικότητας, είναι ένα γεγονός αμφιλεγόμενο (Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al. 2003, Murray KE, Barton DJ. 2003).

Η σύνθεση του RNA των ricorna-ιών συντελείται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Η μόλυνση ενός κυττάρου από τέτοιους ιούς οδηγεί σε αναδιάταξη των ενδο-κυτταρικών μεμβρανών. Το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύμπλεγμα Golgi καταστρέφονται σε αυτή τη διαδικασία και το κυτταρόπλασμα γεμίζει με κυστίδια που διαθέτουν διπλή μεμβράνη. Η αντιγραφή του ιικού RNA πραγματοποιείται στην επιφάνεια αυτών των κυστιδίων. Οι πρωτεΐνες 2A & 2BC επάγουν την δημιουργία των κυστιδίων που προ-αναφέρθηκαν. Επειδή οι πρωτεΐνες αυτές εντοπίζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο, μια υπόθεση είναι πως προωθούν το σχηματισμό των κυστιδίων από εκείνο το σημείο του κυττάρου (Doedens JR, Giddings TH Jr, Kirkegaard K. 1997). Τουλάχιστον δύο ιικές πρωτεΐνες, οι 2C & 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη η οποία προσδένει την πρωτεΐνη VPg στη μεμβράνη, έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η σύνθεση του RNA. Επίσης, προσδένει την 3D^{pol} & την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στη μεμβράνη. Η πρωτεΐνη 2C έχει μια περιοχή για τη δέσμευση του RNA η οποία επίσης προσδένει το ιικό RNA στις μεμβράνες στο σύμπλοκο της αντιγραφής.

Το γενωμικό RNA του ιού δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA, αλλά και ως εκμαγείο για τη σύνθεση των αρνητικών αλυσίδων RNA. Πως όμως η πολυμεράση, η οποία έχει κατεύθυνση 3'→5' στο μόριο θετικής πολικότητας, αποφεύγει την σύγκρουση με τα ριβοσώματα τα οποία μεταφράζουν προς την αντίθετη κατεύθυνση? Πιστεύεται πως υπάρχει ένας μηχανισμός έτσι ώστε οι δύο παραπάνω διαδικασίες να μην συμβαίνουν ταυτόχρονα. Πειραματικές μελέτες έδειξαν πως όταν τα ριβοσώματα βρίσκονται πάνω στο ιικό RNA, τότε εμποδίζεται η αντιγραφή του. Αντίθετα, όταν τα ριβοσώματα απελευθερώνονται από το ιικό RNA, τότε λαμβάνει χώρα η αντιγραφή. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως η αντιγραφή και η μετάφραση δεν μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα σε ένα μόριο RNA. Για να είναι εφικτή η διεξαγωγή και των δύο διεργασιών (αντιγραφή και μετάφραση) στο ίδιο μόριο RNA, πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός που να ελέγχει το πότε πραγματοποιείται η μία και πότε η άλλη. Όταν τα ριβοσώματα βρίσκονται πάνω στο ιικό RNA, η αντιγραφή δεν αναστέλλεται. Αντίθετα, όταν τα ριβοσώματα απελευθερώνονται από το ιικό RNA, τότε η αντιγραφή αυξάνεται (Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB. 1999). Τα αποτελέσματα αυτά

υποδεικνύουν πως η αντιγραφή και η μετάφραση δεν μπορούν να συμβούν ταυτόχρονα στο ίδιο εκμαγείο.

Ο μηχανισμός που ρυθμίζει την αντιγραφή και τη μετάφραση, περιλαμβάνει τον τεμαχισμό μιας πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη αυτή έχει ρόλο στη μετάφραση που εξαρτάται από το στοιχείο IRES, δεσμεύοντας την δομή μίσχου θηλιάς IV (stem-loop IV) (Gamarnik AV, Andino R. 1997) (εικόνα 10) όπως επίσης και στη αντιγραφή, δεσμεύοντας την δομή μίσχου-θηλιάς I (stem-loop I) (Parsley TB, Towner JS, Blyn LB, et al. 1997). Η πολύ-r(C)-δεσμευτική πρωτεΐνη τεμαχίζεται από την πρωτεΐνάση 3C^{pro} και η τεμαχισμένη πρωτεΐνη δεν μπορεί πλέον να διεγείρει τη μετάφραση που εξαρτάται από το στοιχείο IRES, αλλά είναι ικανή να συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του RNA (Perera R, Daijogo S, Walter BL, et al. 2007). Ένας άλλος μηχανισμός περιλαμβάνει τη σύνδεση της πρωτεΐνης 3CD στην stem-loop I, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η συγγένεια για πρόσδεση της πολύ-r(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης στη stem-loop I και να μειωθεί για τη stem-loop IV. Το αποτέλεσμα αυτών των τροποποιήσεων είναι να μειωθεί η IRES-εξαρτώμενη μετάφραση και να απομακρυνθούν τα ριβοσώματα από το ιικό RNA, επιτρέποντας έτσι την RNA πολυμεράση να δράσει ανεμπόδιστα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι παρόλο που υπάρχουν μηχανισμοί για να αποφευχθεί η σύγκρουση της RNA-πολυμεράσης με τα ριβοσώματα, μερικές φορές αυτό συμβαίνει.



Εικόνα 10: Μορφογένεση των icosah-ιών: Η πρόδρομη πρωτεΐνη P1 αναδιπλώνεται, αποχωρίζεται από την P2 και στη συνέχεια διασπάται στις VP0+VP3+VP1 από την 3CD^{pro}. Τα 5S πρωτομερή αυτό-συναρμολογούνται σε 14S πενταμερή και τα πενταμερή συναρμολογούνται σε 80S άδεια καψίδια. Ένα μοντέλο καψιδίωσης προτείνει πως το RNA εισέρχεται στα άδεια καψίδια και σχηματίζει το 150S προ-καψίδιο, στο οποίο η VP0 δεν έχει τεμαχιστεί. Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι τα πενταμερή συναρμολογούνται γύρω από το RNA και πως τα άδεια καψίδια λειτουργούν ως αποθήκες για τα πενταμερή. Ο τεμαχισμός της VP0 είναι το τελευταίο μορφογενετικό βήμα, το οποίο παράγει το μολυσματικό πλέον 160S ιοσωμάτιο. Η πρωτεΐνάση που είναι υπεύθυνη για τον τεμαχισμό της VP0 είναι ακόμα άγνωστη. Ανατύπωση από: Fields Virology 6th Ed.

(e) ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΨΙΔΙΟΥ

Η μορφογένεση των ρικογοναίων έχει μελετηθεί εκτενώς, καθώς το καψίδιο τους είναι σχετικά απλό και τα ενδιάμεσα μόρια που σχηματίζονται είναι εύκολα ανιχνεύσιμα στα μολυσμένα κύτταρα (εικόνα 10). Κατά τη διάρκεια της σύνθεσης της P1 πρωτεΐνης, που είναι η πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές των β-βαρελιών και οι ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των επιφανειών των περιοχών αυτών, οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 απελευθερωθεί από την 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί μεταξύ VP0-VP3 & VP3-VP1 τεμαχίζονται από την πρωτεΐνάση 3CD^{pro}. Στο ώριμο καψίδιο, το C-τελικό άκρο των VP1, VP2 & VP3 εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το N-τελικό άκρο, στην εσωτερική, όπου συμμετέχει σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Αυτή η διαδικασία παράγει το πρώτο ενδιάμεσο που είναι το 5S πρωτομερές (μη-ώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο από τις πρωτεΐνες VP0, VP3 & VP1). Πέντε πρωτομερή ενώνονται για να σχηματίσουν το πενταμερές. Ο τεμαχισμός της P1 είναι πιθανόν απαραίτητος για τη συναρμολόγηση του πενταμερούς. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από μελέτη της δομής του ιοσωματίου. Ο β-κύλινδρος στον πενταμερή άξονα συμμετρίας σχηματίζεται από το N-τελικό άκρο γεινιαζόντων VP3 μορίων. Ο κύλινδρος αυτός περιβάλλεται από μια δέσμη που αποτελείται από τα N-τελικά άκρα των VP0 & VP1. Για να πραγματοποιηθούν αυτές οι αλληλεπιδράσεις πρέπει να προηγηθεί πρωτεολυτικό ρήγμα των καψιδιακών πρωτεϊνών, έτσι ώστε να είναι δυνατή η κίνηση των N-τελικών άκρων.

Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει τεμαχισμό των περισσότερων μορίων VP0 σε VP4+VP2. Η πρωτεΐνάση που καταλύει αυτή τη διαδικασία δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμα. Ο δεσμός της VP0 που κόβεται από την πρωτεΐνάση, βρίσκεται στο εσωτερικό των άδειων καψιδίων και των ώριμων ιοσωματίων και δεν είναι προσβάσιμο σε ιικές ή κυτταρικές πρωτεϊνάσες.

Η διαδικασία της καψιδίωσης των ρικογοναίων χαρακτηρίζεται από μεγάλη ειδικότητα. Πακετάρονται μόνο μόρια RNA θετικής πολικότητας και όχι RNA αρνητικής πολικότητας ή κυτταρικά μόρια RNA (Nomoto A, Kitamura N, Golini

F, et al. 1977, Novak JE, Kirkegaard K. 1991). Η VPg κατά πάσα πιθανότητα δεν παίζει ρόλο στην καψιδίωση, διότι μόρια RNA αρνητικής πολικότητας που είναι συνδεδεμένα με τη VPg, δεν πακετάρονται.

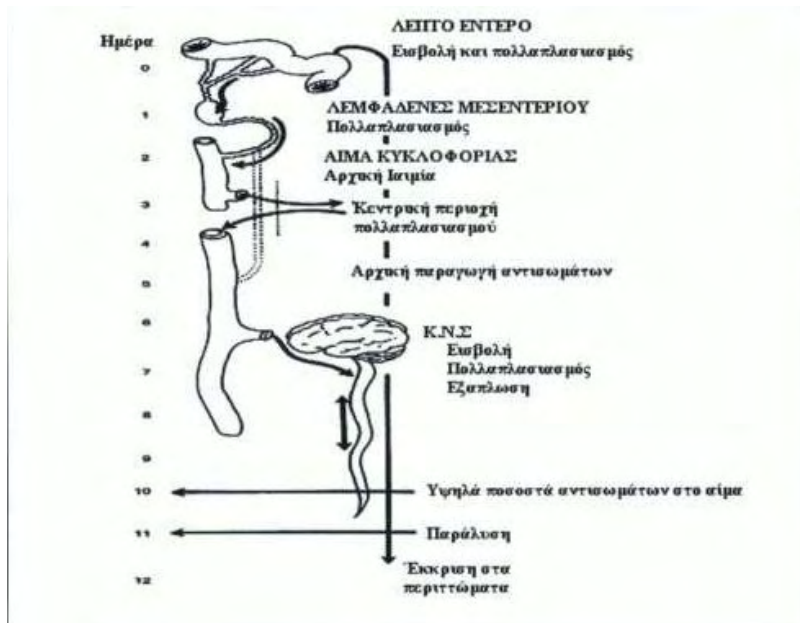
Όταν τα κύτταρα μολύνονται από εντεροϊό, εμφανίζουν κάποιες μορφολογικές αλλαγές οι οποίες είναι γνωστές ως κυτταροπαθογόνες επιδράσεις (cytopathic effects). Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν συμπύκνωση της χρωματίνης, διόγκωση του πυρήνα, πολλαπλασιασμό των μεμβρανικών κυστιδίων, αλλαγές στη διαπερατότητα της μεμβράνης, διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών και τέλος αποικοδόμηση όλου του κυττάρου. Η αιτία των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων είναι άγνωστη. Μια υπόθεση υποστηρίζει πως η διαρροή του περιεχομένου των λυσοσωμάτων, είναι εν μέρει υπεύθυνη. Η σύνθεση κυτταρικών μορίων RNA, DNA και πρωτεϊνών παρεμποδίζεται κατά τις πρώτες ώρες της μόλυνσης από τον εντεροϊό. Παρόλα αυτά, δεν συμπεριλαμβάνονται στις κυτταροπαθογόνες επιδράσεις. Όταν η αναπαραγωγή του ιού παρεμποδίζεται από συγκεκριμένα φάρμακα ή από άλλες περιοριστικές συνθήκες το κύτταρο οδηγείται και πάλι στο θάνατο, μέσω της απόπτωσης (Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, et al. 1995). Υπάρχουν συγκεκριμένες εκδηλώσεις των κυτταροπαθογόνων επιδράσεων και της απόπτωσης που μοιάζουν, όπως η συμπύκνωση της χρωματίνης και ο αποσχηματισμός του πυρήνα. Τα μονοπάτια που οδηγούν όμως σε αυτές τις εκδηλώσεις, διαφέρουν (Agol VI, Belon GA, Bienz K, et al. 1998).

iii. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

Η είσοδος των εντεροϊών στο σώμα πραγματοποιείται μέσω της στοματικής οδού. Εξάιρεση αποτελεί ο εντεροϊός CAV21 (Coxsackie-A virus 21), ο οποίος ευθύνεται κυρίως για τις εντεροϊικές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος και προσβάλλει τον οργανισμό μέσω της αναπνευστικής οδού, καθώς επίσης και ο EV70 (Enterovirus 70), που χρησιμοποιεί τις οφθαλμικές και αναπνευστικές εκκρίσεις ως μέσο μετάδοσής του. Ο πολλαπλασιασμός των εντεροϊών λαμβάνει χώρα στο φάρυγγα και στο λεπτό έντερο. Μετά τον αρχικό πολλαπλασιασμό στις αμυγδαλές, στο λεμφικό ιστό του φάρυγγα, στις

πλάκες του Peyer και στο λεπτό έντερο, ο ιός μεταδίδεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος σε άλλους ευπαθείς ιστούς, δηλαδή σε άλλους λεμφαδένες και στο κεντρικό νευρικό σύστημα, διαπερνώντας τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Πριν την έναρξη γενικευμένης ιαιμίας, ο οργανισμός-ξενιστής αντιδρά, συνήθως, στη λοίμωξη, εμφανίζοντας ήπια συμπτώματα. Ακολουθεί η παραγωγή αντισωμάτων, τα οποία εξαλείφουν συνήθως την ιαιμία, πριν την εμφάνιση παράλυσης. Η ιαιμία εμφανίζεται για λίγες μέρες και προηγείται της προσβολής του κεντρικού νευρικού συστήματος σε άτομα τα οποία θα αναπτύξουν αργότερα μη παραλυτική (ασυμπτωματική) ή παραλυτική πολιομυελίτιδα (εικόνα 11).

Η περίοδος επώασης των εντεροϊών διαρκεί συνήθως 7-14 ημέρες (με διακύμανση 2-35 ημερών) (Melnick J.L. 1996) ενώ η απομόνωσή τους είναι εφικτή από το αίμα, τον φάρυγγα και τα περιττώματα ασθενούς ατόμου 3-5 ημέρες μετά τη μόλυνση. Συνήθως, η έκκριση των ιών από τα περιττώματα διαρκεί 8 εβδομάδες, ενώ η παρουσία τους στο φάρυγγα γίνεται αντιληπτή για μια ή δυο εβδομάδες μετά τη μόλυνση σε άτομα που εμφανίζουν κλινικές ή υπο-κλινικές ενδείξεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι είναι δυνατή η παρουσία και επιβίωση (πολλαπλασιασμός) δύο ή περισσότερων ειδών εντεροϊών στο πεπτικό σύστημα του ίδιου ατόμου, αλλά υπό συγκεκριμένες συνθήκες ο πολλαπλασιασμός του ενός μπορεί να είναι ανταγωνιστικός των άλλων.



Εικόνα 11: Η πορεία του ιού από το λεπτό έντερο μέχρι την έναρξη της παράλυσης σε συνάρτηση με το χρόνο, μετά την πρώτη μόλυνση . Ανατύπωση από: Melnick J. L. 1996

Στον άνθρωπο, οι λοιμώξεις που οφείλονται σε εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, γεγονός που συνιστά και κύρια αιτία της αδυναμίας ανίχνευσής τους. Έχει ωστόσο κατά καιρούς καταγραφεί μια ευρεία ποικιλία οξέων συμπτωμάτων, τα οποία οφείλονται στην προσβολή σημαντικών συστημάτων του ανθρώπινου οργανισμού, όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, το μυοκάρδιο, οι σκελετικοί μύες και το πάγκρεας. Τα διάφορα είδη εντεροϊών παρουσιάζουν διαφορετική παθογένεια και συμπτωματολογία, η οποία περιλαμβάνει από απλές λοιμώξεις του αναπνευστικού συστήματος, μέχρι και σοβαρές παθήσεις όπως είναι η οξεία μυοκαρδίτιδα, η παραλυτική πολιομυελίτιδα και η ασηπτική μηνιγγίτιδα. Τα κυριότερα κλινικά συμπτώματα σχετίζονται με τα διάφορα είδη εντεροϊών και αναφέρονται περιληπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Σύνδρομο	Πολιοϊοί	Coxsackie A	Coxsackie B	Echo-ιοί
Παραλυτική Ασθένεια	+	+	+	+
Μηνιγγίτιδα-Εγκεφαλίτιδα	+	+	+	+
Περικαρδίτιδα	+	+	+	+
Ασθένειες σε νεογνά	-	-	+	+
Πλευροδυνία	-	-	+	-
Φλυκταινώδες εξάνθημα	-	+	-	-
Ασθένεια Rash	-	+	+	+
Αιμμοραγική Επιπεφυκίτιδα	-	+	-	-
Αναπνευστικές λοιμώξεις	+	+	+	+
Πυρετός	+	+	+	+
Διαβήτης/Παγκρεατίτιδα	-	-	+	-

Εικόνα 12: Οι κυριότερες κλινικές εκδηλώσεις, σχετιζόμενες με μόλυνση από εντεροϊούς. Ανατύπωση από: Witwer et al. 2001

iv. ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί αποτελεσματική θεραπεία έναντι των λοιμώξεων από εντεροϊούς. Παρ' όλα αυτά βρίσκονται σε εξέλιξη διάφορες κλινικές δοκιμές, ενώ επιπρόσθετα έχει αναφερθεί in vitro αποτελεσματικότητα μιας ποικιλίας αντι-ιικών φαρμάκων. Έχει, για παράδειγμα δειχθεί ότι η χορήγηση ιντερφερόνης σε πειραματόζωα δρα στα πρώιμα στάδια του κύκλου ζωής των εντεροϊών, ενώ η χορήγηση α- και β-ιντερφερόνης έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε in vitro λοιμώξεις από ιό Coxsackie-A24 (Langford MP, Robertson JB, Orillac R. 1995). Επίσης, σε λοιμώξεις του κεντρικού νευρικού συστήματος ανοσοκατεσταλμένων ασθενών έχει πραγματοποιηθεί επιτυχής χορήγηση ανοσοσφαιρινών, ενώ, πρόσφατα βρίσκεται σε εξέλιξη η χρήση ποικίλων αντι-ιικών φαρμακευτικών ουσιών, οι οποίες δρουν έναντι των πρωτεϊνών των εντεροϊών. Παράδειγμα των προαναφερθέντων φαρμάκων, αποτελούν τα σκευάσματα "WIN", τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την αντιμετώπιση ρινοϊών. Τα σκευάσματα αυτά έχουν την ικανότητα να προσδένονται στην υδρόφοβη αύλακα του καψιδίου των εντεροϊών, παρεμβαίνοντας στο ξεδίπλωμα των ιών και/ή στην προσρόφηση τους στο κύτταρο-ξενιστή. Σε πειραματικές δοκιμές του σκευάσματος WIN 54954 σε ασθενείς με λοίμωξη του ανώτερου

αναπνευστικού συστήματος, η οποία οφειλόταν σε μόλυνση από ιό Coxsackie A21, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του ιικού τίτλου καθώς και των ακόλουθων συμπτωμάτων της λοίμωξης. Επίσης ένα άλλο σκεύασμα τύπου WIN το «Pleconaril» ή «VP 63843», έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε ασθενείς με μηνιγγίτιδα (Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, Hayden FG. 1998) και σε βρέφη με οξεία υποκλινική ανοσοανεπάρκεια λόγω γαστρεντερικής λοίμωξης (Nowak-Wegrzyn A, Phipatanakul W, Winkelstein JA, Forman MS, Lederman HM. 2001). Το συγκεκριμένο σκεύασμα, το οποίο διαθέτει την ιδιότητα να συσσωματώνεται στην υδρόφοβη αύλακα του ιικού καψιδίου, επηρεάζοντας την πρόσδεση των ιών στους κυτταρικούς υποδοχείς, παρουσίασε σημαντική δραστηριότητα έναντι των ιών Echo 11 και Coxsackie A21 (Schiff GM, Sherwood JR. 2000). Τέλος, έχει αναφερθεί ικανοποιητική δραστηριότητα ενός επιπρόσθετου αντι-ιικού φαρμάκου, του επονομαζόμενου Enviroxime. Το συγκεκριμένο σκεύασμα φαίνεται να δρα ανασταλτικά έναντι της πρωτεΐνης 3A, παρεμποδίζοντας συνεπώς τη σύνθεση των θετικών αλυσίδων RNA κατά τον πολλαπλασιασμό των ιών. Εντούτοις, το φάρμακο αυτό είναι τοξικό για τον άνθρωπο και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί, ακόμη, για τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί από εντεροϊό.

ν. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ & ΜΟΡΙΑΚΗ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Οι εντεροϊοί απομονώνονται συνήθως από δείγματα κοπράνων, καθώς επίσης και από αναπνευστικές εκκρίσεις. Έτσι, η κοπρανο-στοματική μετάδοση καθώς και η επαφή με εκκρίσεις του αναπνευστικού συστήματος [άμεση επαφή, μολυσματικά σταγονίδια (fomites) και πιθανώς αιωρούμενα σταγονίδια (aerosol)] θεωρούνται οι βασικότεροι τρόποι μετάδοσης. Επιπρόσθετα, οι εντεροϊοί που προκαλούν φλυκταινώδες εξάνθημα μπορούν να μεταδοθούν με άμεση επαφή με την αλλοίωση η οποία περιέχει τον μολυσματικό ιό. Εξαιρέσεις στον κλασικό τρόπο μετάδοσης των εντεροϊών αποτελούν οι ιοί EV70 και CAV24, οι οποίοι προκαλούν την αιμορραγική επιπεφυκίτιδα. Αυτοί οι δύο ιοί μεταδίδονται πρωτογενώς με άμεση ή έμμεση

επαφή, με εκκρίσεις των οφθαλμών, ενώ μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις έχουν απομονωθεί από περιπτώματα ή αναπνευστικές εκκρίσεις.

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την παρουσία, σε συγκεκριμένους πληθυσμούς, αντισωμάτων έναντι των εντεροϊών (Bell EJ, McCartney RA. 1984, Danes L, Jaresova I. 1985, Lau R.C. 1983, Manjunath N, Balaya S, Seth P. 1982, Margalith M, Fattal B, Shuval HI, Morag A. 1986, Mukundan P, John TJ. 1983, Santhanam S, Choudhury DS. 1984) και από τις μελέτες αυτές έχουν εξαχθεί ορισμένα σημαντικά συμπεράσματα σχετικά με την επιδημιολογία των εντεροϊών. Καταρχάς, έχει βρεθεί ότι ο αριθμός των ατόμων που φέρουν αντισώματα έναντι οποιουδήποτε ορότυπου εντεροϊού είναι μεγάλος, αποδεικνύοντας την υψηλή συχνότητα παρελθόντων λοιμώξεων. Επίσης, φαίνεται ότι οι λοιμώξεις από έναν ορότυπο, μπορούν να αυξήσουν τα επίπεδα του τίτλου των αντισωμάτων έναντι διαφορετικών οροτύπων. Το πρότυπο της ετεροτυπικής απόκρισης μπορεί να ποικίλει από ορότυπο σε ορότυπο μεταξύ διαφορετικών ατόμων. Τέλος, έχει υποστηριχθεί ότι το πρότυπο επικράτησης των αντισωμάτων ενός συγκεκριμένου ορότυπου μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή, την ηλικία και τη χρονική περίοδο. Οι προαναφερόμενες παρατηρήσεις θα πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη σε όλες τις περιπτώσεις κατά τις οποίες πραγματοποιείται ερμηνεία των αποτελεσμάτων ορολογικών αναλύσεων για την εύρεση συσχετίσεων μεταξύ της λοίμωξης και της προκαλούμενης ασθένειας (Palacios G, Oberste MS. 2005).

Βασική αρχή στην κατανόηση της επιδημιολογίας των εντεροϊών είναι η μεταβλητότητα (variation) που παρουσιάζει αυτή ως προς τον ορότυπο, τη χρονική περίοδο, τη γεωγραφική θέση και την ασθένεια. Διάφορες μελέτες παρακολούθησης λοιμώξεων από μη-πόλιο εντεροϊούς έχουν οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι υφίστανται δύο πρότυπα επικράτησης των εντεροϊών: το ενδημικό και το επιδημικό (Oberste MS, Pallansch MA. 2003). Το επιδημικό πρότυπο, όπως αντιπροσωπεύεται από τον ιό echo 9 (E9), χαρακτηρίζεται από απότομες κορυφές στον αριθμό των απομονώσεων, οι οποίες ακολουθούνται από περιόδους περιορισμένης παρουσίας. Από το 1970 μέχρι το 2001 έχουν καταγραφεί μεγάλες επιδημίες του εντεροϊού E9 στις Ηνωμένες Πολιτείες, οι οποίες τοποθετούνται στα έτη 1971, 1975, 1978, 1981, 1984, 1988-1989, 1992, 1995 και 1998. Ο ιός echo 30 (E30) παρουσιάζει επίσης

επιδημικό πρότυπο μετάδοσης, το χρονικό όμως εύρος των απομονώσεων του είναι μεγαλύτερο και αφορά τις περιόδους 1978-1985, 1990-1993, και 1997-1998. Αντίθετα, το ενδημικό πρότυπο μετάδοσης αντιπροσωπεύεται από τον ιό Coxsackie B3 (CVB3) και χαρακτηρίζεται από το γεγονός ότι η απομόνωσή του κυμαίνεται ετησίως στα ίδια επίπεδα, με εξαίρεση το 1980, όπου καταγράφηκε μια απότομη αύξηση. Παρόμοια επιδημικά και ενδημικά πρότυπα έχουν μελετηθεί και σε άλλους εντεροϊούς.

Η εφαρμογή των μεθόδων μοριακής βιολογίας έδωσε νέα ώθηση στη γνώση της επιδημιολογίας των εντεροϊών. Η ανάλυση προσδιορισμού πρωτοδιάταξης, χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά ως επιδημιολογικό εργαλείο, για το χαρακτηρισμό της γεωγραφικής κατανομής των άγριων στελεχών πολιοϊών, προσδιορίζοντας την πρωτοταγή διάταξη 150 νουκλεοτιδικών βάσεων στην περιοχή σύνδεσης του γονιδίου VP1 με το 2A. Η μελέτη αυτή έδειξε ότι οι πολιοϊοί που κυκλοφορούν σε μια δεδομένη γεωγραφική περιοχή, σχετίζονται στενά σε γενετικό επίπεδο, ενώ φαίνεται να είναι γενετικά απομακρυσμένοι από άλλους ιούς του ίδιου είδους, που κυκλοφορούν σε διαφορετικούς γεωγραφικούς τόπους, κατά το ίδιο χρονικό διάστημα.

Επίσης, η μοριακή επιδημιολογία έδειξε ότι υπάρχουν διάφοροι ορότυποι εντεροϊών, οι οποίοι παρουσιάζουν χαρακτηριστική επιδημιολογική συμπεριφορά. Η επιδημιολογική συμπεριφορά του Echo30 (E30) θεωρείται χαρακτηριστική, γιατί περιλαμβάνει επικρατούσες γενετικές γραμμές, οι οποίες εκτοπίζουν άλλες λιγότερο εγκαθιδρυμένες (Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA. 1999). Αυτές οι E30 γενετικές γραμμές δεν φαίνεται να περιορίζονται γεωγραφικά, καθώς ένα συγκεκριμένο στέλεχος είναι δυνατό να κυκλοφορεί ταυτόχρονα σε διαφορετικές περιοχές ανά τον κόσμο. Επίσης, η μοριακή ανάλυση της επιδημιολογίας ενός άλλου ορότυπου, εκείνου του Echo13, η οποία χαρακτηρίζεται από μια απότομη εμφάνιση του ιού, σε παγκόσμιο επίπεδο, το έτος 2001 και μια επακόλουθη εμφάνιση του, πιστεύεται ότι περιγράφει τη δυναμική των εντεροϊών να κυκλοφορούν απρόβλεπτα, προκαλώντας αξιοσημείωτα κλινικά νοσήματα και υπογραμμίζει την ανάγκη για διαρκή επαγρύπνηση και επιτήρηση .

Παγκόσμια κυκλοφορία εντεροϊών έχει καταγραφεί για τους εντεροϊούς E9, E30, EV70, EV71.

Η ενδημική συμπεριφορά άλλων εντεροϊών σε μοριακό επίπεδο, περιγράφεται από ταυτόχρονη κυκλοφορία στην ίδια χώρα στελεχών του ίδιου ορότυπου, οι οποίοι όμως ανήκουν σε διαφορετικές γενετικές γραμμές . Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι ο ιός CBV4 μπορεί να κυκλοφορεί σε μια δεδομένη περιοχή για πολλές δεκαετίες, καθώς οι ιοί που ανήκουν στον γονότυπο αυτό, ανιχνεύθηκαν στην Ολλανδία μεταξύ των ετών 1965 κα 1990. Τέλος, υπάρχουν πολλές περιπτώσεις κατά τις οποίες έχει παρατηρηθεί ταυτόχρονη κυκλοφορία του ίδιου ή γενετικά παρόμοιων γονοτύπων σε περιοχές με μεγάλη γεωγραφική απόσταση. Αυτές οι περιπτώσεις ανακλούν είτε προηγούμενη επιδημική εξάπλωση των ιών είτε επικράτηση ενός γονοτύπου σε παγκόσμιο επίπεδο.

vi. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ

Η εξέλιξη των Coxsackie ιών και γενικότερα των εντεροϊών, ως πιθανός αιτιολογικός παράγοντας της εμφάνισης νέων μεταδοτικών ασθενειών αλλά και της επανεμφάνισης παλαιότερων από τα πρόσφατα κυκλοφορούντα στελέχη, βρίσκεται στο επίκεντρο των σύγχρονων αναλύσεων στο πεδίο των Picorna ιών. Κατά συνέπεια, ο μηχανισμός, η έκταση και οι συνέπειες του γρήγορου ρυθμού μεταλλαξιγένεσης και ανασυνδυασμού των ιών αυτών , αναλύονται συνεχώς, οδηγώντας στη γένεση πολλών θεωριών.

(α) ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ:

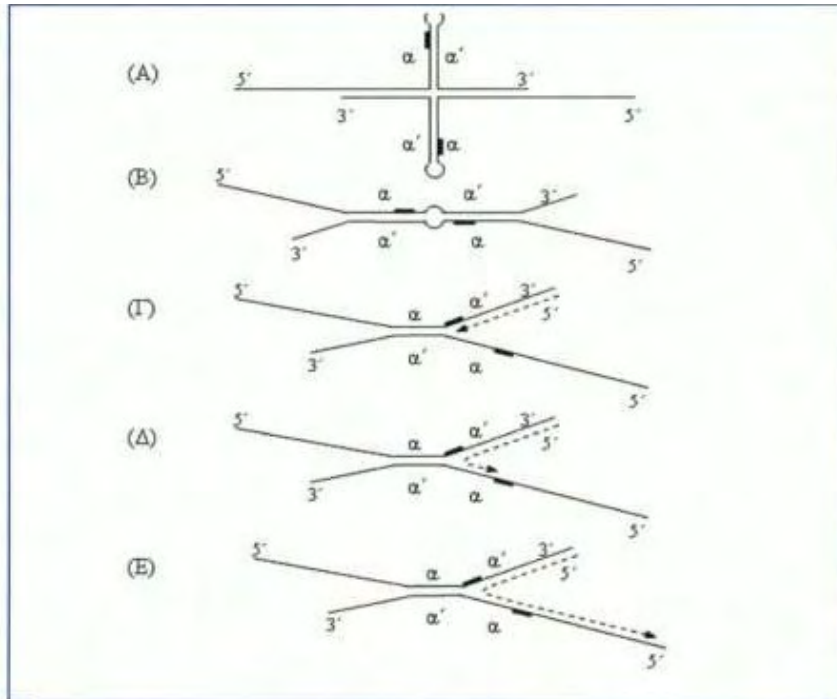
Η δημιουργία μεγάλου αριθμού σημειακών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των πολιοϊών, οφείλεται στο υψηλό ποσοστό λαθών της ιικής RNA πολυμεράσης (3D^{pol}) και στην απουσία μηχανισμού ελέγχου της πιστότητας της αντιγραφής. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι εκείνες που κωδικοποιούν για τις καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και κυρίως τα τμήματα αυτών που εκτίθενται στην ιική επιφάνεια. Το γονίδιο που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη VP1 περιέχει τις κυριότερες αντιγονικές θέσεις

και κατά συνέπεια δέχεται τη μεγαλύτερη εξελικτική πίεση από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού-ξενιστή. Η μεγάλη συχνότητα μεταλλάξεων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία των λεγόμενων «quasi-species» (σχεδόν είδη), δηλαδή μεγάλων πληθυσμών ιών που περιλαμβάνουν διαφορετικούς γονότυπους. Κύριο χαρακτηριστικό ενός «quasi-species» αποτελεί το γεγονός ότι τα μέλη που το αποτελούν, δεν διαθέτουν μια μοναδική, αλλά μια κοινή αλληλουχία νουκλεοτιδίων (Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortin J, Lopez-Galindez C, Perez-Brena P, Villanueva N, Najera R, et al. 1985). Υπάρχουν δυο κύριοι μηχανισμοί για την επικράτηση των μεταλλάξεων επομένως των «quasi-species»: η εξελικτική πίεση και η φυσική επιλογή.

(β) ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Οι πολιοϊοί αποτελούν τους εκτενέστερα μελετημένους εντεροϊούς και ανήκουν στους πρώτους RNA ιούς στους οποίους παρατηρήθηκε ανταλλαγή γενετικού υλικού.

Ο ευρύτερα αποδεκτός μηχανισμός για τον ανασυνδυασμό του RNA των πολιοϊών είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) από την 3Dπολυμεράση κατά τη διάρκεια της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου του RNA. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA (για αυτό αναφέρεται ως ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου). Αναλυτικότερα, σύμφωνα με το μοντέλο των Romanova et al., η 3Dπολυμεράση κατά τη σύνθεση του RNA συναντά κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να σταματά τη διαδικασία της επιμήκυνσης (εικόνα 13). Στο σημείο αυτό, το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας ως μήτρα ένα εναλλακτικό ιικό RNA. Έχει προταθεί ότι το εμπόδιο που συναντά η ιική πολυμεράση μπορεί να είναι μια δευτεροταγής δομή φουρκέτας, η οποία σχηματίζεται από την παρουσία αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα. Το αποτέλεσμα είναι να μεταπηδά η 3D πολυμεράση από το ένα μόριο στο άλλο.

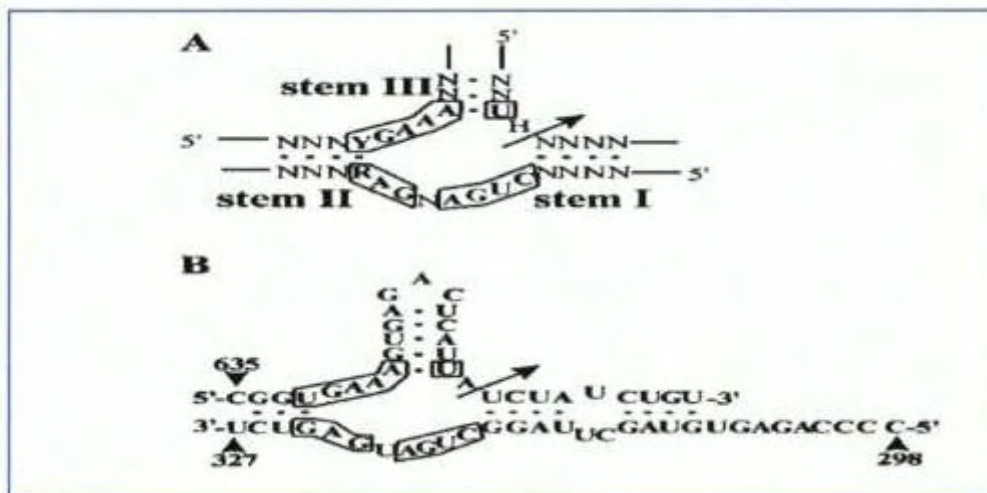


Εικόνα 13: Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romano et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δύο μόρια RNA που χρησιμεύουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δύο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α', ενώ οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός. Η διακεκομμένη γραμμή αναπαριστά το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. Ανατύπωση από: Romano et al. 1986.

Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από την παρατήρηση ότι ο ανασυνδυασμός προάγεται στα πλαίσια των μεικτών συμπλόκων αντιγραφής, τα οποία είναι πολύπλοκα συστήματα αντιγραφής, με περισσότερα από ένα μόρια RNA (Egger D, Bienz K. 2002).

Το προαναφερόμενο μοντέλο ανασυνδυασμού υποστηρίζεται περαιτέρω από αναφορές γύρω από δευτεροταγή RNA στοιχεία (Tolskaya EA, Romano LI, Blinov VM, Viktorova EG, Sinyakov AN, Kolesnikova MS, Agol VI. 1987) και από την παρατήρηση αυξημένης νουκλεοτιδικής ομολογίας κοντά στις θέσεις ανασυνδυασμού. Μάλιστα, φαίνεται ότι η νουκλεοτιδική ομολογία παίζει ένα παράπλευρο ρόλο στον καθορισμό της πιθανότητας ανασυνδυασμού, μιας και έχει δειχθεί ότι τα ενδοτυπικά ανασυνδυασμένα στελέχη παράγονται με μεγαλύτερη (εκατονταπλάσια) συχνότητα συγκριτικά με τα διατυπικά (Kirkegaard K, Baltimore D. 1986). Ωστόσο, υπάρχουν πρόσφατες αναφορές που προτείνουν ότι ένας εναλλακτικός, αν όχι ο επικρατής, μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς, είναι η σύνδεση σπασμένων μορίων RNA. Ο μηχανισμός αυτός, ονομάζεται μηχανισμός τομής-σύνδεσης (mechanism of

the breaking and joining) και σύμφωνα με αυτόν, τα μόρια του ιικού RNA κόβονται σε κάποιες θέσεις και τα εκτιθέμενα άκρα τους ενώνονται. Αναλυτικότερα, σύμφωνα με τον Chetverin (Chetverin A.B. 1999) οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί των RNA μορίων προσβάλλονται από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο, με αποτέλεσμα τα εκτιθέμενα άκρα (3'-υδροξυλικό και 5'-φωσφορικό) να δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης. Στη συνέχεια, τα άκρα ενώνονται μέσω ενεργοποίησης της 5'-φωσφορικής ομάδας. Εναλλακτικά, μια δεύτερη ερευνητική μελέτη, προτείνει την προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού από ένα παρακείμενο 2'-υδροξύλιο, το οποίο δρα σαν εσωτερικό νουκλεόφιλο, με αποτέλεσμα την παραγωγή ενός 2',3'-κυκλοφωσφορικού και ενός 5'-φωσφορικού άκρου, τα οποία μπορούν να ενωθούν με αντίδραση trans-εστεροποίησης.



Εικόνα 14: Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Gmyletal: (A) Τα συντηρημένα νουκλεοτίδια βρίσκονται κυκλωμένα στη συνεχή δομή ενός υποθετικού ριβοενζύμου. Τα γράμματα R, Y και H αναπαριστούν μια πουρίνη, μια πυριμιδίνη και οποιαδήποτε βάση εκτός της G, αντίστοιχα. Η θέση πρωτεόλυσης υποδεικνύεται από το βέλος. (B) Μια υποθετική αναδίπλωση του συμπληρωματικού μορίου, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ενός συνεχούς ριβοενζύμου, ξεδιπλωμένου στην αντίστοιχη θέση του αρχικού μορίου που ανασυνδυάζεται. Ανατύπωση από: Gmyl et al. 1999.

Έχει υποστηριχθεί ότι στην πλειοψηφία των μελετημένων περιπτώσεων πολιοϊών, ο ανασυνδυασμός υφίσταται στο μη-δομικό γονιδίωμα και συνήθως στο τμήμα 2A-2C. Σε κάποιες περιπτώσεις, έχουν αναφερθεί γεγονότα ανασυνδυασμού μεταξύ της 5'-NTR και της P1 κωδικής περιοχής (του καψιδίου) (Georgescu MM, Tardy-Panit M, Guillot S, Crainic R, Delpeyroux F. 1995) ενώ ο ανασυνδυασμός εντός του γενωμικού τμήματος, που κωδικοποιεί

για τις πρωτεΐνες του καψιδίου, φαίνεται να αποτελεί περισσότερο εξαίρεση, παρά τον κανόνα των περιπτώσεων ανασυνδυασμού. Έχειδειχθεί, ωστόσο, ότι ο *in vitro* ανασυνδυασμός εντός της P1 κωδικής περιοχής, εξαρτάται από τη θερμοκρασία: ενώ στους 37°C ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται επιλεκτικά στο μη-δομικό γονιδίωμα, στους 34°C μπορεί να συμβεί στο δομικό τμήμα του γονιδιώματος. Η πιο σημαντική παρατήρηση αυτής της τελευταίας μελέτης ήταν ότι τα στελέχη που παρουσιάζουν ανασυνδυασμό στο δομικό γονιδίωμα δεν είναι λιγότερο μολυσματικά από τα στελέχη που είναι ανασυνδυασμένα σε άλλα γενωμικά τμήματα, γεγονός που υποδεικνύει ότι πιθανότατα ο ανασυνδυασμός στο γενετικό τμήμα P1 περιορίζεται από κάποιον ενδογενή μηχανισμό και όχι από ασυμβατότητα πρωτεϊνών.

(2) ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στην παρούσα εργασία, κύτταρα SiHa & CaSki μολύνθηκαν από το πρότυπο στέλεχος Sabin 1. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές αν τα ανωτέρω κύτταρα μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη κυτταρικών αλλοιώσεων από τον ιό SABIN 1. Στόχος λοιπόν ήταν να ελεγχθεί η παρουσία RNA θετικής & αρνητικής πολικότητας του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 σε αυτά τα κύτταρα, σε διαφορετικές χρονικές στιγμές μετά από τη μόλυνση.

(3) ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

- a) **ΣΤΕΛΕΧΗ ΕΝΤΕΡΟΪΩΝ:** Στο πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής εργασίας, χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος Sabin 1, για να γίνει η μόλυνση των κυτταρικών σειρών. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀: 10⁵ TCID₅₀ και 1 TCID₅₀. Με τον όρο TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) εννοούμε τη συγκέντρωση εκείνη του ιού που μπορεί να προκαλέσει κυτταροπαθογόνο δράση στο 50% των κυττάρων που ενοφθαλμίστηκαν με τον ιό.
- b) **ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ:** Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι SiHa & CaSki. Είναι επιθηλιακά κύτταρα που προέρχονται από τον άνθρωπο και πιο συγκεκριμένα από τον τράχηλο της μήτρας. Διαθέτουν ενσωματωμένο στο γονιδίωμα τους το γονιδίωμα του HPV16. Αυτές οι κυτταρικές σειρές μπορούν να λειτουργήσουν ως ξενιστές. Η ιδιαιτερότητα τους είναι πως οι κυτταρικές αλλοιώσεις που εμφανίζουν όταν μολυνθούν με τον ιό Sabin 1, είναι εμφανείς μόνο μετά την 5^η ημέρα παρακολούθησης και μόνο όταν το ιικό φορτίο είναι 10⁵ TCID₅₀.
- c) **ΜΟΛΥΝΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ:** Αρχικά, έγινε απόψυξη των κυττάρων SiHa & CaSki τα οποία εν συνεχεία αναπτύχθηκαν στους 37°C, με θρεπτικό υλικό D-MEM με βόειο ορό συγκέντρωσης 10%. Όταν φτάσαμε στον επιθυμητό αριθμό κυττάρων, τα κύτταρα περάστηκαν σε πλάκα μικροπιλοποίησης. Σε αυτήν, έγινε ο ενοφθαλμισμός με το πρότυπο στέλεχος Sabin 1. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:
Είχαμε ετοιμάσει σε falcon πιο πριν, δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀ του πρότυπου στελέχους Sabin 1 (10⁵ και 1 TCID₅₀). Στην πλάκα μικροπιλοποίησης προσθέσαμε 100μL θρεπτικού υλικού D-MEM στην τελευταία στήλη. Η στήλη αυτή δεν θα μολύνονταν με τον ιό, θα χρησιμοποιούνταν ως αρνητικός μάρτυρας, καθώς περιείχε μόνο κύτταρα. Έπειτα, προσθέσαμε σε κάποια πηγαδάκια 100μl του ιού με τη μικρότερη συγκέντρωση (δηλαδή 1TCID₅₀). Αφού ολοκληρώσαμε τη μόλυνση με τη μικρότερη συγκέντρωση, προχωρήσαμε στην συγκέντρωση 10⁵ TCID₅₀ και μολύναμε τα εναπομείναντα πηγαδάκια. Πραγματοποιήθηκε επώαση στον κλίβανο για 1h. Στη συνέχεια, αδειάσαμε το θρεπτικό από την πλάκα και προσθέσαμε εκ νέου 100μl D-MEM σε όλα τα πηγαδάκια και πάλι το αδειάσαμε και τέλος προσθέσαμε 200μl D-MEM, σε όλα τα πηγαδάκια. Κλείσαμε την πλάκα και στη συνέχεια παρατηρήσαμε την εικόνα που εμφανίζουν τα κύτταρα, στο μικροσκόπιο. Τέλος, την τοποθετήσαμε στον κλίβανο.
- d) **ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ:** Έξι ώρες μετά τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε η 1^η απομόνωση, ενώ 12 ώρες μετά τη μόλυνση πραγματοποιήθηκε η 2^η απομόνωση. Σε κάθε περίπτωση, κάναμε

απομόνωση και από τις δύο συγκεντρώσεις TCID₅₀, όπως επίσης και από τον αρνητικό μας μάρτυρα (cell control). Επιπλέον, παρατηρούσαμε την εικόνα των κυττάρων [αν δημιουργούνται συσσωματώματα στα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα και αν εμφανίζεται κυτταροπαθογόνος δράση (CPE) σε αυτά αλλά και στα κύτταρα control].

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται στη συνέχεια:

Αρχικά έγινε έλεγχος της εικόνας των κυττάρων στο μικροσκόπιο για παρατήρηση κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE). Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαμε θρυψίνη, επώασαμε για 1,5min και ελέγξαμε και πάλι τα κύτταρα στο μικροσκόπιο για να δούμε αν ξεκόλλησαν. Έπειτα ξεκινήσαμε να απομονώνουμε τα κύτταρα από ένα πηγαδάκι τη φορά. Ξεκινάμε από τη μικρότερη συγκέντρωση προς τη μεγαλύτερη. Μόλις ολοκληρωθεί η απομόνωση κλείνουμε την πλάκα και την τοποθετούμε και πάλι στον κλίβανο, μέχρι να έρθει η στιγμή για την επόμενη απομόνωση (1^η απομόνωση στις 6 ώρες 2^η στις 12 ώρες).

e) RNA EXTRACTION: Η εκχύλιση του RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Qiagen. Η διαδικασία της εκχύλισης έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες που υπήρχαν στο kit (RNeasy Mini Kit).

f) Αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR): Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το γένωμα των εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Για να δημιουργηθεί το συμπληρωματικό του cDNA, πρέπει να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Σε αυτήν, χρησιμοποιείται ως εκμαγείο το RNA και με τη δράση ενός ενζύμου, της αντίστροφης μεταγραφάσης, συντίθεται το cDNA. Για τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής-αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Reverse Transcription/ RT-PCR) απαιτούνται τέσσερα βασικά αντιδραστήρια: ο στόχος RNA, ο εκκινητής (primer), το ένζυμο (αντίστροφη μεταγραφάση-RT) και dNTPs. Το σύνολο αυτών θα πρέπει να είναι σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer).

Για να πραγματοποιηθεί η RT-PCR, αρχικά προετοιμάσαμε το πρώτο μίγμα.

Αρχικά, προετοιμάσαμε το πρώτο μίγμα που θα χρησιμοποιηθεί στην αντίδραση. Από αυτό το μίγμα, προσθέσαμε 7μl σε κάθε tube. Αυτά τα 7μl περιείχαν 1μl από τον εκκινητή (50pmol/μl), 1μl dNTPs (40mM) & 5μl ddH₂O. Στη συνέχεια προστέθηκαν και 5μl από τα δείγματα μας σε κάθε tube. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση στους 65°C για 5min σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf. Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον πάγο. Παράλληλα ετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα. Από αυτό το δείγμα, προστέθηκαν 8μL σε κάθε μικροσωληνάριο. Σε αυτά τα 8μL περιείχονταν 4μl First Strand Buffer (5x), 2μl DTT (0,1mM), 0,5μl RNAase out (40units/μl), 0,5μl RT Superscript-II (200units/μl) & 1μl ddH₂O. Αφού προστέθηκαν από 8μl του δεύτερου μίγματος σε κάθε μικροσωληνάριο, έγινε και πάλι φυγοκέντρηση και

ακολούθησε επώαση στο θερμικό κυκλοποιητή για 50min στους 42°C και για 15min στους 70°C.

Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για το θετικό κλώνο ήταν ο UC53flap ο οποίος στοχεύει στην 5'UTR (antisense).

Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για τον αρνητικό κλώνο στα κύτταρα SiHa & CaSki ήταν ο EntNS3, ο οποίος στοχεύει στην 5'-UTR και έχει την ιδιαιτερότητα ότι έχει μια δομή θηλιάς. Η δομή αυτή αναγνωρίζεται από έναν από τους εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν στην PCR και με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατός ο εντοπισμός του αντιγραφόμενου κλώνου, παρόλο που ο αριθμός τους είναι πολύ μικρότερος συγκριτικά με τα μόρια του θετικού κλώνου.

g) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR): Για τη διαδικασία της PCR με σκοπό την ανίχνευση του θετικού κλώνου, χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG52flap/UC53flap. Το ζεύγος αυτό στοχεύει στην 5'-UTR των εντεροϊών και δίνει προϊόν μήκους 450 bp. Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά, προετοιμάστηκε το μίγμα, από το οποίο στη συνέχεια προστέθηκαν 47μl σε κάθε μικροσωληνάριο. Αυτά τα 47μl περιείχαν: 5μl dNTPs (1mM), 5μl KAPA Taq Buffer (1x), 1μl MgCl₂ (τελική συγκέντρωση 2mM), 0,1μl KAPA Taq (0.5U), 0,2μl από κάθε εκκινητή (10pmol) & 35,5μl ddH₂O. Αφού μοιράστηκε το μίγμα στα μικροσωληνάρια, προστέθηκαν και 3μl από το δείγμα μας (cDNA) σε κάθε μικροσωληνάριο. Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf και ακολούθησε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στις εξής συνθήκες:

Για τον θετικό κλώνο

95° C	2min	Αποδιάταξη του cDNA	1 cycle
95° C	30sec	Αποδιάταξη του cDNA	40 cycles
63° C	30sec	Υβριδισμός των εκκινητών	
72° C	30sec	Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq-πολυμεράση	
72° C	2min	Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων	1 cycle

Για την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου χρησιμοποιήθηκε ένα διαφορετικό ζεύγος εκκινητών: οι EntNS1f/UC53flap για τα κύτταρα SiHa και για τα κύτταρα CaSki, οι οποίοι δίνουν ένα προϊόν μήκους 438bp. Ο εκκινητής EntNS1f είναι ειδικός καθώς έχει την ίδια νουκλεοτιδική αλληλουχία με ένα τμήμα του EntNS3 που περιλαμβάνει την αλληλουχία θηλιάς. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, αν και υπάρχουν

πολύ λίγα αντίγραφα του στο κύτταρο, σε σύγκριση με τα μόρια του θετικού κλώνου. Και σε αυτήν την περίπτωση προετοιμάστηκε το μίγμα και στη συνέχεια προστέθηκαν 47μl αυτού στα μικροσωληνάρια των 200μl. Αυτά τα 47μl περιείχαν: 5μl dNTPs (1mM), 5μl KAPA Taq Buffer (10x), 1μl MgCl₂ (2 mM), 0,1μl KAPA Taq (0,5U), 0,2μl από κάθε εκκινητή (10pmol) & 35,5μl ddH₂O. Αφού μοιράστηκε το μίγμα στα μικροσωληνάρια, προστέθηκαν και 3μl από το δείγμα μας (cDNA) σε κάθε μικροσωληνάριο. Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf και ακολούθησε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στις εξής συνθήκες:

95° C	2min	Αποδιάταξη του cDNA	1 cycle
95° C	30sec	Αποδιάταξη του cDNA	40 cycles
55° C	30sec	Υβριδισμός των εκκινητών	
72° C	30sec	Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq- πολυμεράση	
72° C	2min	Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων	1 cycle

h) ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΦΩΛΙΑΣ (NESTED PCR):

Πραγματοποιήθηκε nested PCR μόνο για τα προϊόντα της PCR που αφορούσαν τον αρνητικό κλώνο, στα δείγματα που προέρχονται από τα κύτταρα SiHa και Caski. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ENV1/ENV2 οι οποίοι δίνουν προϊόν μήκους 158bp. Όπως και στις προηγούμενες PCR, το πρώτο βήμα ήταν να προετοιμαστεί το μίγμα, από το οποίο προστέθηκαν 47μl σε κάθε μικροσωληνάριο των 200μl. Αυτά τα 47μl περιείχαν: 5μl dNTPs (1mM), 5μl KAPA Taq Buffer (10X), 1μl MgCl₂ (2 mM), 0,1μl KAPA Taq (0.5U), 0,2μl από κάθε εκκινητή (10pmol) & 35,5μl ddH₂O. Αφού μοιράστηκε το μίγμα στα μικροσωληνάρια, προστέθηκαν και 3μl από το δείγμα μας (cDNA) σε κάθε μικροσωληνάριο. Στη συνέχεια, τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή Eppendorf και ακολούθησε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης στις εξής συνθήκες:

95° C	2min	Αποδιάταξη του cDNA	1cycle
95° C	30sec	Αποδιάταξη του cDNA	

55° C	30sec	Υβριδισμός των εκκινητών	30 cycles
72° C	30sec	Επιμήκυνση των κλώνων από την Taq-πολυμεράση	
72° C	2min	Επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων.	1cycle

Παρακάτω παρατίθεται ένας πίνακας με την αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην RT, PCR & nested-PCR.

UG52-flap	sense	AATAAATCATAACAAGCACTTCTGTTTCCCCGG
UC53-flap	antisense	AATAAATCATAATTGTCACCATAACCAGCCA
EntNS1-f	sense	CGTTCCCCGCCGTGCGAC
ENV-1	antisense	GATTGTCACCATAAGCAGC
ENV-2	sense	CCCCTGAATGCGGCTAATC

Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του θετικού κλώνου είναι ο UC53-flap όπως προαναφέρθηκε. Στοχεύει στην 5'-UTR των εντεροϊών, που είναι η πιο συντηρημένη περιοχή τους. Στη συνέχεια ακολουθεί ενίσχυση του θετικού κλώνου με το ζεύγος εκκινητών UG52-flap & UC53-flap όπου και πάλι στόχος είναι η 5'-UTR. Ο λόγος των θετικών κλώνων προς τους αρνητικούς είναι περίπου 50 προς 1 στα κύτταρα που μολύνθηκαν από έναν εντεροϊό. Αυτό καθιστά εύκολη την ανίχνευση των θετικών κλώνων, αλλά πιο δύσκολη την ανίχνευση των αρνητικών κλώνων. Όσο αφορά την RT-PCR που είχε ως στόχο την ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο EntNS3 και στη συνέχεια το εκκινητικό ζεύγος EntNS1f/UC53flap. Και αυτός ο εκκινητής έχει ως στόχο την 5'-UTR, αλλά έχει μια ιδιαιτερότητα. Η ιδιαιτερότητα αυτή έγκειται στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος εκκινητής έχει μια δομή θηλιάς στην αλληλουχία του. Συνεπώς

το cDNA που προκύπτει από την RT-PCR θα διαθέτει τη δομή θηλιάς στο 5' άκρο του και μια ειδική ιική αλληλουχία στο 3' άκρο του. Ο EntNS1-f υβριδοποιείται στη δομή θηλιάς που έχει δημιουργηθεί λόγω του προηγούμενου εκκινήτη (EntNS3). Κατά αυτόν τον τρόπο, αυξάνεται κατά πολύ η ειδικότητα της μεθόδου.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ: Οι φωσφορικές ομάδες των δέοξυ-νουκλεοτιδίων προσδίδουν αρνητικό φορτίο στο DNA, το οποίο παρουσία διαλύματος ηλεκτροφόρησης TBE 1X, θα «τρέξει» από τον αρνητικό πόλο προς τον θετικό, σε μια συσκευή ηλεκτροφόρησης όπου εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού. Όσο πιο μεγάλο είναι το προϊόν της PCR, τόσο πιο δύσκολα κινείται μέσα στο πήκτωμα της αγαρόζης. Έτσι, χρησιμοποιώντας πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης, επιτυγχάνουμε τον επιθυμητό διαχωρισμό ανάλογα με το εύρος βάσεων που θέλουμε να ξεχωρίσουμε.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων από τις PCR που πραγματοποιήθηκαν (τόσο για τον αρνητικό όσο και για τον θετικό κλώνο) χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Πιο συγκεκριμένα, 1,2gr αγαρόζης και 60mL (Tris-Boric acid-EDTA), αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη των 250mL. Στη συνέχεια θερμάνθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 1', με σκοπό τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr₂), τέτοιας ποσότητας ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1μg/mL. Έπειτα, το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης, μέχρι να πήξει. Αφού έπηξε, σχηματίστηκε η επανομαζόμενη πήκτη αγαρόζης, στην οποία υπήρχαν οπές (τα πηγαδάκια). Σε καθένα από αυτά, φορτώθηκαν 10μl του προϊόντος της PCR αναμεμιγμένα με 2μl χρωστική. Για να προσδιορίσουμε το μέγεθος του προϊόντος μας σε μήκος βάσεων, θα πρέπει σε ένα από τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης, να προσθέσουμε και έναν μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder). Ο ladder που χρησιμοποιήσαμε ήταν ο 100bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η τάση η οποία εφαρμόστηκε ήταν 120Volt για 30'. Αφού ολοκληρώθηκε η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UVFoto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της nested-PCR ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, με μόνη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 3% διότι το προϊόν της PCR είχε μικρότερο μέγεθος.

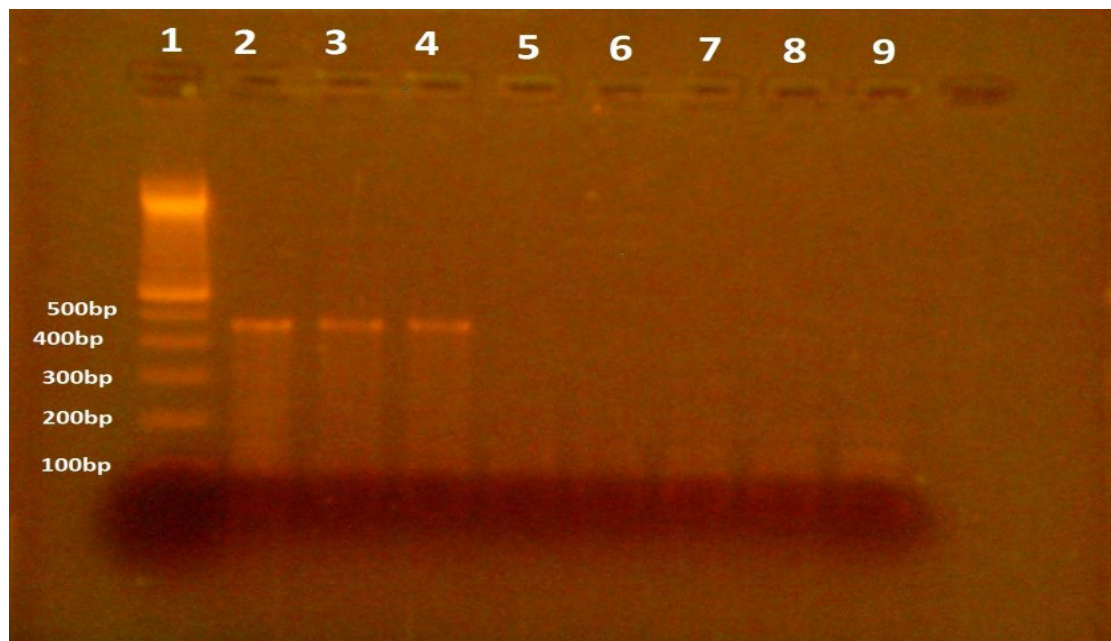
(4) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως προαναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκαν PCR που είχαν ως στόχο να ενισχύσουν τον θετικό και αρνητικό κλώνο του πρότυπου στελέχους Sabin 1, με το οποίο είχαμε μολύνει κύτταρα SiHa & CaSki.

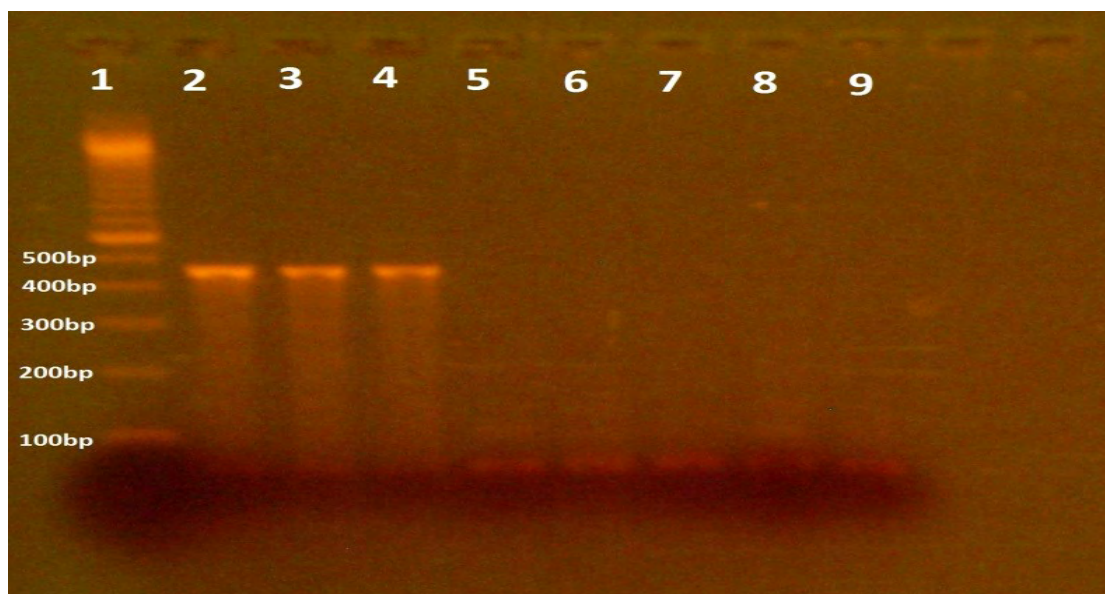
a) Κύτταρα SiHa

Θετικός κλώνος: Η PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του θετικού κλώνου σε κύτταρα SiHa, είχε ως ζεύγος εκκινητών τους UG52flap/UC53flap με προϊόν μήκους 458bp. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από απομονώσεις των κυττάρων στις 6h & 12h και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.

Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τον θετικό κλώνο, (απομόνωση των 6h). (1) Μάρτυρας Μοριακού Βάρους (100bp), **(2)** 10^5 A, **(3)** 10^5 B **(4)** 10^5 C, **(5)** 1 A, **(6)** 1 B, **(7)** 1 C, **(8)** Cell control 6h (c.c.), **(9)** ddH₂O

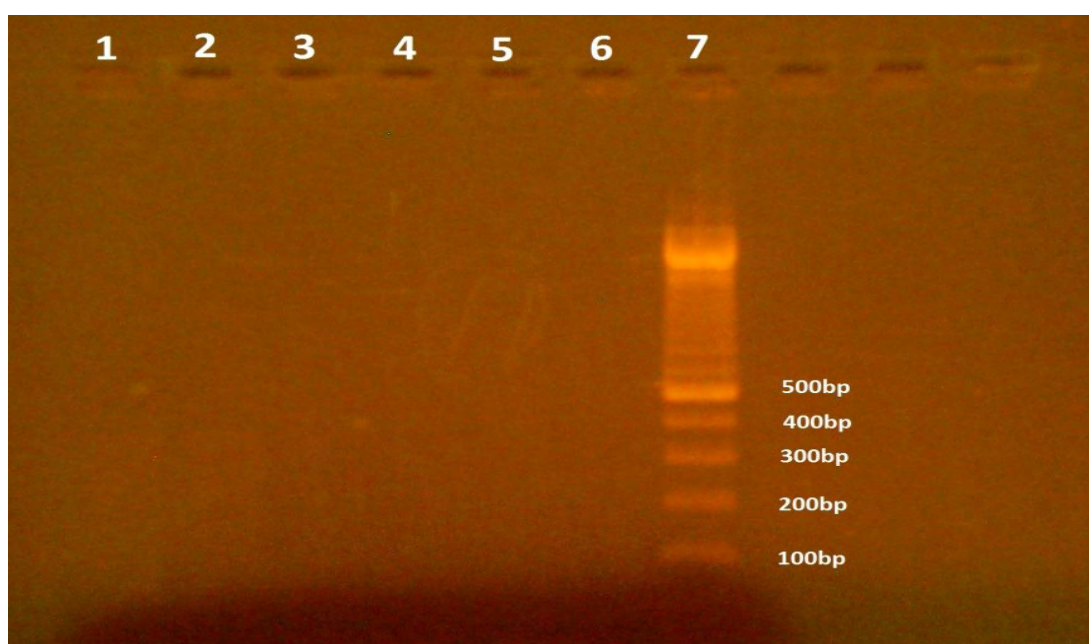


Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τον θετικό κλώνο, (απομόνωση των 12h). (1) Μάρτυρας Μοριακού Βάρους (100bp), (2) 10⁵ A, (3) 10⁵ B, (4) 10⁵ C, (5) 1 A, (6) 1 B, (7) 1 C (8) Cell control 12h (c.c), (9) ddH₂O

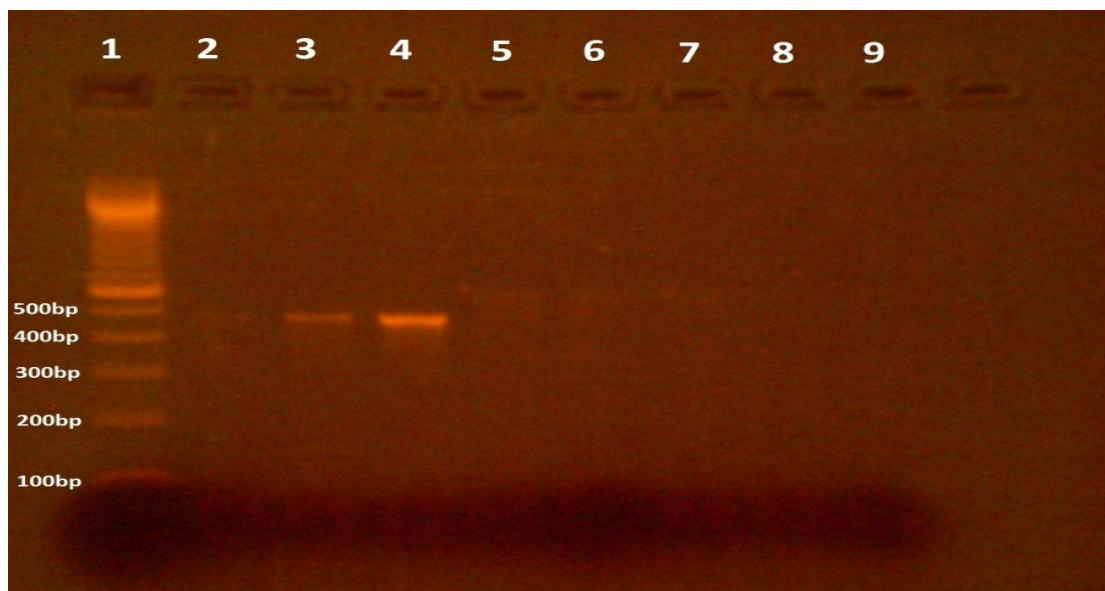


Αρνητικός κλώνος: Η PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του αρνητικού κλώνου σε κύτταρα SiHa, είχε ως ζεύγος εκκινήτων τους EntNS1/UC53flap με προϊόν μήκους 446bp. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από απομονώσεις των κυττάρων στις 6h & 12h και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.

Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR για τον αρνητικό κλώνο (απομόνωση των 6h). (1) 10⁵ A, (2) 10⁵ B, (3) 1 A, (4) 1 B, (5) Cell control 6h (c.c.), (6) ddH₂O (7) Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp)



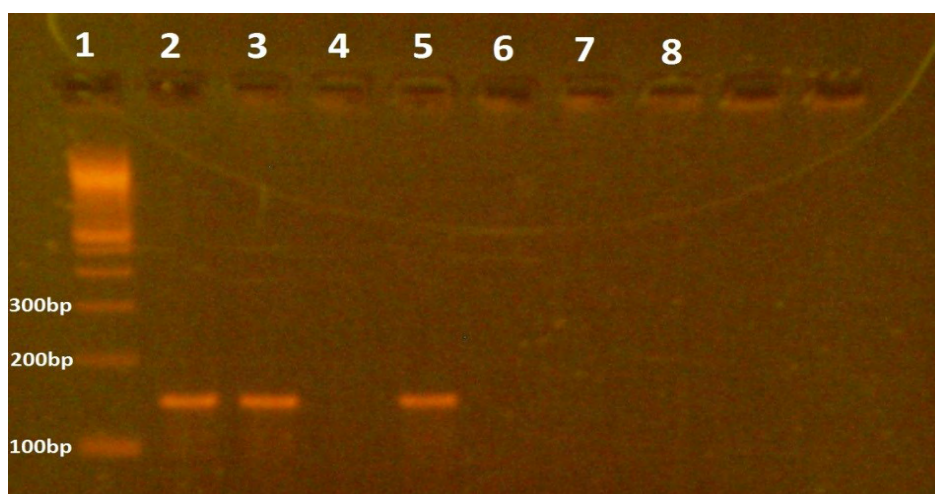
Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης της PCR για τον αρνητικό κλώνο (απομόνωση των 12h). (1) Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp), (2) 10⁵ A, (3) 10⁵ B, (4) 10⁵ C, (5) 1 A, (6) 1 B, (7) 1 C, (8) Cell control 12h (c.c.) (9) ddH₂O



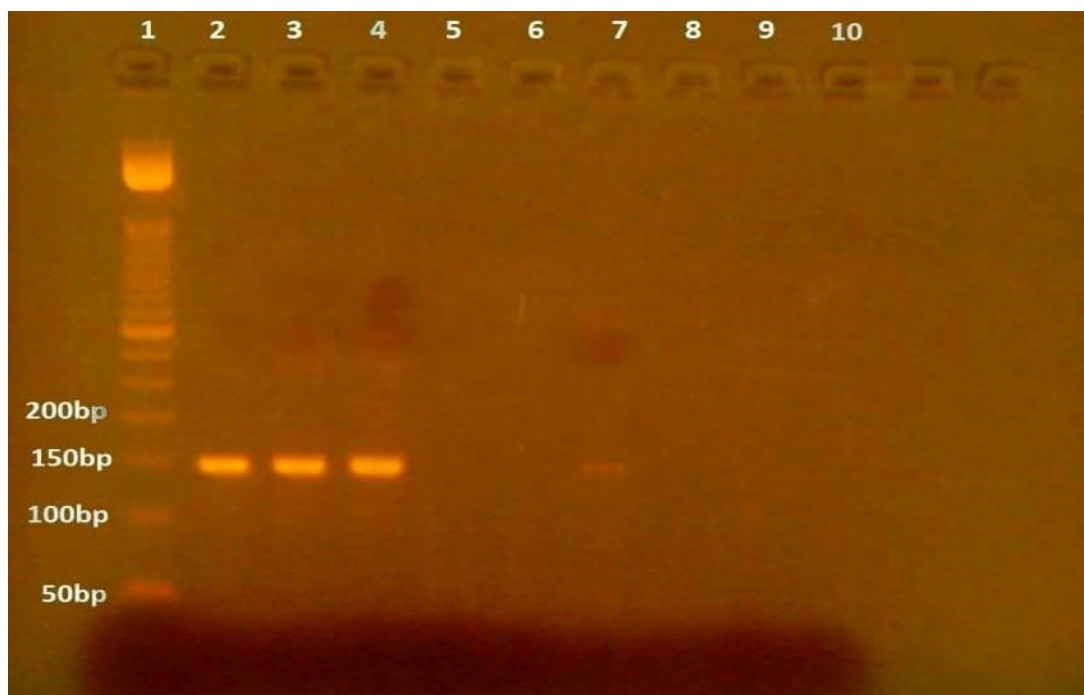
b) Κύτταρα SiHa-Nested PCR:

Η nested-PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του αρνητικού κλώνου σε κύτταρα SiHa, είχε ως ζεύγος εκκινητών τους ENV1/ENV2 με προϊόν μήκους 158bp. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από απομονώσεις των κυττάρων στις 6h & 12h και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στις παρακάτω εικόνες.

Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της nested-PCR για τον αρνητικό κλώνο (απομόνωση των 6h). (1) Μάρτυρας Μοριακού Βάρους (100bp), (2) 10⁵ A, (3) 10⁵ B, (4) ddH₂O της PCR, (5) 1 A, (6) 1 B, (7) Cell control 6h (c.c.), (8) ddH₂O της nested-PCR



Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της nested-PCR για τον αρνητικό κλώνο (απομόνωση των 12h). (1) Μάρτυρας Μοριακού Βάρους (50bp), (2) 10⁵ A, (3) 10⁵ B, (4) 10⁵ C, (5) ddH₂O της PCR, (6) 1 A, (7) 1 B, (8) 1 C, (9) Cell Control 12h (c.c.), (10) ddH₂O της nested-PCR.



Μια συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων όσο αφορά τη μόλυνση των κυττάρων SiHa από το εμβολιακό πρότυπο στέλεχος Sabin 1, βρίσκεται στους παρακάτω πίνακες.

	Θετικός κλώνος	
	10 ⁵	1
6h	+	-
12h	+	-

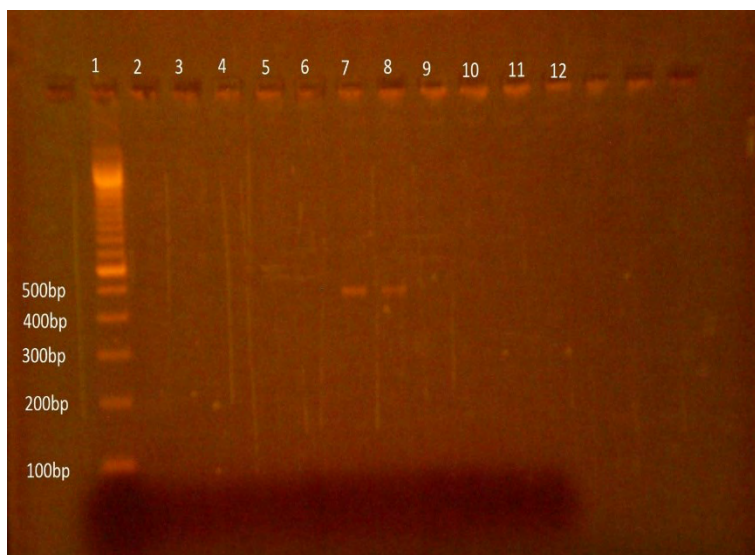
	Αρνητικός κλώνος			
	Απλή PCR		Nested PCR	
	10 ⁵	1	10 ⁵	1
6h	+ (αχνή)	-	+	+
12h	+	-	+	+

c) Κύτταρα CaSki

Θετικός κλώνος: Η PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του θετικού κλώνου σε κύτταρα CaSki, είχε ως ζεύγος εκκινητών τους UG52flap/UC53flap με προϊόν μήκους 458bp. Τα δείγματα που

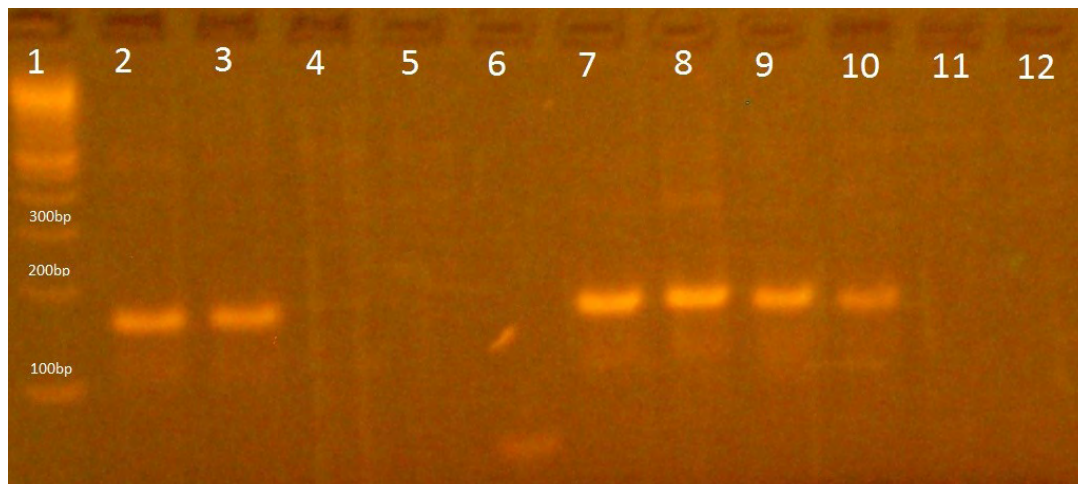
χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από απομονώσεις των κυττάρων στις 6h & 12h και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της PCR για τον θετικό κλώνο. (1) Μάρτυρας μοριακού βάρους (100bp) **(2)** 6h:10⁵ A, **(3)** 6h:10⁵ B, **(4)** 6h:1 A, **(5)** 6h:1 B, **(6)** 6h: Cell control (c.c.), **(7)** 12h:10⁵ A, **(8)** 12h:10⁵ B, **(9)** 12h:1 A, **(10)** 12h:1 B, **(11)** 12h: Cell control (c.c.), **(12)** ddH₂O



Αρνητικός κλώνος: Η PCR που πραγματοποιήθηκε για την ενίσχυση του αρνητικού κλώνου σε κύτταρα CaSki, είχε ως ζεύγος εκκινητών τους EntNS1-f/UC53flap με προϊόν μήκους 446bp. Έπειτα ακολούθησε nested-PCR με το ζεύγος εκκινητών ENV-1/ENV-2, με προϊόν μήκους 158bp. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από απομονώσεις των κυττάρων στις 6h & 12h και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην παρακάτω εικόνα.

Απεικόνιση των αποτελεσμάτων της PCR για τον αρνητικό κλώνο μέσω Nested-PCR για CaSki. (1) Μάρτυρας Μοριακού Βάρους (100bp), **(2)** 6h:10⁵ A, **(3)** 6h:10⁵ B, **(4)** 6h:1 A, **(5)** 6h:1 B, **(6)** ddH₂O, **(7)** 12h:10⁵ A, **(8)** 12h:10⁵ B, **(9)** 12h:1 A, **(10)** 12h:1 B **(11)** Cell control, **(12)** ddH₂O



Μια συνοπτική παρουσίαση των αποτελεσμάτων όσο αφορά τη μόλυνση των κυττάρων CaSki από το εμβολιακό πρότυπο στέλεχος Sabin 1, βρίσκεται στους παρακάτω πίνακες.

	Θετικός κλώνος	
	10 ⁵	1
6h	+ (πολύ αχνή)	-
12h	+	-

	Αρνητικός κλώνος	
	10 ⁵	1
6h	+	-
12h	+	+

(5) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί διαθέτουν ως γένωμα, μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Κατά την αντιγραφή του ιού, αυτός ο θετικός κλώνος λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση ενός κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας από την RNA-εξαρτώμενη-RNA-πολυμεράση ($3D^{pol}$). Ο αρνητικός κλώνος χρησιμοποιείται με τη σειρά του από την $3D^{pol}$ ως μήτρα για τη σύνθεση πολλών αντιγράφων θετικής πολικότητας, τα οποία μεταφράζονται για να δημιουργηθούν οι δομικές πρωτεΐνες και να συντεθούν τα νέα καψίδια του ιού. Όπως γίνεται αντιληπτό, η ανίχνευση των κλώνων αρνητικής πολικότητας, λειτουργεί ως ένδειξη ότι το πρώτο βήμα της αντιγραφής του ιού λαμβάνει χώρα. Αυτό σημαίνει πως ο ιός είναι πλέον ενεργός. Οι εντεροϊοί ευθύνονται για ένα πλήθος ασθενειών που προσβάλλουν τους ανθρώπους. Άλλες είναι ιδιαίτερα σοβαρές, ενώ άλλες λιγότερο σοβαρές. Σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει μια παθολογική κατάσταση σε έναν οργανισμό-ξενιστή, και υπάρχει επίσης η υποψία ότι ευθύνεται και κάποιος εντεροϊός για την κατάσταση αυτή. Ανάλογα με τον αν είναι γεγονός η ύπαρξη και η ενεργότητα του ιού ή όχι, βγαίνει η αντίστοιχη διάγνωση και ακολουθείται και η κατάλληλη θεραπεία. Όπως είναι προφανές, θα πρέπει να ελέγχεται με προσοχή αν η ύπαρξη του ιού συμβάλλει στην ασθένεια ή όχι.

Στο παρελθόν είχαν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι που βασίζονταν κυρίως σε τεχνικές υβριδισμού, για να ανιχνευτεί ο αρνητικός κλώνος. Παράδειγμα αποτελεί μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε για να ελεγχθεί η ύπαρξη του αρνητικού κλώνου RNA σε ασθενείς με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας της καρδιάς, οι οποίοι ήταν υποψήφιοι για μυοκαρδίτιδα (Matthias Pauschinger, Andrea Doerner, Uwe Kuehl, Peter L. Schwimmbeck, Wolfgang Poller, Reinhard Kandolf, Heinz-Peter Schultheiss, 1999). Σε αυτή τη μελέτη εφαρμόστηκε RT-PCR σε συνδυασμό με Southern Blot. Σε μια άλλη μελέτη που αφορούσε και πάλι δείγματα από ιστό του μυοκαρδίου, εφαρμόστηκε η τεχνική του *in situ* υβριδισμού έτσι ώστε να γίνει η ανίχνευση θετικών & αρνητικών κλώνων ξεχωριστά (Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, Hofschneider PH, Kandolf R. 1991).

Στην παρούσα μελέτη έγινε καλλιέργεια κυττάρων SiHa & CaSki, τα οποία ενοφθαλμίστηκαν με δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις TCID₅₀ του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 (10^5 TCID₅₀ και 1 TCID₅₀). Ακολούθησε απομόνωση των κυττάρων με τον ιό καθώς και κυττάρων που δεν είχαν εμβολιαστεί με τον ιό (αρνητικός μάρτυρας), στις 6 και στις 12 ώρες μετά τη μόλυνση. Το επόμενο βήμα ήταν η εκχύλιση του RNA. Από εκεί και πέρα έλαβε χώρα RT-PCR στην οποία χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικοί εκκινητές για να μεταγραφεί το RNA θετικής πολικότητας και το RNA αρνητικής πολικότητας. Στα κύτταρα SiHa όπως και στα CaSki διαπιστώθηκε πως περνάει ο ιός, από τη στιγμή που ανιχνεύεται το RNA θετικής πολικότητας, από τις 6 πρώτες ώρες της μόλυνσης όταν έχουμε συγκέντρωση 10^5 TCID₅₀, ενώ για τη συγκέντρωση 1 TCID₅₀ δεν παίρνουμε σήμα ούτε στις 6h ούτε στις

12h (πιθανώς επειδή είναι πολύ χαμηλή η συγκέντρωση του ιού ώστε να ανιχνευθεί). Ακόμη, διαπιστώσαμε πως ο ιός είναι ενεργός, από τη στιγμή που ανιχνεύεται το RNA αρνητικής πολικότητας και στους δύο τύπους κυττάρων, στις 6h & στις 12h στη συγκέντρωση 10^5 TCID₅₀. Για το 1 TCID₅₀ στα κύτταρα SiHa παίρνουμε σήμα στις 6h & στις 12h, ενώ στα κύτταρα CaSki παίρνουμε σήμα μόνο στις 12h.

Όσο αφορά τον εκκινητή που στοχεύει στον αρνητικό κλώνο, προαναφέραμε ότι διαθέτει μια δομή θηλιάς. Όταν πραγματοποιήθηκε η PCR, ένας εκ των δύο εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, στόχευε σε αυτή τη δομή θηλιάς. Κατά αυτόν τον τρόπο ήταν δυνατή η ανίχνευση του αρνητικού κλώνου, παρόλο που το πλήθος των μορίων του αρνητικού κλώνου είναι πολύ μικρότερο σε σχέση με αυτό του θετικού κλώνου. Αυτό καθιστά δυνατή την δημιουργία ενός διαγνωστικού τεστ το οποίο μέσα σε μικρό χρονικό διάστημα θα μας δίνει τη δυνατότητα να ελέγξουμε την ύπαρξη του ιού σε μια κυτταρική σειρά, όπως επίσης και αν αυτός είναι ενεργός. Η ανάγκη δημιουργίας αυτού του διαγνωστικού τεστ είναι μεγάλη, διότι ναι μεν υπήρχαν τεχνικές που χρησιμοποιούνταν στο παρελθόν για να ανιχνεύσουν την ύπαρξη του αρνητικού κλώνου ενός εντεροϊού σε συγκεκριμένα δείγματα αλλά ήταν ιδιαίτερα χρονοβόρες και αναξιόπιστες. Τα δύο βασικότερα πλεονέκτημα που προσφέρει αυτή η μέθοδος είναι ότι: (α) είναι ιδιαίτερα γρήγορη, καθώς μέσα σε 6 ή 12 ώρες μετά την παραλαβή του δείγματος μπορούμε να έχουμε ένα αξιόπιστο αποτέλεσμα & (β) υπάρχει η δυνατότητα ανίχνευσης του αρνητικού κλώνου, ακόμα και αν υπάρχουν ελάχιστα αντίγραφα του στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή αυξάνοντας έτσι την ταχύτητα και αξιοπιστία της διαγνωστικής μεθόδου.

(6) ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Agol VI, Belov GA, Bienz K, et al.** Two types of death of poliovirus-infected cells: caspase involvement in the apoptosis but not cytopathic effect. *Virology* 1998; 252(2):343-353.
- **Ambros V, Petterson RF, Baltimore D.** An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell* 1978; 15(4):1439-1446.
- **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(14):6739-6744.
- **Barton DJ, Morasco BJ, Flanagan JB.** Translating ribosomes inhibit poliovirus negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 1999; 73(12):10104-10112.
- **Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al.** An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005; 79(18):11962-11973.
- **Chow M, Newman JF, Filman D, et al.** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* 1987; 327(6122):482-486.
- **Doedens JR, Giddings TH Jr, Kirkegaard K.** Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J Virol* 1997; 71(12):9054-9064.
- **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(5):1567-1579.

- **Flanegan 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 U S A* 1977; 74(3):961-965.
- **Forss S, Schaller H.** A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res* 1982; 10(20):6441-6450.
- **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(5):1934-1945.
- **Gamarnik AV, Andino R.** Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* 1997; 3(8):882-892.
- **Grandi A, Svitkin YV, Imataka H, et al.** Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIFGI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(19):11089-11094.
- **Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al.** The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 1989; 56:839-847.
- **Gustin KE, Sarnow P.** Effects of poliovirus infection of nucleo-cytoplasmic trafficking and nuclear pore complex composition. *EMBO J* 2001; 20(1-2):240-249.
- **Hahn H, Palmenberg AC.** Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J Virol* 1995; 69(4):2697-2699.

- **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(6):2961-2971.
- **Jarvis TC, Kirkegaard K.** Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J* 1992; 11(8):3135-3145.
- **Jore J, De Geus B, Jackson RJ, et al.** Poliovirus protein 3CD is the active protease for processing of the precursor protein P1 in vitro. *J Gen Virol* 1988; 69(Pt 7): 1627-1636.
- **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(1):59-63.
- **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(5):855-865.
- **Morasco BJ, Sharma N, Parilla J, et al.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but no negative-strand RNA synthesis. *J Virol* 2003; 77(9):5136-5144.
- **Murray KE, Barton DJ.** 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.
- **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(5617):208-213.
- **Nomoto A, Kitamura N, Golini F, et al.** The 5'-terminal structures of poliovirion RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5345-5349.

- **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.
- **Ohlmann T, Rau M, Morley SJ, et al.** Proteolytic cleavage of initiation factor eIF-4 gamma in the reticulocyte lysate inhibits translation of capped mRNAs but enhances that of uncapped mRNAs. *Nucleic Acids Res* 1995; 23(3):334-340.
- **Parsley TB, Towner JS, Blyn LB, et al.** Poly (rC) binding protein 2 forms a ternary complex with the 5'-terminal sequences of poliovirus RNA and the viral 3CD proteinase. *RNA* 1997; 3(10):1124-1134.
- **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(22):10359-10370.
- **Perera R, Daijogo S, Walter BL, et al.** Cellular protein modification by poliovirus: the two faces of poly(rC)-binding protein. *J Virol* 2007; 81(17):8919-8932.
- **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(2):357-365.
- **Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, et al.** A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* 1989; 56:849-853.
- **Summers DF, Maizel JV.** Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968; 59:996-971.

- **Todd S, Towner JS, Brown DM, et al.** Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. J Virol 1997; 71(11):8868-8874.
- **Tolskaya EA, Romanova LI, Kolesnikova MS, et al.** Apoptosis-including and apoptosis-preventing functions of poliovirus. J Virol 1995; 69(2):1181-1182.
- **Yogo Y, Wimmer E.** Polyadenylic acid at the 3'-terminus of poliovirus RNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69(7):1877-1882.
- **Yogo Y, Teng MH, Wimmer E.** Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. Biochem Biophys Res Commun 1974; 61(4):1101-1109.
- **Bell EJ, McCartney RA.** A study of Coxsackie B virus infections. J Hyg (Lond) 1984; 93(2):197-203.
- **Danes L, Jaresova I.** Neutralization microtest with human coxsackievirus and echovirus serotypes. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol 1985; 29(4):399-408.
- **Lau R.C.** Coxsackie B virus infections in New Zealand patients with cardiac and no-cardiac diseases. J Med Virol 1983; 11(2):131-7
- **Manjunath N, Balaya S, Seth P.** Serological survey for neutralizing antibodies against group B coxsackieviruses in normal population in Delhi area. Indian J Med Res 1982; 76:656-61.
- **Margalith M, Fattal B, Shuval HI, Morag A.** Prevalence of antibodies to enteroviruses and varicella-zoster virus among residents and overseas volunteers at agricultural settlements in Israel. J Med Virol 1986; 20(2):189-97.

- **Mukundan P, John TJ.** Prevalence and titres of neutralising antibodies to group B coxsackieviruses. *Indian J Med Res* 1983; 77:577-89.
- **Santhanam S, Choudhury DS.** Antibodies against coxsackie B2 virus in infants and children in Delhi. *J Commun Dis* 1984; 16(4):304-6.
- **Palacios G, Oberste MS.** Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *J Neurovirol.* 2005; 11(5):424-33.
- **Oberste MS, Pallansch MA.** Establishing evidence for Enterovirus infection in chronic disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1005:23-31
- **Oberste MS, Maher K, Kennett ML, Campbell JJ, Carpenter MS, Schnurr D, Pallansch MA.** Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol* 1999; 37(12):3928-33
- **Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, de la Torre JC, Portela A, Ortin J, Lopez- Galindez C, Perez-Brena P, Villanueva N, Najera R, et al.** The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance-a. *Gene* 1985; 40(1):1-8
- **Egger D, Bienz K.** Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication sites. *J Virol* 2002; 76(21):10960-71.
- **Tolskaya EA, Romanova LI, Blinov VM, Viktorova EG, Sinyakov AN, Kolesnikova MS, Agol VI.** Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: the primary structure and nonrandom distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. *Virology* 1987; 161(1):54-61.
- **Kirkegaard K, Baltimore D.** The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 1986; 47(3):433-43.

- **Chetverin A.B.** The puzzle of RNA recombination. FEBS Lett 1999; 460(1):1-5.
- **Georgescu MM, Tardy-Panit M, Guillot S, Crainic R, Delpeyroux F.** Mapping of mutations contributing to the temperature sensitivity of the Sabin 1 vaccine strain of poliovirus. J Virol 1995; 69(9):5278-86.
- **Melnick J.L.** Current status of poliovirus infections. Clin Microbiol Rev 1996; 9(3):293-300
- **Langford MP, Robertson JB, Orillac R.** Analysis of neutralizing antibodies to Enterovirus 70 and Coxsackievirus A24 variant, levels of immunoglobulins and total protein in tears of patients with acute hemorrhagic conjunctivitis. Ocul Immunol Inflamm 1995; 3(4):249-60
- **Rotbart HA, Brennan PJ, Fife KH, Romero JR, Griffin JA, McKinlay MA, Hayden FG.** Enterovirus meningitis in adults. Clin Infect Dis 1998; 27(4):896-8
- **Nowak-Wegrzyn A, Phipatanakul W, Winkelstein JA, Forman MS, Lederman HM.** Successful treatment of Enterovirus infection with the use of Pleconaril in 2 infants with severe combined immunodeficiency. Clin Infect Dis 2001; 32(1):E13-4
- **Schiff GM, Sherwood JR.** Clinical activity of Pleconaril in an experimentally induced coxsackievirus A21 respiratory infection. J Infect Dis 2000; 181(1):20-6
- **Oberste MS, Maher K, Schurr D, Flemister MR, Lovchik JC, Peters H, Sessions W, Kirk C, Chatterjee N, Fuller S, Hanauer JM, Pallansch MA.** Enterovirus 68 is associated with respiratory illness and shares biological features with both the enteroviruses and the rhinoviruses. J Gen Virol 2004(Pt 9): 2577-84

- **LaRue R, Myers S, Brewer L, Shaw DP, Brown C, Seal BS, Njenga MK.** A wild-type porcine encephalomyocarditis virus containing a short poly(C) tract is pathogenic to mice, pigs and cynomolgous macaques. *J Virol* 2003; 77(17):9136-46
- **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(1):120-8
- **Pauschinger M, Phan MD, Doerner A, Kuehl U, Schwimmbeck PL, Poller W, Kandolf R, Schultheiss HP.** Enteroviral RNA replication in the myocardium of patients with left ventricular dysfunction and clinically suspected myocarditis. *Circulation* 1999; 99(7):889-95
- **Hohenadl C, Klingel K, Mertsching J, Hofschneider PH, Kandolf R.** Strand-specific detection of enteroviral RNA in myocardial tissue by in situ hybridization. *Mol Cell Probes* 1991; 5(1):11-20