



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πτυχιακή Μελέτη

Ανάπτυξη μίας ισοθερμικής τεχνικής αντίστροφης
μεταγραφής (Reverse Transcription-Loop
mediated isothermal amplification, RT-LAMP) για
την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C

Δάσκου Μαρία

Λάρισα 2016

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Π.ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ):

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

Δ.ΜΟΣΙΑΛΟΣ:

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

Γ.ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ:

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

Ανάπτυξη μίας ισοθερμικής τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP) για την ανίχνευση εντεροϊών της ομάδας C.

Development of a Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification assay (RT-LAMP) for the detection of enteroviruses C species.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Οκτώβριο του 2015 έως τον Μάιο του 2016.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όσον αφορά την ανάθεση αυτής της πτυχιακής εργασίας, καθώς και για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση του κατά τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Αμούτζια Γρηγόριο, που δέχτηκαν να συμμετέχουν στην τριμελή επιτροπή.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον υποψήφιο διδάκτορα Δημητρίου Τηλέμαχο για την ανεκτίμητη βοήθεια αλλά και συμπαράστασή που μου προσέφερε στο εργαστήριο καθ'όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθεια τους αλλά και για τη φιλική τους διάθεση.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to *Picornaviridae* family to *Enterovirus* genus. Their genome is a positive sense, single strand RNA molecule (+ssRNA), of 7.500 nucleotides in length, surrounded by a viral icosahedral protein capsid. Their genome are consisted of a highly conserved 5' untranslated region, an open reading frame and a 3' untranslated region ending in a poly(A)-tract. Most infections with enteroviruses are asymptomatic; but in some instances Enteroviruses can cause different clinical symptoms ranging from aseptic meningitis to paralytic poliomyelitis.

The main causal agent for the diagnosis of an enteroviral infection is the occurrence of clinical symptoms. Hence, as previously described, most infections remain asymptomatic and enteroviruses can circulate "silently", increasing the risk of an outbreak. Preventing such outbreaks, the existence of a rapid and simple method for the detection of enteroviruses is of great importance.

In the present study, a rapid, simple, sensitive and specific isothermal reverse transcription assay (RT-Loop Mediated Amplification, RT-LAMP) was developed for the detection of enteroviruses that belong to species C (EV-Cs). This assay was designed based on Enterovirus C reference sequences and tested on reference and clinical enteroviral strains. The results of the RT-LAMP assay on reference and clinical enteroviral strains confirmed that this assay can properly serve as a diagnostic tool for the detection of enteroviruses that belong to Enteroviruses C species.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος των εντεροϊών. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από μία υψηλά συντηρημένη 5'αμετάφραστη περιοχή, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και μία 3'αμετάφραστη περιοχή που καταλήγει σε πολύ(A)-ουρά. Οι περισσότερες μολύνσεις με εντεροϊούς είναι ασυμπτωματικές, αλλά σε ένα ποσοστό οδηγούν στην εμφάνιση πιο σοβαρών ασθενειών όπως η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η παραλυτική πολιομυελίτιδα.

Κύριος αιτιολογικός παράγοντας για τη διάγνωση των εντεροϊών αποτελεί η εμφάνιση κλινικών συμπτωμάτων. Όπως προαναφέρθηκε όμως, οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Έτσι, μπορούν να κυκλοφορούν «σιωπηλά» μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να ελλοχεύει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις. Για αυτό, κρίνεται αναγκαία η ύπαρξη μίας γρήγορης και εύκολης μεθόδου ανίχνευσης των εντεροϊών, ώστε να προληφθούν τέτοια γεγονότα.

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μία γρήγορη, εύκολη, υψηλής ευαισθησίας και εξειδίκευσης ισοθερμική τεχνική αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-Loop mediated amplification, RT-LAMP) για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C (EV-Cs). Η τεχνική αυτή σχεδιάστηκε με βάση πρότυπες αλληλουχίες εντεροϊών της ομάδας C και εφαρμόστηκε τόσο σε πρότυπα όσο και σε κλινικά στελέχη. Τα αποτελέσματα από την εφαρμογή της μεθόδου τόσο σε πρότυπα στελέχη EV-C όσο και σε κλινικά δείγματα, καθιστούν αυτή την τεχνική κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των εντεροϊών που ανήκουν σε αυτή την ομάδα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Βιολογία των εντεροϊών.....	1
1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών.....	1
1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων	3
1.4 Οργάνωση και δομή του ιικού γονιδιώματος	5
1.5 Κύκλος ζωής εντεροϊών.....	7
1.6 Παθογένεια	14
1.7 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών.....	15
1.8 Επιδημιολογία.....	18
2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	20
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
3.1 Πρότυπα στελέχη	21
3.2 Κλινικά δείγματα.....	22
3.3 Καλλιέργεια ιών	23
3.4 Υπολογισμός του CCID ₅₀	23
3.5 Εκχύλιση RNA.....	24
3.6 Αντίστροφη μεταγραφή	25
3.7 Σχεδιασμός των εκκινητών	26
3.8 LAMP (Loop mediated isothermal amplification)	27
3.9 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP	28
3.10 PCR.....	29
3.11 RFLP	30
3.12 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR/LAMP	31
3.13 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR/LAMP.....	31
3.14 Αλληλούχιση των προϊόντων της LAMP.....	33

3.15	Real-time PCR	33
3.16	Real-time LAMP	34
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
4.1	Αποτελέσματα της LAMP στα πρότυπα στελέχη	36
4.2	Αποτελέσματα της LAMP στα κλινικά δείγματα	37
4.3	Έλεγχος της ευαισθησίας σε CCID ₅₀	37
4.4	Έλεγχος ευαισθησίας της LAMP σε αντίγραφα	38
4.5	Έλεγχος της εξειδίκευσης της μεθόδου	39
A.	Μέσω πέψης των προϊόντων της LAMP	39
B.	Μέσω εφαρμογής του πρωτοκόλλου της LAMP σε εντεροϊούς της ομάδας B.40	
4.6	Ταυτοποίηση κλινικών δειγμάτων μέσω RFLP	41
4.7	Αποτελέσματα αλληλούχισης	41
4.8	Αποτελέσματα Real-time LAMP	42
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	48

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιολογία των εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια *Picornaviridae* και στο γένος *Enterovirus*. Είναι ιοί που δε φέρουν έλυτρο και το γονιδίωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+) ssRNA, μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Η οικογένεια των ιών *Picornaviridae*, εκτός από τους εντεροϊούς, περιλαμβάνει και άλλους παθογόνους ιούς των ανθρώπων και των θηλαστικών όπως είναι οι πολιοϊοί, ο ιός της ηπατίτιδας Α, οι ρινοϊοί και ο FMDV (foot and mouth disease virus). Το όνομα αυτής της οικογένειας ιών, υποδηλώνει το μικρό τους μέγεθος (*rico*) και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος το οποίο απαρτίζει το ιικό τους γονιδίωμα (RNA) [1].

1.2 Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια *Picornaviridae* αποτελείται από 31 γένη, σύμφωνα με τη νέα εγκεκριμένη από τη Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee of Taxonomy of Viruses, ICTV), ταξινόμηση τον Απρίλιο του 2016 [2-3].

<i>Aphthovirus</i>	<i>Aquamanvirus</i>	<i>Avihepatovirus</i>	<i>Avisivirus</i>	<i>Cardiovirus</i>
<i>Cosavirus</i>	<i>Dicripivirus</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Erbovirus</i>	<i>Gallivirus</i>
<i>Hepatovirus</i>	<i>Hunnivirus</i>	<i>Kobuvirus</i>	<i>Kunsagivirus</i>	<i>Limnipivirus</i>
<i>Megrivirus</i>	<i>Mischivirus</i>	<i>Mosavirus</i>	<i>Oscivirus</i>	<i>Parechovirus</i>
<i>Pasivirus</i>	<i>Passerivirus</i>	<i>Potamipivirus</i>	<i>Rosavirus</i>	<i>Sakobuvirus</i>
<i>Salivirus</i>	<i>Sapelovirus</i>	<i>Senecavirus</i>	<i>Sicinivirus</i>	<i>Teschovirus</i>
		<i>Tremovirus</i>		

Πίνακας 1.2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των 31 γενών της οικογένειας *Picornaviridae*

Κάθε γένος αποτελείται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διαχωρίζονται με βάση τις ομοιότητες που εμφανίζουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ισωματίου, τη γενωμική αλληλουχία και την οργάνωση του γονιδιώματος[1].

Το γένος των εντεροϊών είναι το πιο σημαντικό όσον αφορά τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο. Αρχικά, αποτελούνταν από μέλη που

κατατάσσονται στις ακόλουθες τέσσερις κατηγορίες: Πολιοϊοί (PV, ορότυποι 1-3), ιοί Coxsackie A (CAV, ορότυποι 1-24), ιοί Coxsackie B (CBV, ορότυποι 1-6) και ιοί Echo (E, ορότυποι 1-33) [1]. Όμως με την εξέλιξη του ταξινομικού συστήματος οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη με πολλαπλούς οροτύπους ο καθένας.

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

Πίνακας 1.2.2: Νέα ταξινόμηση εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους

Κάθε ορότυπος συσχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ανθρώπου ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, τη χρήση των υποδοχέων και, σε μικρότερη κλίμακα, το φάσμα της κλινικής νόσου. Οι συσχετισμοί αυτοί με βάση τις ασθένειες, παρ' όλα αυτά, έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Coxsackie A ή B και ιούς Echo, η οποία έγινε βασισμένη στην βιολογική ενεργότητα και νόσο: ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ με χαλαρή παράλυση (πολιοϊοί) - χαλαρή παράλυση σε νεογνά ποντίκια, ανθρώπινη νόσος του ΚΝΣ και στοματικές φλύκταινες (ιοί Coxsackie A) - σπαστική παράλυση σε νεογνά ποντίκια και ανθρώπινη καρδιακή νόσος και νόσος του ΚΝΣ (ιοί Coxsackie B). Ανάμεσα στις ομάδες αυτές, οι ιοί μπορούν να

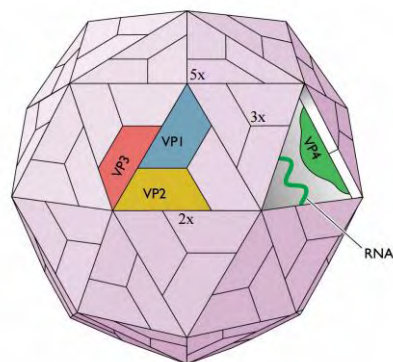
ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με την βοήθεια αντί-ορών [1].

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις, που προσδιορίζουν τον ορότυπο, έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς οροτύπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς, ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς [1]. Οι νέοι εντεροϊοί πλέον ταξινομούνται με χρονολογική σειρά δίνοντας τους έναν αύξοντα αριθμό (EV-X 68-121), όπου X το γράμμα της ομάδας στην οποία ανήκουν.

1.3 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

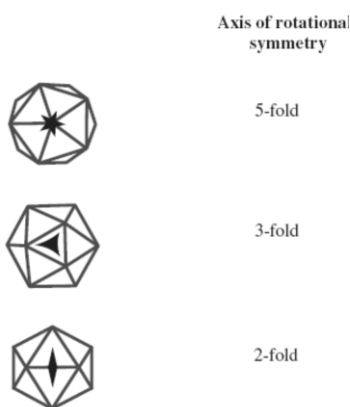
Τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Τα ιοσωμάτια είναι απλά καθώς αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα, το οποίο περιβάλλει το γυμνό RNA και δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο. Τα καψίδια των εντεροϊών σχηματίζονται από 60 αντίγραφα τεσσάρων πρωτεϊνών: VP1, VP2, VP3 και VP4. Σύμφωνα με μελέτες των Caspar και Klug πάνω στις

αρχές δόμησης των ιών [4-5], ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι να διαταχθούν οι πρωτεΐνες με εικοσαεδρική συμμετρία. Ένα εικοσαέδρο είναι ένα στερεό σώμα που αποτελείται από είκοσι τριγωνικές πλευρές και δώδεκα κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μίας τέτοιας δομής, είναι 60.



Εικόνα 1.3.1: Δομή ενός ιού Picorna
Πηγή: www.picornaviridae.com

Στο καψίδιο εντοπίζονται 3 άξονες συμμετρίας.

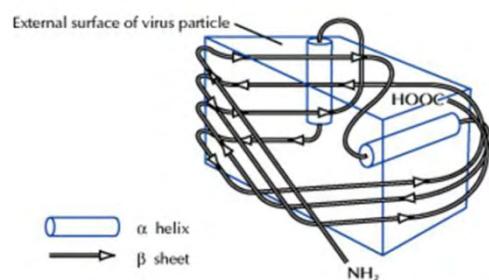


Εικόνα 1.3.2:
Οι 3 άξονες συμμετρίας σε ένα εικοσαεδρικό καψίδιο [6]

Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας, ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Τα αποτελέσματα μελετών περίθλασης ακτίνων X ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών στα ιοσωμάτια και τα προϊόντα διαχωρισμού τους, οδήγησαν στην υπόθεση ότι τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες διατεταγμένες σε εικοσαεδρική κατανομή [6]. Το 1985 αποτέλεσε σταθμό στην αντίληψη για τη δομή των ιών

ricorna, καθώς τότε καθορίστηκαν, μέσω κρυσταλλογραφίας ακτινών Χ, οι ατομικές δομές του πολιοϊού τύπου 1 [7].

Βασικό δομικό στοιχείο του καψιδίου των εντεροϊών είναι το πρωτομερές (P1), το οποίο περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η βασική μονάδα του εικοσαεδρικού καψιδίου είναι ένα πενταμερές το οποίο συνίσταται από πέντε αντίγραφα των VP1, VP3 και μιας πρόδρομης πρωτεΐνης VP0, στην οποία συνδέονται ομοιοπολικά οι VP2 και VP4.



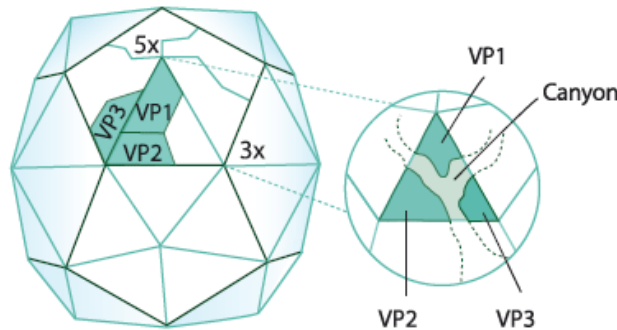
Εικόνα 1.3.3: Απεικόνιση του οκταπλού πλέγματος β'-βαρελίου [1]

Κατά τη συγκρότηση του καψιδίου, δώδεκα τέτοια πενταμερή ενώνονται ώστε να σχηματιστεί το προκαψίδιο. Κατά την καψιδίωση του RNA του ιού, πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης, κατά την οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δομικές πρωτεΐνες του ιού, με σκοπό τη σταθεροποίηση του ώριμου πλέον ιού. Τελικά, οι VP1, VP2 και VP3 σχηματίζουν το εξωτερικό στρώμα του καψιδίου, ενώ η VP4 βρίσκεται εξ'ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου [8]. Η VP1, VP2 και VP3 δεν έχουν καμία ομολογία όσον αφορά την αλληλουχία τους, ωστόσο και οι τρεις πρωτεΐνες έχουν την ίδια τοπολογία: σχηματίζουν ένα αντιπαράλληλο οκταπλό πλέγμα β'-βαρελίου. Το σχήμα αυτό διευκολύνει το πακετάρισμα των δομικών μονάδων για να σχηματίσουν ένα πυκνό και άκαμπτο πρωτεϊνικό περίβλημα.

Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA και N-AgIIIB [9]:

- Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 97, 99-101 της VP1
- Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-224 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.

- Η N-AgIII A αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60, 66, 70 και 73 της VP3 καθώς και 236 της VP2 και 286-290 της VP1.
- Η N-AgIII B από τα αμινοξέα 75-79 και 144 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.



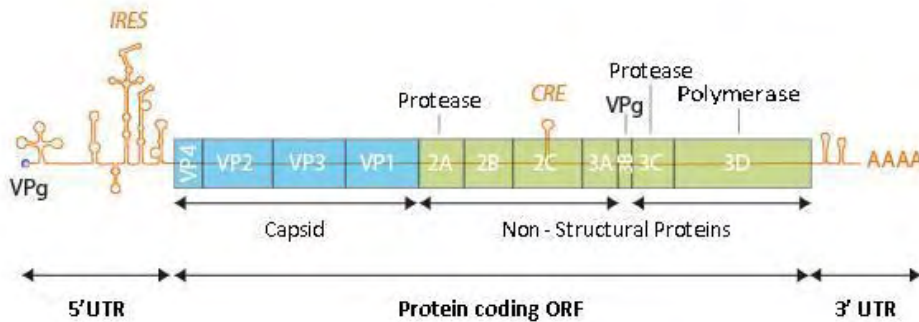
Εικόνα 1.3.4: Σχηματική αναπαράσταση της αύλακας (canyon) [70]

Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ [9]. Η εξωτερική επιφάνεια του ιού χαρακτηρίζεται τόσο από προεξοχές όσο και από αυλακώσεις. Σημαντικότερη είναι μια βαθιά αυλάκωση (canyon), η οποία διαμορφώνεται στη σύνδεση της VP1 με τη VP3 και εντοπίζεται περιμετρικά του άξονα πενταπλούς συμμετρίας, η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα.

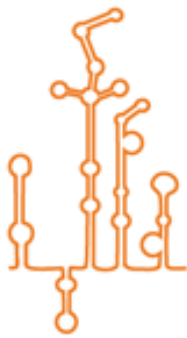
1.4 Οργάνωση και δομή του ιικού γονιδιώματος

Το γονιδίωμα των εντεροϊών είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Μετά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή, το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα με σκοπό να παραχθούν όλες οι ιικές πρωτεΐνες που απαιτούνται για την αναπαραγωγή του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιλαμβάνει τα επιμέρους τμήματα: την 5' μη κωδική περιοχή (5'UTR), ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), την 3' μη κωδική περιοχή (3'UTR) και την poly (A) ουρά, μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή. Το γενωμικό RNA των πολιοϊών είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο στο 5' άκρο με μια πρωτεΐνη που ονομάζεται VPg (Virion Protein, genome linked) [4,10]. Η VPg βρίσκεται στις νεοσυντιθέμενες RNA αλυσίδες του αντιγραφικού ενδιάμεσου RNA και στα αρνητικής πολικότητας RNAs, κάτι που

οδήγησε στην ανακάλυψη ότι η VPg είναι ένας εκκινητής για τη σύνθεση του RNA [11-12].



Εικόνα 1.4.1: Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών [70]



Εικόνα 1.4.2: Περιοχή IRES [70]

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας αποκάλυψε ότι οι 5' μη-κωδικές περιοχές των εντεροϊών είναι μακριές, περίπου 750 νουκλεοτίδια και υψηλά συντηρημένες. Η περιοχή αυτή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν την αντιγραφή και τη μετάφραση του γενώματος. Πιο συγκεκριμένα, περιέχει την εσωτερική ριβοσωμική θέση εισόδου (IRES-Internal Ribosome Entry Site) που κατευθύνει τη μετάφραση των mRNAs με εσωτερική σύνδεση στα ριβοσώματα [13].

Βιοχημικές μελέτες που έγιναν σε μολυσμένα κύτταρα από πολιοϊούς, προέβλεψαν την παρουσία ενός μοναδικού και μεγάλου ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (ORF) στο ικό RNA, το οποίο επεξεργάζεται στη συνέχεια για να σχηματίσει τις μεμονωμένες ικές πρωτεΐνες [14]. Η υπόθεση αυτή επαληθεύτηκε όταν καθορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γενώματος των πολιοϊών, κάτι που αποκάλυψε ότι το ικό RNA κωδικοποιεί για ένα μοναδικό ORF [15].

Η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών είναι μικρή, περίπου 72-100 νουκλεοτίδια και φέρει επίσης μια δευτεροταγή δομή, που εμπλέκεται στον έλεγχο

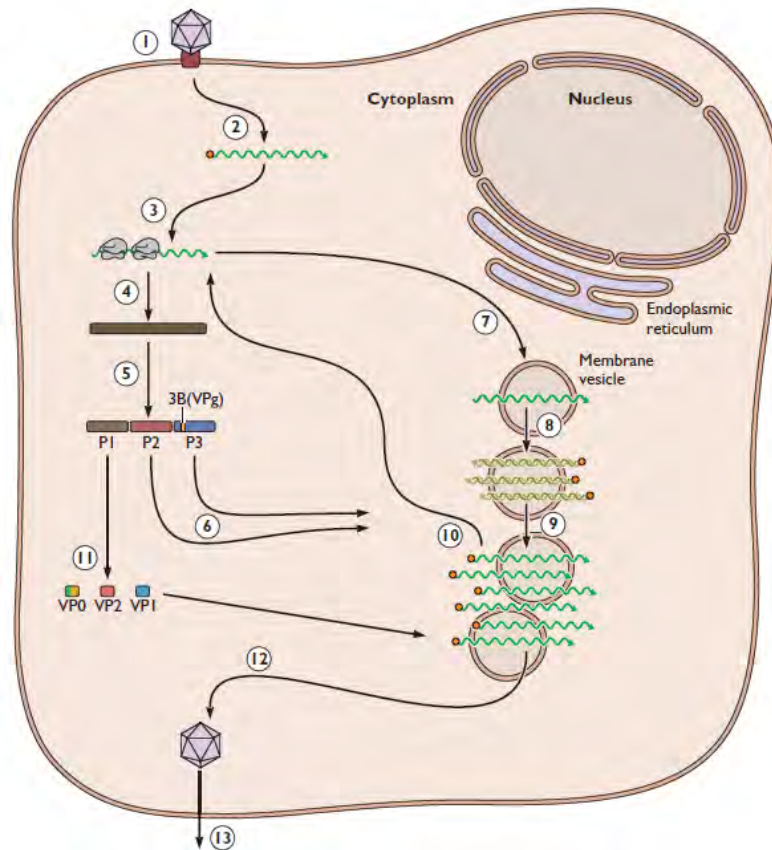
της σύνθεσης του ιικού RNA [16]. Η νουκλεοτιδική αυτή περιοχή αποτελεί το σημείο έναρξης για τη σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας και είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αντιγραφή του ιικού RNA [17]. Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' μη-κωδική περιοχή των εντεροϊών για τη μόλυνση των κυττάρων [18-19]. Τόσο το ιικό RNA όσο και το mRNA των εντεροϊών φέρουν μια πολύ(A) ουρά [20].

1.5 Κύκλος ζωής εντεροϊών

Οι εντεροϊοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα. Αρχικά, πραγματοποιείται η σύνδεση με τον κυτταρικό υποδοχέα και στη συνέχεια επιτελείται η είσοδος στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύτωσης. Ακολουθεί η διαδικασία της απέκδυσης, κατά την οποία το ιικό RNA απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα έπειτα από δομικές αλλαγές στο καψίδιο του ιού. Το γονιδίωμα των εντεροϊών λειτουργεί απευθείας ως mRNA, το οποίο μεταφράζεται αμέσως μετά τη μόλυνση του κυττάρου ξενιστή. Το αποτέλεσμα της μετάφρασης είναι μία πολυπρωτεΐνη, η οποία τεμαχίζεται και προκύπτουν τόσο οι δομικές, όσο και οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. Μία από τις λειτουργικές πρωτεΐνες που παράγονται είναι η ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, η οποία καταλύει την αντιγραφή. Η αντιγραφή του ιού γίνεται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ιικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιικό RNA. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Ένα μέρος των (+) RNA κλώνων θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA και ένα μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιικών σωματιδίων. Αφού λοιπόν γίνει η σύνθεση του καψιδίου από τις δομικές πρωτεΐνες, ακολουθεί η καψιδίωση του ιού και η έξοδος του από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου [1].

Ο χρόνος που απαιτείται για έναν πλήρη κύκλο ενός εντεροϊού, ποικίλλει από 5 έως 10 ώρες και εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, το pH, το κύτταρο ξενιστής και η πολυπλοκότητα της μόλυνσης [13].

Τα στάδια του κύκλου ζωής που περιγράφηκαν πιο πάνω αναλύονται στη συνέχεια:



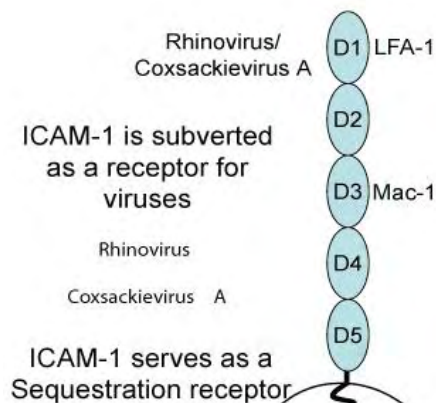
Εικόνα 1.5.1: Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου ζωής των ιών Picorna [1]

A. Προσκόλληση στον κυτταρικό υποδοχέα και είσοδος του ιού στο κύτταρο

Οι εντεροϊοί ξεκινούν τη μόλυνση των κυττάρων με τη σύνδεσή τους σε έναν υποδοχέα της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή. Οι εντεροϊοί χρησιμοποιούν μια μεγάλη ποικιλία από μόρια ως υποδοχείς, όπως πρωτεΐνες, υδρογονάνθρακες και γλυκολιπίδια. Η φύση των υποδοχέων αυτών παρέμενε άγνωστη μέχρι το 1989 που ταυτοποιήθηκε ο υποδοχέας των πολιοϊών (PVR) [21]. Στους περισσότερους εντεροϊούς, οι υποδοχείς συνδέονται με τα συντηρημένα αμινοξέα των πρωτεϊνών VP1 και VP3, στη σχηματιζόμενη αύλακα (canyon) και προκαλούν την αναδιάταξη του ιικού καψιδίου [22].

Η εξειδίκευση και έκφραση του υποδοχέα καθορίζει, εν μέρει, την παθογόνο δυναμική δράση ενός ιού, καθώς και τη φύση της ασθένειας που προκαλεί. Συγκεκριμένα για τους ευρέως μελετημένους πολιοϊούς, ο κυτταρικός υποδοχέας είναι ο CD155 ή PVR (poliovirus receptor). Η κλωνοποίηση του γονιδίου του υποδοχέα των πολιοϊών αποκάλυψε ότι ο υποδοχέας είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη και μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, με τρεις εξωκυτταρικές Ig-like περιοχές: μια ακραία μεμβρανική τύπου-V περιοχή ακολουθούμενη από δύο τύπου C2 περιοχές. Αποτελέσματα τριών διαφορετικών πειραμάτων έδειξαν ότι η πρώτη Ig-like περιοχή είναι η περιοχή που φέρει τη θέση σύνδεσης των πολιοϊών [23-24].

Ορισμένα μέλη των εντεροϊών της ομάδας C, όπως για παράδειγμα οι ιοί Coxsackie A (CAV 13,17,20,21,24), χρησιμοποιούν τον υποδοχέα ICAM-1 ή αλλιώς CD54 για την είσοδό τους στο κύτταρο ξενιστή [24]. Πρόκειται για μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη, μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών, που βρίσκεται στην επιφάνεια ενδοθηλιακών κυττάρων και στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος.



Εικόνα 1.5.2: Απεικόνιση του υποδοχέα ICAM-1 των εντεροϊών της ομάδας C [71]

Η αλληλεπίδραση του εντεροϊού με τον υποδοχέα του, οδηγεί σε σημαντικές δομικές αλλαγές στον ιό. Τα σωματίδια που προκύπτουν, τα οποία καλούνται altered ή A σωματίδια, περιέχουν το ιικό RNA αλλά έχουν χάσει την εσωτερική καψιδιακή πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, η N-τελική περιοχή της VP1, η οποία φυσιολογικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, βρίσκεται στην επιφάνεια των σωματιδίων A [25].

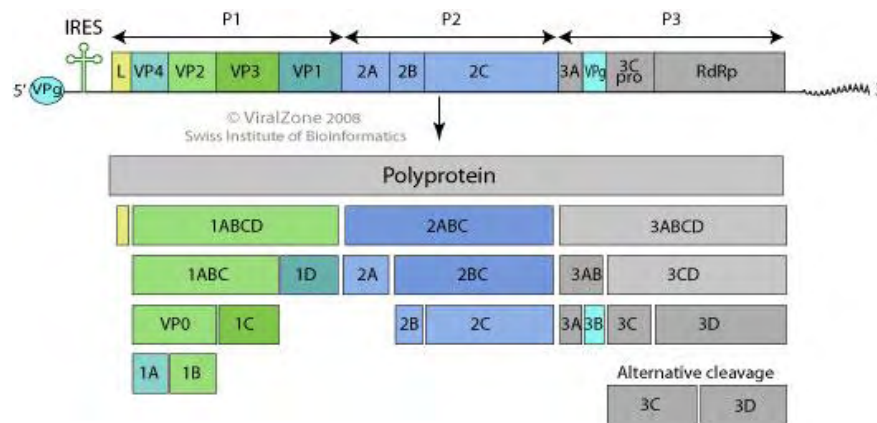
Η αλληλουχία αυτή της VP1 είναι υδροφοβική και τα σωματίδια A έχουν μια αυξημένη συγγένεια προς τις μεμβράνες σε σχέση με τα ιοσωμάτια. Το λιπόφιλο N-άκρο της VP1 εισέρχεται στη συνέχεια στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο μέσω του οποίου το ιικό RNA μπορεί να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα.

Το RNA δεν είναι γνωστό εάν εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα από την κυτταρική μεμβράνη ή από την μεμβράνη των ενδοσωμάτων (ενδοκύτωση). Είναι όμως σίγουρο ότι η ενδοκύτωση από μόνη της δεν μπορεί να οδηγήσει στην απέκδυση του ιού, καθώς οι αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση είναι αυτές που οδηγούν στην απέκδυσή του [13].

B. Μετάφραση του ιικού RNA και επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης

Κατά την είσοδό του στο κυτταρόπλασμα το θετικής πολικότητας RNA πρέπει να μεταφραστεί καθώς δεν μπορεί να αντιγραφεί από κάποια κυτταρική RNA πολυμεράση και δεν έχει εισέλθει στο κύτταρο κανένα ιικό ένζυμο του καψιδίου. Το θετικής πολικότητας RNA δεν φέρει δομές 5'-καλύπτρας, είναι όμως συνδεδεμένο με την VPg πρωτεΐνη, η οποία αφαιρείται κατά την είσοδο του RNA στο κύτταρο [26]. Νουκλεοτιδική αλληλούχηση του θετικού κλώνου του πολιοϊού, ο οποίος αποτελεί και το καλύτερα μελετημένο μοντέλο των εντεροϊών, αποκάλυψε μια αμετάφραστη περιοχή 741 νουκλεοτιδίων στο 5' άκρο, που περιέχει επτά AUG κωδικόνια [15,24]. Έτσι διαπιστώθηκε ότι τα ριβοσώματα δεν ανιχνεύουν τις 5'-αμετάφραστες περιοχές, αλλά δεσμεύονται σε μια εσωτερική αλληλουχία. Η αλληλουχία αυτή που προάγει τη σύνδεση με την 40S ριβοσωμική υπομονάδα ονομάστηκε εσωτερική θέση εισόδου του ριβοσώματος IRES (Internal Ribosome Entry Site).

Οι πρωτεΐνες των πολιοϊών συντίθενται από τη μετάφραση ενός μοναδικού, μεγάλου ORF που κωδικοποιείται από το θετικής πολικότητας ιικό RNA γένωμα και ακολουθεί τεμαχισμός της πολυπρωτεΐνης από πρωτεϊνάσες που κωδικοποιούνται από τον ιό. Η στρατηγική αυτή επιτρέπει τη σύνθεση πολλαπλών πρωτεϊνικών προϊόντων από ένα μοναδικό RNA. Η πολυπρωτεΐνη δεν είναι εμφανής στα μολυσμένα κύτταρα καθώς επεξεργάζεται κατά τη σύνθεσή της. Η πρόδρομη πολυπρωτεΐνη επεξεργάζεται συμμεταφραστικά από ενδομοριακές αντιδράσεις (in cis) που ονομάζονται αρχικοί τεμαχισμοί, ακολουθούμενοι από δευτερεύουσες επεξεργασίες in cis ή in trans (διαμοριακές). Το γένωμα των εντεροϊών κωδικοποιεί για δυο πρωτεϊνάσες: την 2Apro και την 3Cpro ή 3CDpro [13].



Εικόνα 1.5.3: Πρωτεόλυση της πολυπρωτεΐνης [*viral zone - picornaviridae*]

Τόσο η 3Cpro όσο και η 2Apro είναι ενεργές στο πολυπεπτιδίο κατά τη σύνθεσή του και απελευθερώνονται από αυτό με αυτό-τεμαχισμό. Μόλις ελευθερωθούν οι πρωτεΐνάσες, τεμαχίζουν την πολυπρωτεΐνη *in trans*. Σε κύτταρα μολυσμένα με εντεροϊούς, το αρχικό γεγονός αποτελεί η απελευθέρωση του P1 πρόδρομου από την συντιθέμενη P2-P3 μέσω της 2Apro. Στη συνέχεια η 3CDpro απελευθερώνεται από το P3 πρόδρομο με αυτοκαταλυτικό τεμαχισμό. Αυτή η πρωτεΐνάση, που περιέχει ολόκληρη την αλληλουχία της ικής RNA πολυμεράσης, πραγματοποιεί δευτερεύοντες τεμαχισμούς στα διπεπτίδια γλουταμινικού-γλυκίνης στον πολιοϊό τύπου 1 πιο αποτελεσματικά σε σχέση με την 3Cpro. Τόσο η 3Cpro όσο και η 3CDpro επεξεργάζονται τις πρωτεΐνες των P2 και P3 περιοχών με παρόμοια δραστηριότητα. Σε μία αλληλουχία γεγονότων διάσπασης *in-trans* από την 3CDpro, οι μη-δομικές πρωτεΐνες 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A, 3B (VPg), 3Cpro, 3Dpro και οι πρωτεΐνες του καψιδίου VP0, VP1 και VP3 απελευθερώνονται από τις πρόδρομες μορφές τους. Η 3Dpro αλληλουχία μέσα στην 3CDpro απαιτείται για την αναγνώριση δομικών μοτίβων στην κατάλληλα διαμορφωμένη P1, επιτρέποντας δραστική επεξεργασία από το 3Cpro μέρος του ενζύμου. Στο τελευταίο στάδιο της πρωτεόλυσης, που συμβαίνει κατά την συναρμολόγηση των ικών σωματιδίων, η VP0 τεμαχίζεται, πιθανόν μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού, ώστε να παράγει τις VP4 και VP2. Ένα πλεονέκτημα της στρατηγικής αυτής είναι ότι η έκφραση μπορεί να ελεγχθεί από το ρυθμό και την έκταση την πρωτεολυτικής διαδικασίας. Εναλλακτική χρήση των θέσεων πρωτεόλυσης μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή πρωτεϊνών με διαφορετικές δραστηριότητες [13].

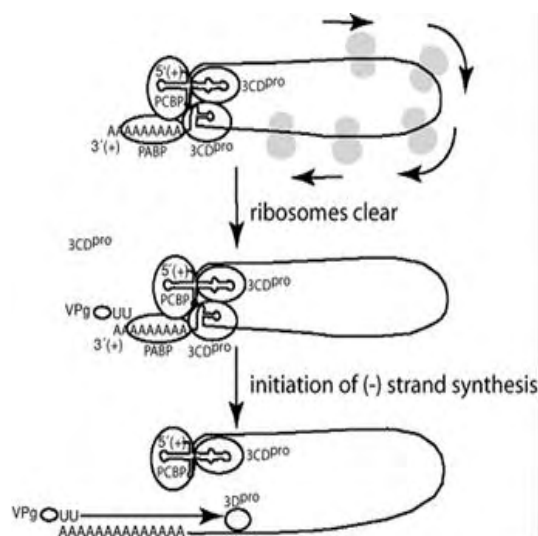
Γ. Αντιγραφή του ιικού γενώματος

Η αντιγραφή του ιού ξεκινάει κατά την είσοδό του στο κύτταρο ξενιστή και πραγματοποιείται σε σύμπλοκα, τα οποία αποτελούνται από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ικό RNA. Πιο συγκεκριμένα, τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται από ικές πρωτεΐνες, όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}, η 2C^{ATPase}, η 3A, η 3B, οι πρόδρομες πρωτεΐνες 2BC και 3AB καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η PCBP2. Μέρος του συμπλόκου αυτού αποτελεί και το ικό RNA, που περιέχει cis-acting όπως η δομή “cloverleaf” που βρίσκεται στην 5'-UTR και η δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Αυτά τα αντιγραφικά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο [27-30]. Οι ικές πρωτεΐνες 2C και 3AB, φέρουν το σύμπλοκο της αντιγραφής στα μεμβρανικά κυστίδια. Η 3AB είναι μια υδρόφοβη πρωτεΐνη που αγκυροβολεί τον πρωτεϊνικό εκκινητή VPg στην μεμβράνη για τη σύνθεση του RNA. Η 3AB δεσμεύει την 3D^{pol} και την 3CD^{pro}, στρατολογώντας έτσι το σύμπλοκο της αντιγραφής στις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη 2C φέρει μια RNA-δεσμευτική περιοχή, η οποία επίσης θα μπορούσε να αγκυροβολήσει το ικό RNA στις μεμβράνες και στο σύμπλοκο της αντιγραφής [31].

Για να μπορέσει να αντιγραφεί ο ιός, πρέπει αρχικά το γονιδίωμα του να μετατραπεί σε μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο θα αποτελέσει μήτρα για τη σύνθεση πολλών κλώνων RNA θετικής πολικότητας [32]. Ένα μοντέλο αντιγραφής του RNA θα μπορούσε να είναι το εξής: ικό RNA(+) → σύνθεση RNA(-) → RF → σύνθεση RNA(+) → RI → RNA(+), όπου RF (replicative form) δίκλωνο RNA πλήρους μήκους και RI (replicative intermediate) κλώνος RNA(-) μερικά υβριδισμένος σε πολλαπλούς αναπτυσσόμενους κλώνους RNA(+). Η σύνθεση του ιικού RNA είναι ασύμμετρη καθώς, η σύνθεση των θετικών κλώνων είναι 30 με 50 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με την σύνθεση των αρνητικών [33].

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

ένζυμο που εξαρτάται από εκκινήτη. Σε πειράματα *in vitro* η 3Dpol δεν αντιγράφει το RNA των ιών χωρίς έναν ολίγο(U) εκκινήτη. Τον ρόλο του εκκινήτη στους πολιοϊούς έχει η πρωτεΐνη VPg, η οποία είναι συνδεδεμένη στο ιικό RNA, αλλά επίσης και στο 5'-άκρο τον νεοσυντιθέμενων θετικών και αρνητικών κλώνων. Η VPg αρχικά ουριδιλιώνεται και στη συνέχεια επεκτείνεται έτσι ώστε να σχηματίσει πολύ(U). Το εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg είναι μια δομή φουρκέτας του RNA, το cre (cis-acting replication element), που βρίσκεται στην κωδική περιοχή των εντεροϊών [34-36].



Εικόνα 1.5.4: Μοντέλο αλλαγής μεταξύ μετάφρασης και σύνθεσης του (-)RNA κλώνου [1]

Επομένως, συνειδητοποιούμε πως το γενωμικό RNA των ιών δεν λειτουργεί μόνο ως mRNA, αλλά και ως μήτρα για τη σύνθεση του κλώνου RNA αρνητικής πολικότητας. Πιστεύεται ότι υπάρχει ένας μηχανισμός που αποτρέπει την ταυτόχρονη διεξαγωγή της μετάφρασης του mRNA και της σύνθεσης των αρνητικών κλώνων RNA. Προτάθηκε έτσι ένας μηχανισμός, όπου η δομή cloverleaf (τριφυλλιού) στο 5' άκρο της μη κωδικής περιοχής του (+)RNA ρυθμίζει πότε το RNA αντιγράφεται και πότε

μεταφράζεται [37]. Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, στα αρχικά στάδια της μόλυνσης, η σύνδεση της πολύ-γ(C)-δεσμευτικής πρωτεΐνης (PCBP) στην δομή αυτή, επάγει τη μετάφραση. Όταν η 3CDpro συντεθεί, δεσμεύεται στη δομή cloverleaf, καταστέλλει τη μετάφραση και επάγει τη σύνθεση του RNA. Ωστόσο, από πειραματικά στοιχεία, προκύπτει ότι ορισμένες φορές οι δυο αυτές διαδικασίες συμβαίνουν ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα τη σύγκρουση της RNA πολυμεράσης με το ριβόσωμα.

Δ. Καψιδίωση και απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιοσωματίων

Κατά τη σύνθεση της P1 πρωτεΐνης, η οποία είναι η πρόδρομη καψιδιακή πρωτεΐνη, σχηματίζονται οι κεντρικές περιοχές β-βαρελίου και οι διαμοριακές

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των περιοχών αυτών οδηγούν στο σχηματισμό των δομικών μονάδων. Μόλις η P1 ελευθερωθεί από τη 2A πρωτεΐνη, οι δεσμοί VP0-VP3 και VP3-VP1 πέπτονται από την πρωτεΐνάση 3CDpro. Οι θέσεις κοπής βρίσκονται σε ευέλικτες περιοχές μεταξύ των β-βαρελιών. Στο ώριμο καψίδιο, το καρβοξυτελικό άκρο των VP1, VP2 και VP3 βρίσκεται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ το αμινοτελικό άκρο στο εσωτερικό, όπου συμμετέχουν σε ένα εκτεταμένο δίκτυο αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτομερών. Μέσω αυτής της επεξεργασίας παράγεται το πρώτο συγκροτημένο ενδιάμεσο, το 5S πρωτομερές, την ανώριμη δομική μονάδα που αποτελείται από ένα αντίγραφο της VP0, VP3 και VP1. Στη συνέχεια, πέντε πρωτομερή συγκροτούνται για το σχηματισμό ενός πενταμερούς. Το τελευταίο μορφογενετικό βήμα περιλαμβάνει την πέψη των περισσότερων VP0 μορίων σε VP4 και VP2. Η πρωτεΐνάση η οποία πραγματοποιεί τον τελευταίο αυτό τεμαχισμό ωρίμανσης δεν έχει ταυτοποιηθεί. Ο δεσμός της VP0 που πέπτεται, βρίσκεται στο εσωτερικό των καψιδίων και στα ώριμα ιικά σωματίδια και δεν είναι προσιτός από ικές και κυτταρικές πρωτεΐνάσες [11,33].

Η καψιδίωση των ιών ricorna είναι εξαιρετικά ειδική και οδηγεί στο πακετάρισμα μόνο των θετικών κλώνων RNA και όχι του ιικού mRNA, του αρνητικού κλώνου RNA ή οποιουδήποτε κυτταρικού RNA [11,33]. Η VPg δεν αποτελεί σήμα καψιδίωσης, καθώς ο αρνητικός κλώνος RNA που περιέχει την VPg δεν πακετάρεται. Η σύνδεση της καψιδίωσης με τη σύνθεση του ιικού RNA μπορεί να εξηγήσει την εκλεκτικότητα του πακεταρίσματος με τον ιικό θετικό κλώνο RNA.

Όσον αφορά την απελευθέρωση των νεοσυντιθέμενων ιικών σωματιδίων, είναι ευρέως αποδεκτό ότι οι εντεροϊοί εξέρχονται από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης [38].

1.6 Παθογένεια

Η μόλυνση με εντεροϊούς ξεκινά από το πεπτικό σύστημα και η είσοδος του εντεροϊού γίνεται κυρίως από το στόμα. Αρχικά η μόλυνση συμβαίνει στις βλεννώδεις επιφάνειες του φάρυγγα και του εντέρου και ακολουθεί μόλυνση των τοπικών λεμφαδένων και πολλαπλασιασμός του ιού. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα η

είσοδος του ιού στην κυκλοφορία του αίματος (ιαιμία), όπου ο πολλαπλασιασμός του ιού γίνεται εντονότερος και τελικά πραγματοποιείται η μεταφορά στο όργανο-στόχο. Ο χρόνος από την είσοδο του ιού στο σώμα έως την έναρξη της αντίστοιχης ασθένειας, είναι συνήθως 7 – 14 ημέρες, αλλά μπορεί να κυμαίνεται από 2 – 35 ημέρες, σε ακραίες περιπτώσεις. Μετά τη μόλυνση με εντεροϊό, ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1 – 2 εβδομάδες. Εντεροϊοί έχουν απομονωθεί εκτός από κόπρανα και φαρυγγικά επιχρίσματα και από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, την καρδιά, τον επιπεφυκότα και από πληγές του δέρματος ή από βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών [39].

Οι κλινικές εκδηλώσεις των εντεροϊών ποικίλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις μέχρι την εκδήλωση μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας αλλά και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπεται από μόλυνση με εντεροϊούς σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς [39].

1.7 Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών

Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί που οφείλονται για τη μεγάλη ποικιλομορφία και εξέλιξη των εντεροϊών: Α. Οι μεταλλάξεις Β. Ο ανασυνδυασμός [41].

A. Μεταλλάξεις

Η μοριακή βάση του υψηλού ρυθμού συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά την αντιγραφή του ιικού RNA βρίσκεται i) στην επιρρεπή σε λάθη RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία υπολογίζεται ότι έχει συχνότητα λάθους ένα στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και ii) στην απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών. Ο υψηλός ρυθμός συσσώρευσης μεταλλάξεων αποτελεί χαρακτηριστικό όλων των RNA λυτικών ιών [42].

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη) αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η

μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες [43].

Ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των εντεροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του. Οι πιο ευμετάβλητες περιοχές του ιικού γενώματος είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Άμεσο αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Ωστόσο, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών, όπως ότι η δομή του καψιδίου πρέπει να διατηρείται σταθερή, καθώς και οι περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα ή την αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα. Μελέτες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελεί μία συμβίωση γονιδίων όπου το καθένα από αυτά εξελίσσεται ανεξάρτητα από τα άλλα, δηλαδή φαίνεται ότι οι καψιδιακές πρωτεΐνες, οι μη δομικές πρωτεΐνες και οι μη κωδικές περιοχές εξελίσσονται ανεξάρτητα [44].

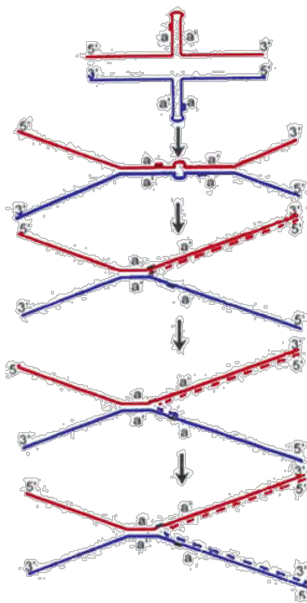
B. Ανασυνδυασμός

Ο γενετικός ανασυνδυασμός των RNA ιών αρχικά περιγράφηκε για τους πολιοϊούς από τον Hirst το 1962. Ο ανασυνδυασμός αποτελεί έναν πιο ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης σε σχέση με τις μεταλλάξεις, καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός [45].

Ο ανασυνδυασμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών. Ευνοεί την εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή οδηγώντας στην διατήρηση ενός γενοτύπου αγρίου τύπου. Επίσης, συμβάλλει στην δημιουργία ικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση όπως π.χ. η βελτιωμένη ικανότητά τους να αντιγράφονται στον γαστρεντερικό σωλήνα σε σχέση με τα πατρικά στελέχη. Τέλος, επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών

στελεχών του ίδιου (homotypic) ή και διαφορετικών οροτύπων (heterotypic) [46,47].

Ο βασικός μηχανισμός για να συμβεί ανασυνδυασμός είναι ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Σύμφωνα με αυτόν το μηχανισμό, κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικού κλώνου από την RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, το ένζυμο μπορεί να συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως μία δευτεροταγή δομή φουρκέτας [48] ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο [49] και να σταματήσει τη σύνθεση του (-) RNA.



Εικόνα 1.7.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας

Έτσι, η ιική 3D πολυμεράση αποδεσμεύεται μαζί με το νεοσυντιθέμενο κλώνο και μεταπηδά σε έναν άλλον RNA κλώνο θετικής πολικότητας, τον οποίο θα χρησιμοποιήσει πλέον σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Ως αποτέλεσμα είναι η δημιουργία χιμαιρικών μορίων. Όταν η μετάβαση από το ένα εκμαγείο στο άλλο είναι ακριβής, ο ανασυνδυασμός είναι ομόλογος [50], αντίθετα μη ακριβής μετάβαση οδηγεί σε μη-ομόλογο ανασυνδυασμό όπως π.χ. σε ελλείψεις και διπλασιασμούς.

Ο ανασυνδυασμός συμβαίνει κατά την σύνθεση των (-) RNA κλώνων για δύο κυρίως λόγους. Η συχνότητα του ανασυνδυασμού εξαρτάται σημαντικά από την διαθεσιμότητα των RNA μορίων που δρουν ως δέκτες και οι (+) RNA κλώνοι σε σύγκριση με τους (-) RNA κλώνους είναι πολύ περισσότεροι στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων. Επίσης οι (-)RNA κλώνοι βρίσκονται μέσα στο κύτταρο σε δίκλωνη μορφή (replicative intermediate) και σε αυτή τη μορφή δεν είναι διαθέσιμοι για να δράσουν ως εκμαγεία.

Εκτός από τον αντιγραφικό μηχανισμό, ανασυνδυασμός μπορεί να συμβεί και μέσω του μηχανισμού ρήξης και επανένωσης. Ο μηχανισμός αυτός σε αντίθεση με τον προηγούμενο είναι μη αντιγραφικός και προϋποθέτει τη διάσπαση δύο

ανασυνδυαζόμενων RNA μορίων σε κάποια σημεία και την ένωση του 5' άκρου του ενός με το 3' άκρο του άλλου μορίου [51]. Όμως, αυτός ο μηχανισμός είναι πολύ πιο σπάνιος σε σχέση με τον μηχανισμό αλλαγής μήτρας που περιγράφηκε προηγουμένως.

1.8 Επιδημιολογία

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

Μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν βοηθήσει στην κατανόηση των εντεροϊών καθώς:

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

Για τους εντεροϊούς, η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την άμεση ανάλυση της γενετικής παραλλαγής είναι η αλληλούχιση. Η μέθοδος αυτή μπορεί να προσδιορίσει ομοιότητες και μικρές διαφορές μεταξύ αρκετών στελεχών ιών. Η εισαγωγή της τεχνικής αυτής και η εφαρμογή της στη μελέτη των απομονώσεων άγριων εντεροϊών από διαφορετικά μέρη του κόσμου έχει επεκτείνει σημαντικά την επιδημιολογική δύναμη μοριακών μελετών [52].

Η τεχνολογία της αλληλούχισης έχει εφαρμοστεί πιο διεξοδικά σε μελέτες PVs, όπου η πληροφορία έχει αποδειχθεί πολύτιμη, για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών [53,54]. Από τις μελέτες αυτές, είναι δυνατόν να προσδιοριστεί (α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, (β) ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία και (γ) διαφορές μεταξύ των προϊόντων απομόνωσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις αλλαγές που παρατηρούνται μεταξύ των διαφόρων στελεχών του ιού, μπορεί να προσδιοριστεί η γεωγραφική και χρονική προέλευση του [55-57].

Μελέτες σχετικά με τη μοριακή επιδημιολογία των μη-πόλιο εντεροϊών, έχουν επικεντρωθεί στο εξελικτικό συμπέρασμα που προέρχεται από τη σύγκριση των απομονώσεων του ιού μέσα σε ένα ορότυπο, καθώς και τη σύγκριση των απομονώσεων από διαφορετικούς οροτύπους και ακόμη και μεταξύ διαφορετικών γενών εντός της οικογένειας Picornaviridae.

Οι non-polio εντεροϊοί, όπως για παράδειγμα οι Coxsackie A και B ιοί, αποτελούν το κορυφαίο αναγνωρίσιμο αίτιο της άσηπτης μηνιγγίτιδας, η οποία είναι η πιο συχνή ασθένεια που σχετίζεται με λοιμώξεις εντεροϊών. Σε εύκρατα κλίματα, αυτές οι λοιμώξεις εμφανίζονται κατά τη διάρκεια των μηνών του καλοκαιριού και του φθινοπώρου. Τα μικρά παιδιά είναι τα πιο κοινά θύματα, επειδή ο αριθμός των μολύνσεων με εντεροϊούς είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ηλικία των ευπαθών ατόμων. Τα νεογνά είναι σε κίνδυνο για σοβαρή συστηματική νόσο όπως ηπατική νέκρωση, μυοκαρδίτιδα, και νεκρωτική εντεροκολίτιδα, εκ των οποίων μηνιγγίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα, είναι συνήθως ένα μέρος.

2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν ο σχεδιασμός ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μίας γρήγορης, εύκολης και υψηλής ευαισθησίας ισοθερμικής τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής Reverse Transcription-Loop mediated amplification (RT-LAMP) για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρότυπα στελέχη

Για το σχεδιασμό, τη βελτιστοποίηση και τον έλεγχο της εξειδίκευσης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin1,2 και 3 καθώς και άλλα πρότυπα στελέχη εντεροϊών τόσο της ομάδας C, όσο και της ομάδας B.

Δείγμα	Στέλεχος	Αριθμός πρόσβασης
PV-1	Sabin (LSc, 2ab)	V01150
PV-2	Sabin (P712, Ch, 2ab)	X00595
PV-3	Sabin (Leon 12a-1-b)	K00043
CAV 1	T.T.(Tompkins) (Coxsackie, NY/47)	AF499635
CAV 11	Belgium 1 (Belgium/51)	AF499636
CAV 13	Flores (Mexico/52)	AF499637
CAV 15	G-9 (South Africa/50)	AF499638
CAV 17	G-12 (South Africa/51)	AF499639
CAV 20	IH-35 (New York/55)	AF499642
CAV 21	Kuykendall (California/52)	AF546702
CAV 24	Joseph	D90457
CBV 3	Nancy/Connecticut/US/49	M33854
CBV 4	JVB/New York/US/51 (Benschoten)	X05690
CBV 6	Schmitt/Philippines/53 (1-15-21)	AF105342
E1	Farouk/Egypt/51	AF029859
E7	Wallace (Ohio)	AY036579
E9	Hill/Ohio/US/53	X84981
E11	Gregory (Ohio)	X80059
E12	Travis (Philippines/53)	X79047
E18	Metcalfe (Ohio)	AF317694
E19	Burke (Ohio)	AY302544
E33	Toluca-3 (Mexico/59)	AY302556

Πίνακας 3.1.1 : Συγκεντρωτικός πίνακας πρότυπων στελεχών, όπου αναφέρεται ο ορότυπος, το στέλεχος και ο αριθμός καταχώρησης του κάθε ιού.

Βάσει του σχεδιασμού του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για την παγκόσμια εξάλειψη των πολιοϊών, το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 2 έπρεπε να καταστραφεί σε εργαστήρια που δεν πληρούν τις προϋποθέσεις εργαστηρίου βιοασφάλειας 3, μέχρι το τέλος του Μαΐου του 2016. Οι μέθοδοι που περιλαμβάνουν αυτό το δείγμα και περιγράφονται στη συνέχεια, είχαν πραγματοποιηθεί πριν από την καταστροφή του πρότυπου SABIN 2 στελέχους.

3.2 Κλινικά δείγματα

Για την επαλήθευση του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω 10 κλινικά ανασυνδυασμένα εμβολιοπροερχόμενα δείγματα:

Δείγμα	Προέλευση	Γενωμική Περιοχή, τύπος και θέση ανασυνδυασμού	Αριθμός πρόσβασης GENBANK
IK	Ουδετεροπενία	VP1, S3/S2, 3275-3285	EF456707
742	Περιβάλλον	2A, S1/S3/S2, 3461-3465	EU598488
415	VAPP	2C, S3/S1, 4880-4887	AY736181
LK3	Περιβάλλον	2C, S3/S2/S1, 4942-4958	DQ150697
I34	VAPP	2C, S2/S1/S2/S1, 4984-4994	AY830710
EP9 (580)	Υγιής – OPV	3A, S2/S1, 5314-5318	AY736178
ID	VAPP	3C, S2/S1, 5521-5526	EU715814
738	Περιβάλλον	3C, S3/S2/S1, 5804-5814	EU598487
IF	Υγιής – OPV	3D, S2/S1, 6247-6281	AY297760
EP12 (730)	Υγιής – OPV	3D, S2/S1, 6337-6362	AY736179
584	Περιβάλλον	3D, S3/S2/S1, 7150-7172	EU598486

Πίνακας 3.2.1 : Τα κλινικά δείγματα και τα χαρακτηριστικά τους ως προς τον τύπο, τη θέση και τη γενωμική περιοχή του ανασυνδυασμού.

Βάσει του σχεδιασμού του Παγκόσμιου οργανισμού υγείας για την παγκόσμια εξάλειψη των πολιοϊών, τα δείγματα αυτά, όπως και όλα τα εμβολιοπροερχόμενα στελέχη πολιομυελίτιδας (Vaccine-derived poliovirus, VDPV), έπρεπε να καταστραφούν σε εργαστήρια που δεν πληρούν τις προϋποθέσεις εργαστηρίου βιοασφάλειας 3, πριν το τέλος του έτους 2015. Στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας τα δείγματα καταστράφηκαν στις 17 Δεκεμβρίου 2015 και όλες οι μέθοδοι που περιλαμβάνουν αυτά τα δείγματα και περιγράφονται στη συνέχεια, είχαν πραγματοποιηθεί πριν από αυτήν την ημερομηνία.

3.3 Καλλιέργεια ιών

Αρχικά, 100μl από κάθε πρότυπο στέλεχος ενοφθαλμίστηκαν σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα Rd ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 2% ορό. Οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Rd μη μολυσμένα ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 2% ορό). Στη συνέχεια, ακολούθησαν αρκετές επανακαλλιιεργειες του κάθε ιού με σκοπό την αύξηση του ιικού τίτλου, έτσι ώστε να εμφανίζεται πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά τη μόλυνση. Τέλος, οι πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιικού τίτλου του ιού.

3.4 Υπολογισμός του CCID₅₀

Ο αριθμός των ιικών σωματιδίων που περιέχονται σε 100μl του ιικού δείγματος αποτελεί τον τίτλο του ιού. Ο ιικός τίτλος υπολογίστηκε για όλα τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν. Η μέτρηση του ιικού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής CCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιιεργειας. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιικός τίτλος είναι:

$$\log\text{CCID}_{50} = L - d(S - 0,5)$$

CCID: Cell Culture Infective Dose

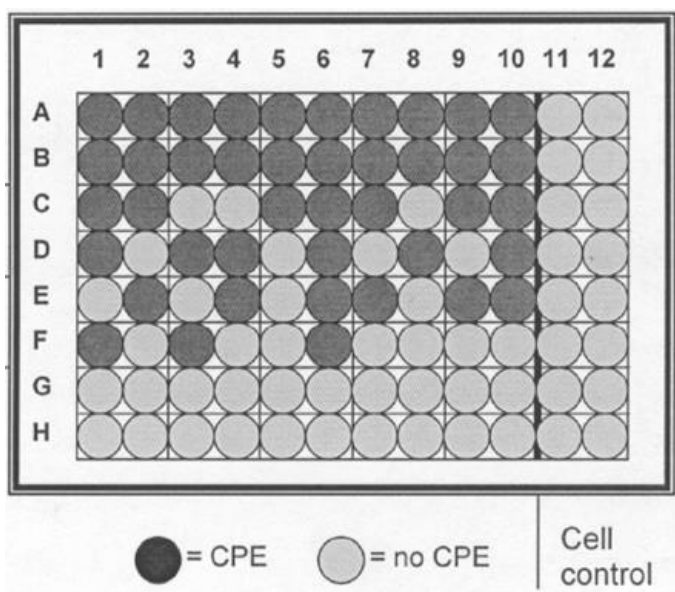
L: η μεγαλύτερη αραιώση όπου εμφανίστηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση

d: η εκθετική διαφορά μεταξύ των αραιώσεων

S: το άθροισμα των θέσεων που παρατηρήθηκε πλήρης κυτταροπαθογόνος δράση.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλάκα μικροτιτλοποίησης 96 θέσεων προστέθηκαν 100μl κυττάρων (περίπου 10.000 κύτταρα) ανά θέση. Την επομένη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε ιικό δείγμα

έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10^{-8} . Στη συνέχεια, 100μl από κάθε αραιώση του ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και αυτή τοποθετήθηκε



για επώαση στους 37°C . Η παρακολούθησή της πλάκας για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης σε καθημερινή βάση διήρκεσε μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Έπειτα έγινε η μέτρηση του CCID_{50} με τον τύπο που περιγράφηκε παραπάνω.

Εικόνα 3.4.1: Η πλάκα μικροτιτλοποίησης για τον υπολογισμό του CCID_{50} . Οριζόντια τοποθετούνται οι σειριακές αραιώσεις με την αραιώση 10^{-1} να αντιστοιχεί στη γραμμή A και τη 10^{-8} στη γραμμή H. Οι δύο τελευταίες στήλες αποτελούν τον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης.

3.5 Εκχύλιση RNA

Η εκχύλιση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas [58]. Συγκεκριμένα, μέσα σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100 mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος από τη φιάλη κυτταροκαλλιέργειας. Ακολούθησε ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 400μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και πραγματοποιήθηκε ξανά ανάδευση του μείγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Μετά την επώαση, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα 14000g και το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και στη συνέχεια ακολούθησε ανάδευση για τη διαλυτοποίηση του ιζήματος και ακόμη μία φυγοκέντρηση για 10

λεπτά στα 14000g. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl ddH₂O. Το RNA των δειγμάτων φυλάχθηκε στους -20°C για μελλοντική χρήση.

3.6 Αντίστροφη μεταγραφή

Επειδή το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι RNA, είναι απαραίτητη η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, κατά την οποία το RNA μετατρέπεται σε cDNA, προκειμένου να ακολουθήσει LAMP για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C.

Αρχικά προετοιμάστηκε το μείγμα 1 (M1) το οποίο περιείχε για την κάθε αντίδραση:

- 1μl Random Primers HEPTAN (N7) (100pmol/μl)
- 1 μl dNTPs (40 mM)
- 5 μl ddH₂O

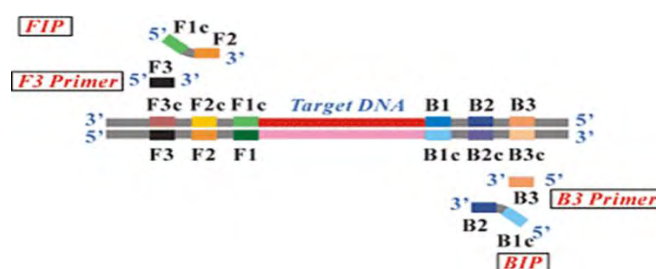
Στη συνέχεια, προστέθηκαν 71 μl από το M1 και 5 μl ιικού RNA από την εκχύλιση σε Eppendorf των 500μl και αφού φυγοκεντρήθηκαν, επώαστηκαν στους 65 °C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή. Αυτό το βήμα πραγματοποιείται για την αποδιάταξη του μονόκλωνου RNA, καθώς σε θερμοκρασία δωματίου το μόριο αυτό παρουσιάζει διάφορες διαμορφώσεις έτσι ώστε να αποκτήσει την ελάχιστη δυνατή ελεύθερη ενέργεια. Μετά την επώαση τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μείγμα (M2), το οποίο περιείχε για την κάθε αντίδραση:

- 4μl First strand Buffer (5X)
- 2μl DTT (0,1mM)
- 0,5μl RNAase out (40U/μl)
- 0,5 μl M-MLV (Invitrogen) (200U/μl)
- 1μl ddH₂O

Αφού προστέθηκαν 8μl του δεύτερου μείγματος, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και επώαστηκαν διαδοχικά σε τρεις διαφορετικές συνθήκες: 10 λεπτά στους 25 °C, 50 λεπτά στους 37 °C και 15 λεπτά στους 70 °C.

3.7 Σχεδιασμός των εκκινητών

Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C μέσω της τεχνικής της LAMP, ήταν απαραίτητο να σχεδιαστούν τα κατάλληλα εκκινητικά μόρια. Ο σχεδιασμός έγινε στην 5' UTR των εντεροϊών C, με τη χρήση του προγράμματος Primer Explorer V4. Αρχικά, έγινε ομοπαράθεση όλων των αλληλουχιών της 5' UTR των εντεροϊών της ομάδας C, με σκοπό να προκύψει μία consensus αλληλουχία με βάση την οποία έγινε ο σχεδιασμός. Γενικά στη LAMP, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε δύο, είτε τρία ζεύγη εκκινητών. Στην παρούσα εργασία, έγινε χρήση δύο ζευγών εκκινητών, των εξωτερικών F3/B3 και των εσωτερικών FIP/BIP. Ο FIP και ο BIP είναι σύνθετοι εκκινητές και όπως φαίνεται τόσο στην εικόνα 3.7.1, όσο και στον πίνακα 3.7.1, προκύπτουν από το συνδυασμό δύο επιμέρους εκκινητών, των F2/F1c και των B2/B1c αντίστοιχα.



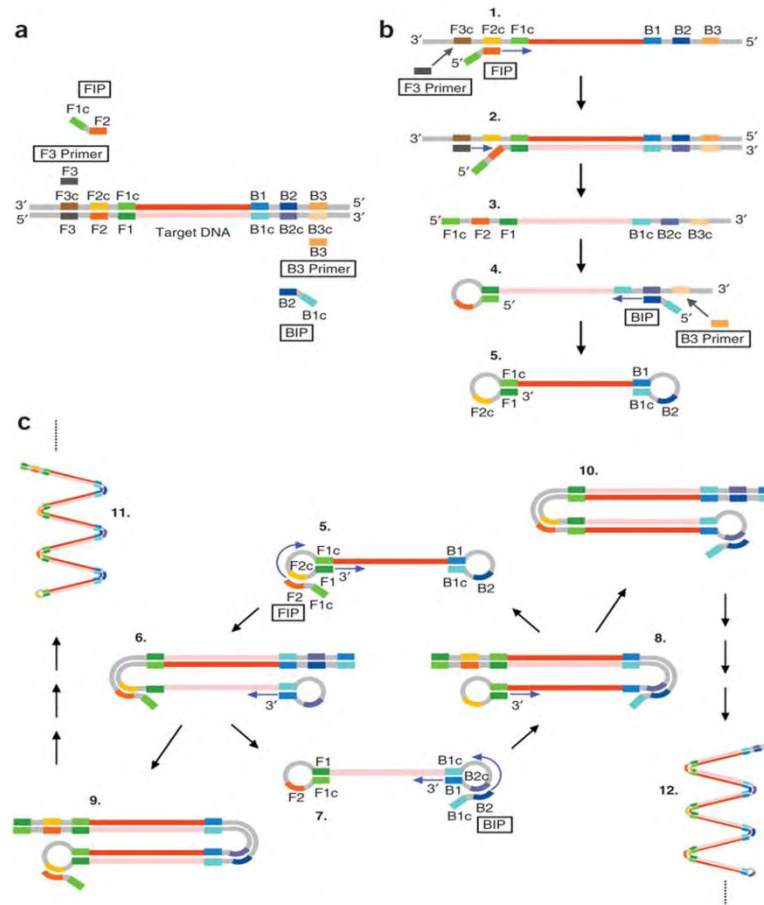
Εικόνα 3.7.1: Θέσεις υβριδισμού των εκκινητών της

Εκκινητές	Αλληλουχία	Θέση
F3	ACGGGACGCTAGTTGTGA	393-410
B3	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	580-599
FIP	ATTAGCCGCATTCAGGGGCC – ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT	
BIP	TGTCGTAACGCGCAAGTCCG – GAAACACGGACACCCAAAGT	
F2	ACAGGGTGTGAAGAGCCTAT	411-430
F1c	ATTAGCCGCATTCAGGGGC	452-471
B2	GAAACACGGACACCCAAAGT	546-565
B1c	TGTCGTAACGCGCAAGTCCG	512-531

Πίνακας 3.7.1: Οι αλληλουχίες και η θέση των εκκινητών της LAMP

3.8 LAMP (Loop mediated isothermal amplification)

Η LAMP είναι μία απλή, γρήγορη, ειδική και χαμηλού κόστους τεχνική ενίσχυσης νουκλεοτιδικού στόχου. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινήτων που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου.



Εικόνα 3.8.1: Οι διαφορετικές δομές των προϊόντων της LAMP. α) Ο αρχικός υβριδισμός των εκκινήτων στο στόχο. β) Η δημιουργία της βασικής δομής θηλιάς της LAMP. γ) Οι διαφορετικές δομές που προκύπτουν κατά την ενίσχυση της βασικής θηλιάς

Πηγή: *The principle of LAMP method*- <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>

Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία χρησιμοποιώντας μία ειδική πολυμεράση, την Bst3.0 η οποία έχει ενεργότητα εκτόπισης κλώνου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται $10^9 - 10^{10}$ φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.8.1 μέσω της LAMP δημιουργείται αρχικά η βασική δομή θηλιάς, η οποία προκύπτει από τη συμβολή και των τεσσάρων εκκινητών. Στη συνέχεια, η βασική θηλιά ενισχύεται και από αυτό το στάδιο και έπειτα στην αντίδραση συμμετέχουν μόνο οι δύο εσωτερικοί εκκινητές. Αποτέλεσμα της ενίσχυσης είναι η δημιουργία πολλών και διαφορετικών δομών.

Η αντίδραση της LAMP πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, σε τελικό όγκο 25μl. Κάθε μικροσωληνάριο περιείχε: 3μl cDNA του στόχου, dNTPs 5,6mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, MgSO₄ 4mM, FIP 1,6 pmol/μl, BIP 1,6 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, ddH₂O μέχρι τα 25μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Primus 25/96) στις εξής συνθήκες:

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι:

1. Επώαση στους 65°C για 40 λεπτά
2. Επώαση στους 80 °C για 5 λεπτά

Κατά τη διάρκεια του πρώτου βήματος πραγματοποιείται η ενίσχυση του στόχου και κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος γίνεται η απενεργοποίηση του ενζύμου.

3.9 Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της LAMP χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης σε συγκέντρωση 1,2%. Συγκεκριμένα 0,48g αγαρόζης και 40mlTBE (Tris-Boric acid-EDTA αναμίχθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Έπειτα, ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία περίπου 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του

δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 4μl προϊόντος της LAMP αναμιγνύονται με 1 μl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Για τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων είναι απαραίτητη η προσθήκη στην πηκτή ενός μάρτυρα μοριακού βάρους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο 50 bp DNA ladder (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και στη συνέχεια φωτογραφήθηκε.

3.10 PCR

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση ενός τμήματος της 5'-UTR των κλινικών δειγμάτων με σκοπό την ταυτοποίηση τους μετέπειτα μέσω RFLP. Επίσης, ενισχύθηκε η ίδια περιοχή των πρότυπων στελεχών Sabin 1 και Sabin 3 για την κατασκευή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης μέσω Real-time PCR. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι:

- UG52 Flap 168nt-AATAAATCATAACAAGCACTTCTGTTTCCCCGG-188nt και
- UC53 Flap 588nt-AATAAATCATAATTGTCACCATAACCAGCCA-606nt

Η αντίδραση της PCR έγινε σε μικροσωληνάρια των 200μl. Αρχικά προετοιμάζεται ένα μείγμα από το οποίο προστίθενται σε κάθε μικροσωληνάριο 47μl. Αυτά τα 47μl αποτελούνται από: dNTPs 1mM, MgCl₂ 2mM, KAPATaq Buffer 1X, UG52 Flap/UC53 Flap 50pmol/μl, 2.5 Units ενζύμου KAPATaq DNA Polymerase και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA αντίστοιχο του κάθε δείγματος.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν σε θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf) στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	2 λεπτά στους 95°C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους	-30 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -30 δευτερόλεπτα στους 63°C για τον υβριδισμό των εκκινήτων -30 δευτερόλεπτα στους 72 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλο	5 λεπτά στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

3.11 RFLP

Ο πολυμορφισμός μήκους τμημάτων προερχόμενων από πέψη με ένζυμα περιορισμού (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) είναι μια τεχνική μέσω της οποίας, ανάλογα με το προφίλ πέψης το οποίο προκύπτει, μπορούμε να αποφανθούμε για την ύπαρξη, τον αριθμό και τη θέση μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας (αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού) στο υπό μελέτη προϊόν ενίσχυσης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση RFLP για την ταυτοποίηση των κλινικών δειγμάτων βάσει του προφίλ πέψης που προκύπτει έπειτα από πέψη με το ένζυμο περιορισμού *HpaII* (ή *HpaI*) του προϊόντος της PCR με τους εκκινήτες UG52 Flap / UC53 Flap [59].

Επίσης, χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *HinfI* για τον έλεγχο της ειδικότητας των προϊόντων της LAMP, καθώς η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις υβριδισμού των εκκινήτων F2/F1c.

Τέλος χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο περιορισμού *EcoRI* για την επαλήθευση της ενσωμάτωσης του ενθέματος στον πλασμιδιακό φορέα κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης που θα αναφερθεί παρακάτω.

Σε μικροσωληνάρια των 500μl τοποθετήθηκαν τα παρακάτω: 2μl PCR προϊόν, 1X Buffer, 10U ένζυμο περιορισμού (*HpaII*, *HinfI* ή *EcoRI*) και ddH₂O μέχρι τα 20μl. Στη συνέχεια, ακολούθησε επώαση στους 37°C για μία ώρα. Η αντίδραση διακόπηκε με την προσθήκη 5μl 10X Loading Buffer και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των

προϊόντων της πέψης σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισης	Χρήση του ενζύμου
EcoRI	G AATTC CTTAA G	Επαλήθευση ενσωμάτωσης ενθέματος
HapII	C CGG GGC C	Ταυτοποίηση κλινικών δειγμάτων
Hinfi	G ANTC CTNA G	Έλεγχος ειδικότητας προϊόντων LAMP

Πίνακας 3.11.1: Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στις διαφορετικές RFLP και οι ιδιότητές τους

3.12 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR/LAMP

Μετά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, τόσο της PCR όσο και της LAMP, ακολούθησε ο καθαρισμός των προϊόντων αυτών. Όσον αφορά τα προϊόντα της LAMP, από το gel καθαρίστηκαν οι 4 τελευταίες ζώνες, καθώς είναι οι μόνες διακριτές ζώνες. Αφού οι επιθυμητές ζώνες αποκόπηκαν από το πήκτωμα, τοποθετήθηκαν σε eppendorf των 1,5ml και ακολούθησε ο καθαρισμός με τη χρήση του Gel Extraction Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επιβεβαίωση του καθαρισμού μέσω ηλεκτροφόρησης των προϊόντων του καθαρισμού.

3.13 Κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR/LAMP

Τα στάδια της μοριακής κλωνοποίησης των προϊόντων τόσο της PCR, όσο και της LAMP είναι τα εξής: α) η αντίδραση της τοποϊσομεράσης, β) ο μετασχηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων και γ) η επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως όσον αφορά τις ζώνες των προϊόντων της LAMP που αποκόπηκαν, η κλωνοποίηση μόνο της

δεύτερης ζώνης με αύξουσα σειρά, ήταν δυνατή μέσω της διαδικασίας TA-cloning. Προφανώς, η διαμόρφωση των υπόλοιπων ζωνών δεν επιτρέπει την κλωνοποίησή τους μέσω αυτής της διαδικασίας.

α) Αντίδραση τοποϊσομεράσης (TOPO-TA cloning):

Με την αντίδραση αυτή γίνεται η σύνδεση του επιθυμητού προϊόντος (ένθεμα) στον φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο). Ο φορέας κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pCR 2.0- TOPO (Life Technologies, USA), ο οποίος περιέχει μια περιοχή πολυσυνδέτη στην οποία ενσωματώνεται το τμήμα DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από 1μl φορέα pCR 2.0- TOPO, 1μl διαλύματος αλάτων (Salt solution), 1μl ddH₂O και 3μl του καθαρισμένου προϊόντος της PCR/LAMP. Η αντίδραση πραγματοποιείται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Μετασηματισμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων:

Η διαδικασία του μετασηματισμού ξεκινά με τη μεταφορά 200μl δεκτικών κυττάρων JM109 σε σωληνάρια erpendorf των 2ml. Στη συνέχεια προστέθηκαν 6μl του προϊόντος της αντίδρασης τοποϊσομεράσης και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων στον πάγο για 30 λεπτά. Έπειτα πραγματοποιήθηκε ο μετασηματισμός των δεκτικών κυττάρων μέσω της διαδικασίας “heat shock”, κατά την οποία τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο, στους 42°C για 90 δευτερόλεπτα και ακολούθως τοποθετήθηκαν ξανά στον πάγο για 2 λεπτά.

Οκτακόσια (800μl) θρεπτικού υποστρώματος LB Broth προστέθηκαν στα προϊόντα του “heat shock” και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 1 ώρα με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό. Έπειτα, έγινε επίστρωση 150μl καλλιέργειας σε τρυβλίο με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα LB Agar εμπλουτισμένο με 100μg/ml αμπικιλίνη και 12μl X-Gal (50mg/ml, Promega, USA).

Ακολούθησε ολονύχτια επώαση των τρυβλίων στους 37°C. Αφού αναπτύχθηκαν οι αποικίες, συλλέχθηκαν 2 λευκές (ανασυνδυασμένες) αποικίες από κάθε τρυβλίο και μεταφέρθηκαν σε 2ml LB Broth με 100μg/ml αμπικιλίνη. Οι υγρές καλλιέργειες επώαστηκαν ολονύχτια στους 37°C με ανάδευση στις 210 στροφές/λεπτό.

Η απομόνωση του ανασυνδυασμένου πλασμιδιακού φορέα από τις μετασχηματισμένες βακτηριακές καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Nucleospin Plasmid Kit (Macherey – Nagel, Duren, Germany), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

γ) Επιβεβαίωση της ένθεσης του τμήματος DNA με πέψη με EcoRI

Η διαδικασία της επιβεβαίωσης της ένθεσης μέσω RFLP πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.11

3.14 Αλληλούχιση των προϊόντων της LAMP

Οι ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που απομονώθηκαν στο προηγούμενο βήμα, στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Για κάθε αντίδραση αλληλούχισης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως εκκινητές αλληλουχίες των υποκινητών T7 και SP6 που εντοπίζονται εκατέρωθεν του ενθέματος.

Μετά την απόκτηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στελεχών εντεροϊών, στη βάση δεδομένων του NCBI με τη βοήθεια του BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

3.15 Real-time PCR

Η διαδικασία της Real-time PCR πραγματοποιήθηκε για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αριθμού αντιγράφων σε σχέση με τον κύκλο «θετικοποίησης» (Ct – cycle threshold), ώστε μετέπειτα να προσδιοριστεί η ευαισθησία της LAMP εκφραζόμενη σε αριθμό αντιγράφων.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία SYBR-Green, κατά την οποία η χρωστική αυτή προσδένεται στα δίκλινα τμήματα DNA εκπέμποντας φθορισμό, ο οποίος ανιχνεύεται στα 510nm.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, ειδικά για Real-Time PCR. Κάθε αντίδραση είχε τελικό όγκο 20μl και περιείχε τα εξής: 3μl πλασμιδιακού DNA, 1X ROX Low, 1X KAPA SYBR FAST qPCR MasterMix, 5pmol/μl από τους εκκινητές UG52 Flap/UC53 Flap και ddH₂O μέχρι τα 20μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο MX3005 της STRATAGENE στις εξής συνθήκες:

1 κύκλο	-Θερμοκρασία αρχικής αποδιάταξης: 1 λεπτό στους 95°C
40 κύκλοι	-Θερμοκρασία αποδιάταξης: 3 δευτερόλεπτα στους 95°C -Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 20 δευτερόλεπτα στους 43°C -Θερμοκρασία επέκτασης: 1 δευτερόλεπτο στο 72°C
1 κύκλο	-Melting Curve Analysis 55°C-95°C

Πίνακας 3.15.1: Συνθήκες της Real-Time PCR

3.16 Real-time LAMP

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, έγινε προσπάθεια για τη διεξαγωγή ποσοτικής LAMP με την τεχνολογία SYBR-Green. Στόχος ήταν να προσδιοριστεί ο χρόνος θετικοποίησης (Ct) του κάθε δείγματος κατά την ενίσχυσή του μέσω της LAMP. Ταυτόχρονα, μέσω της Real-time LAMP, έγινε έλεγχος για καταλληλότητα του χρόνου διεξαγωγής της επώασης στους 65°C κατά τη διάρκεια της απλής LAMP.

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 200μl, ειδικά για Real-Time PCR. Κάθε αντίδραση είχε όγκο 25μl, όπως και στην απλή LAMP, με τη μόνη διαφορά πως το μείγμα της αντίδρασης περιείχε επιπλέον τη χρωστική SYBR-Green και τη χρωστική αναφοράς ROX Low. Συγκεκριμένα, κάθε μικροσωληνάριο περιείχε: 3μl cDNA του στόχου, dNTPs 5,6mM, Isothermal Amplification Buffer II 1x, MgSO₄ 4mM, FIP 1,6 pmol/μl, BIP 1,6 pmol/μl, F3 0,2 pmol/μl, B3 0,2 pmol/μl, Bst 3.0 DNA Pol 0,32 U/μl, SYBR-Green 1X (10X, FMC BioProduct Rockland USA), ROX-Low 1X και ddH₂O μέχρι τα 25μl.

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν και τοποθετήθηκαν στο MX3005 της STRATAGENE στις εξής συνθήκες:

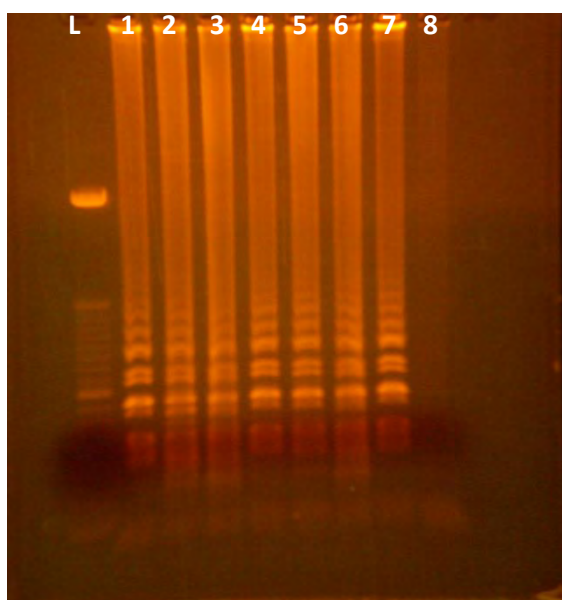
60 λεπτά	-Επώαση στους 65°C και μέτρηση του φθορισμού κάθε ένα λεπτό
5 λεπτά	-Επώαση στους 80°C για την απενεργοποίηση του ενζύμου
1 κύκλος	-Melting Curve Analysis 55°C-95°C

Πίνακας 3.15.1: Συνθήκες της Real-Time LAMP

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Αποτελέσματα της LAMP στα πρότυπα στελέχη

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, πραγματοποιήθηκε LAMP για την ανίχνευση πρότυπων στελεχών εντεροϊών της ομάδας C. Παρακάτω φαίνεται η εικόνα που προκύπτει έπειτα από την ηλεκτροφόρηση ορισμένων δειγμάτων που ανιχνεύθηκαν μέσω LAMP. Παρατηρούμε πως στο πήκτωμα δεν εμφανίζεται μία χαρακτηριστική ζώνη συγκεκριμένου μεγέθους, όπως στη συμβατική PCR, αλλά προκύπτει πλήθος ζωνών, γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη όλων αυτών των διαφορετικών δομών που περιγράφηκαν προηγουμένως κατά τη διεξαγωγή της LAMP.



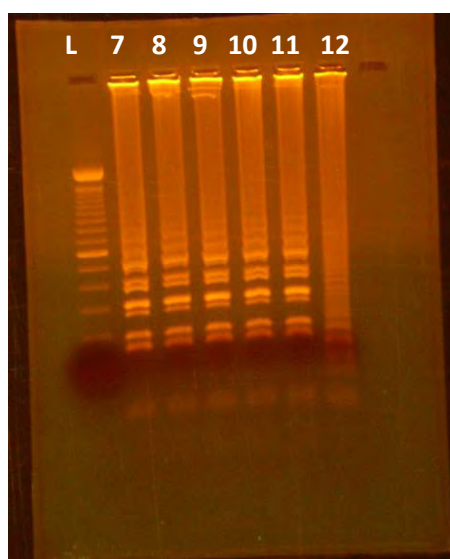
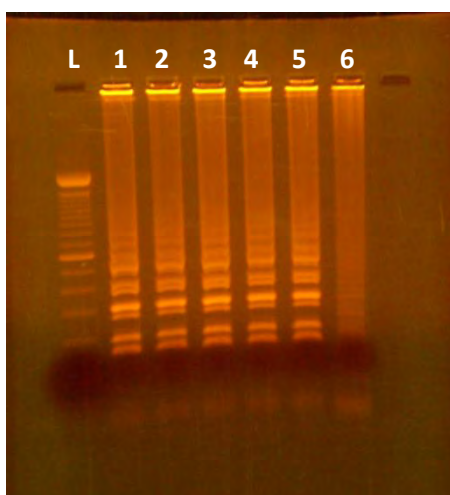
Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	CAV 1	+
2	CAV 11	+
3	CAV 15	+
4	CAV 17	+
5	CAV 20	+
6	CAV 21	+
7	CAV 24	+
8	ddH2O	-

Πρότυπα στελέχη	Αποτέλεσμα
CAV 1	+
CAV 11	+
CAV 15	+
CAV 17	+
CAV 20	+
CAV 21	+
CAV 24	+
CAV 13	+
Sabin 1	+
Sabin 2	+
Sabin 3	+

Πίνακας 4.1.1: Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των πρότυπων στελεχών εντεροϊών C που χρησιμοποιήθηκαν

4.2 Αποτελέσματα της LAMP στα κλινικά δείγματα

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, έγινε χρήση κλινικών δειγμάτων για την επαλήθευση του πρωτοκόλλου που δημιουργήθηκε για τη LAMP. Παρακάτω φαίνονται οι δύο εικόνες που προέκυψαν έπειτα από την ηλεκτροφόρηση των κλινικών δειγμάτων που είχαν υποβληθεί σε LAMP.



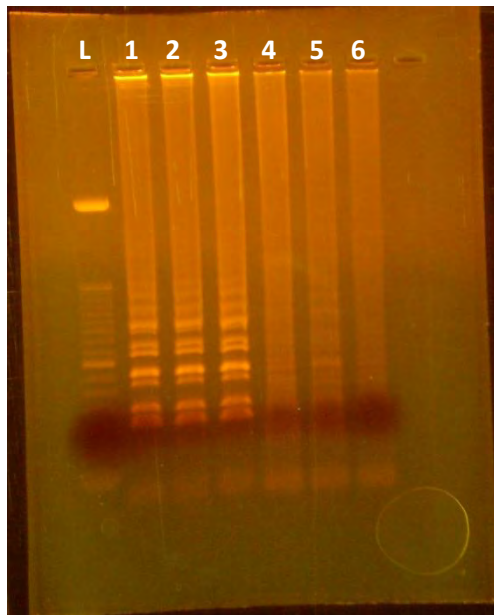
Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	IK [10 ⁵]	+
2	415 [10 ⁵]	+
3	LK3 [10 ⁵]	+
4	738[10 ⁵]	+
5	584[10 ⁵]	+
6	ddH ₂ O	-
7	742[10 ⁵]	+
8	135[10 ⁵]	+
9	580[10 ⁵]	+
10	ID[10 ⁵]	+
11	IF[10 ⁵]	+
12	ddH ₂ O	-

Πίνακας 4.2.1: Συγκεντρωτικός πίνακας των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και το αποτέλεσμα, της LAMP. Το (+) σημαίνει πως όλα κατάφεραν να ανιχνευθούν με αυτή τη μέθοδο. Το ddH₂O χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό control.

4.3 Έλεγχος της ευαισθησίας σε CCID₅₀

Η ευαισθησία της LAMP ελέγχθηκε εκφραζόμενη σε CCID₅₀, πάνω στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin1,2 και 3. Με βάση τα αποτελέσματα που

προέκυψαν για κάθε εμβολιακό στέλεχος η ευαισθησία της μεθόδου βρέθηκε να είναι στα 10 CCID₅₀. Ενδεικτικά, στην παρακάτω εικόνα παρουσιάζεται μία φωτογραφία που προέκυψε ύστερα από ηλεκτροφόρηση του πρότυπου στελέχους Sabin 3 που είχε προηγουμένως ενισχυθεί μέσω LAMP.

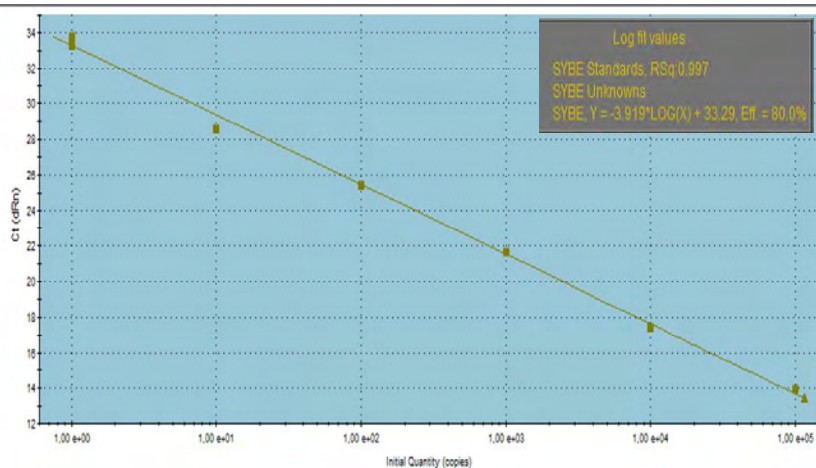


Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	S3 [10 ⁵] CCID ₅₀	+
2	S3 [10 ³] CCID ₅₀	+
3	S3 [10] CCID ₅₀	+
4	S3 [1] CCID ₅₀	-
5	Rd	-
6	ddH ₂ O	-

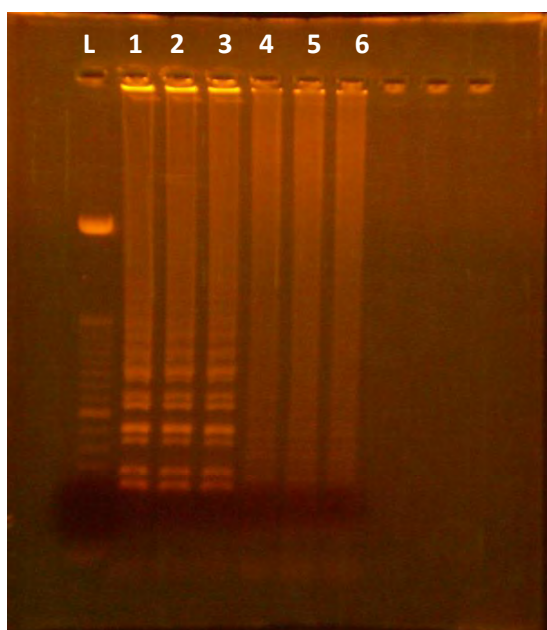
4.4 Έλεγχος ευαισθησίας της LAMP σε αντίγραφα

Η ευαισθησία της LAMP ελέγχθηκε εκφραζόμενη σε αντίγραφα πλασμιδίων, για τα οποία είχε προηγουμένως κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη μέσω Real-time PCR για τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1 και Sabin 3.

Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται η πρότυπη καμπύλη που προέκυψε για το Sabin 3, ύστερα από τη διεξαγωγή της Real-time PCR από 1 έως 10⁵ αντίγραφα.



Έπειτα, ακολούθησε LAMP πάνω στα αντίγραφα των πλασμιδίων και η ευαισθησία προσδιορίστηκε στα 10 αντίγραφα, τόσο για το Sabin 1 όσο και για το Sabin 3. Ενδεικτικά στο παρακάτω πήκτωμα απεικονίζεται η LAMP πάνω στα ανασυνδυασμένα πλασμίδια για το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3.



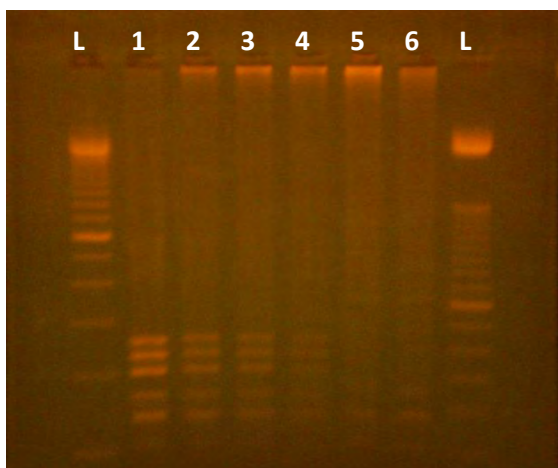
Δείγμα	Αντίγραφα πλασμιδίων	Αποτέλεσμα
1	S3 [10^5]	+
2	S3 [10^3]	+
3	S3 [10]	+
4	S3 [1]	+
5	Rd	-
6	ddH ₂ O	-

4.5 Έλεγχος της εξειδίκευσης της μεθόδου

A. Μέσω πέψης των προϊόντων της LAMP

Τα προϊόντα της LAMP υποβλήθηκαν σε πέψη με το ένζυμο περιορισμού *Hin*I για τον έλεγχο της ειδικότητάς τους, καθώς όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το ένζυμο αυτό αναγνωρίζει μία αλληλουχία ανάμεσα στις θέσεις υβριδισμού των

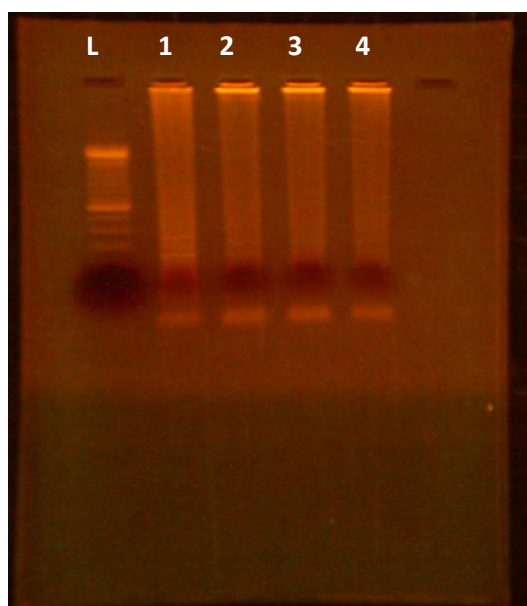
εκκινητών F2/F1c. Τα αποτελέσματα της απεικονίζονται στην παρακάτω φωτογραφία. Παρατηρούμε ότι το ένζυμο κόβει μόνο στα ιικά δείγματα.



Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	S3 [10^5]	+
2	S3 [10^3]	+
3	S3 [10]	+
4	S3 [1]	-
5	Rd	-
6	ddH ₂ O	-

B. Μέσω εφαρμογής του πρωτοκόλλου της LAMP σε εντεροϊούς της ομάδας B

Η LAMP που σχεδιάστηκε στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε στους εντεροϊούς της ομάδας B, με σκοπό να ελεγχθεί η εξειδίκευση της μεθόδου. Όντως επιβεβαιώθηκε πως η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ειδική για τους εντεροϊούς της ομάδας C, καθώς δεν ανιχνεύθηκαν εντεροϊοί της ομάδας B. Ενδεικτικά παρουσιάζεται μία φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των πρότυπων στελεχών Echo 12 οι οποίοι ανήκουν στους εντεροϊούς B.



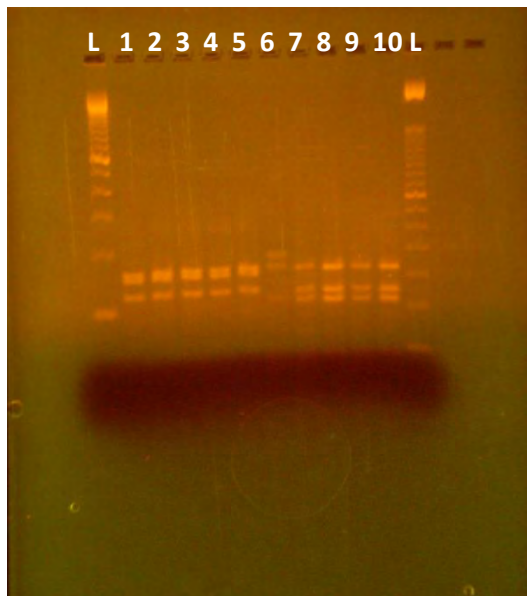
Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	E12 [10^5]	-
2	E12 [10]	-
3	E12 [10]	-
4	ddH ₂ O	-

Πρότυπα στελέχη	CBV 3	CBV 4	CBV 6	E1	E7	E12	E18
Αποτέλεσμα	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 4.5.1: Συγκεντρωτικός πίνακας όλων των πρότυπων στελεχών εντεροϊών B που χρησιμοποιήθηκαν

4.6 Ταυτοποίηση κλινικών δειγμάτων μέσω RFLP

Τα κλινικά δείγματα αφού αρχικά ενισχύθηκαν με συμβατική PCR χρησιμοποιώντας το ζεύγος εκκινητών UG52 Flap/UC53 Flap, στη συνέχεια ταυτοποιήθηκαν μέσω RFLP με το ένζυμο περιορισμού Har II. Η ταυτοποίηση έγινε μέσω του προφίλ πέψης του κάθε δείγματος στην περιοχή που είχε ενισχυθεί μέσω της συμβατικής PCR, το οποίο παρουσιάζεται για κάθε δείγμα στην παρακάτω εικόνα, σύμφωνα με τις ομαδοποιήσεις που περιγράφηκαν αναλυτικά σε δημοσιευμένη εργασία [59].



Δείγμα	cDNA	Αποτέλεσμα
1	IK [10 ⁵]	Sabin 3
2	415 [10 ⁵]	Sabin 3
3	LK3 [10 ⁵]	Sabin 3
4	738[10 ⁵]	Sabin 3
5	584[10 ⁵]	Sabin 3
6	742[10 ⁵]	Sabin 1
7	135[10 ⁵]	Sabin 2
8	580[10 ⁵]	Sabin 2
9	ID[10 ⁵]	Sabin 2
10	IF[10 ⁵]	Sabin 2

4.7 Αποτελέσματα αλληλούχισης

Όπως αναφέρθηκε, τα προϊόντα που προέκυψαν από τη LAMP καθαρίστηκαν, κλωνοποιήθηκαν και στάλθηκαν για αλληλούχιση στην εταιρεία Macrogen Europe (Amsterdam, The Netherlands). Μετά την απόκτηση των

νουκλεοτιδικών αλληλουχιών πραγματοποιήθηκε επεξεργασία των αλληλουχιών και με ομοπαράθεση μελετήθηκαν ως προς την ομοιότητα τους με τις αλληλουχίες των αντίστοιχων στελεχών εντεροϊών που έχουν κατατεθεί, με τη βοήθεια του BLAST.

Όλες οι αλληλουχίες αντιστοιχούσαν στο στέλεχος από το οποίο προέρχονταν, καθώς και στην αναμενόμενη περιοχή του γονιδιώματος όπου πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση.

Παρακάτω παρουσιάζεται ενδεικτικά το δείγμα S3 και τα αποτελέσματα του BLAST.

Human poliovirus 3 isolate 45507, complete genome
Sequence ID: gb|KU763188.1|Length: 7431Number of Matches: 1

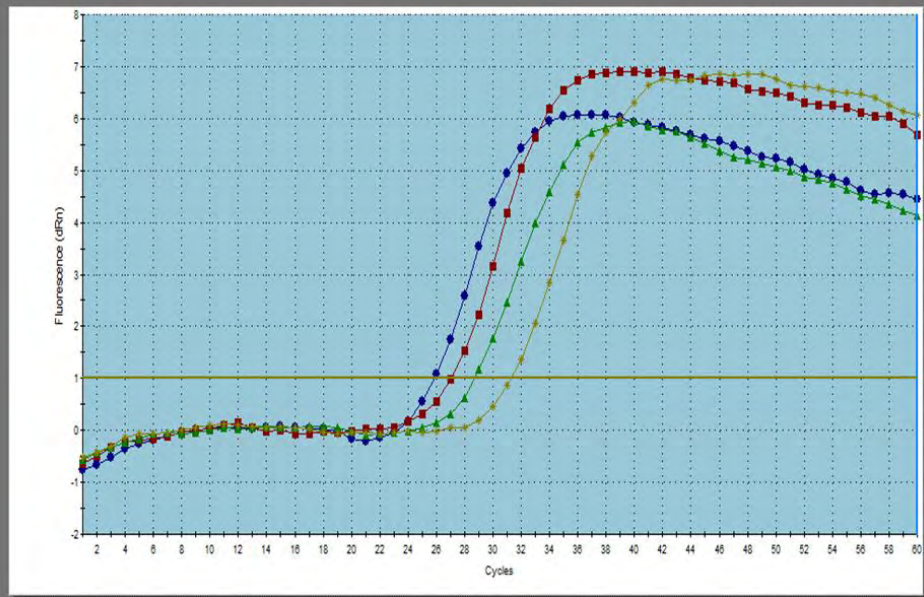
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
277 bits(306)	7e-71	155/156(99%)	0/156(0%)	Plus/Plus	
Query	21	ACAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATGAGAGTCCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAA			80
Sbjct	411	ACAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTACATGAGAGTCCCTCCGGCCCTGAATGCGGCTAA			470
Query	81	TACTAACCATGGAGCAGGCAGCTGCAACCCAGCAGCCAGCCTGTCGTAACGCGCAAGTCC			140
Sbjct	471	TCCTAACCATGGAGCAGGCAGCTGCAACCCAGCAGCCAGCCTGTCGTAACGCGCAAGTCC			530
Query	141	GTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCC			176
Sbjct	531	GTGGCGGAACCGACTACTTTGGGTGTCCGTGTTTCC			566

Όπου παρατηρούμε πρώτον ότι το τμήμα που αλληλουχήθηκε εμφανίζει απόλυτη ομοιότητα με το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 3 και δεύτερον ότι η θέση του τμήματος αυτού ορίζεται σωστά πάνω στο πρότυπο στέλεχος συγκεκριμένα μεταξύ των νουκλεοτιδίων 411-566.

4.8 Αποτελέσματα Real-time LAMP

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια διεξαγωγής ποσοτικής LAMP. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στην παρακάτω εικόνα.

Amplification Plots



Δείγμα	μπλε	κόκκινο	πράσινο	χρυσό
cDNA	S3 [10^5]	S3 [10^3]	S3 [10]	Rd

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος *Enterovirus*. Το γονιδίωμα τους είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+)ssRNA μήκους περίπου 7.500 βάσεων, το οποίο περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας.

Οι εντεροϊοί, ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως [60]. Σχετίζονται με διάφορες ασθένειες στον άνθρωπο, οι οποίες προκαλούν ένα ευρύ φάσμα κλινικών συμπτωμάτων το οποίο κυμαίνεται από ασυμπτωματικές μολύνσεις έως και σοβαρές ασθένειες. Συγκεκριμένα παραδείγματα αποτελούν: το κοινό κρουολόγημα, η ασθένεια των χεριών, των ποδιών και του στόματος (HFMD), οξεία χαλαρή παράλυση, άσηπτη μηνιγγίτιδα και μυοκαρδίτιδα [61,62]. Η μετάδοση των εντεροϊών πραγματοποιείται κυρίως μέσω του στόματος και των κοπράνων [63]. Η επαφή με νερό, φαγητό και χώμα με μολυσμένα κόπρανα, μπορεί να οδηγήσει στη μετάδοση μέσω της κοπρανο-στοματικής οδού [63,64]. Όπως, αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι εντεροϊοί συνήθως προκαλούν ασυμπτωματικές μολύνσεις. Έτσι, μπορούν να κυκλοφορούν «σιωπηλά» μέσα σε έναν πληθυσμό με αποτέλεσμα να ελλοχεύει ο κίνδυνος για πιθανές εξάρσεις. Για αυτό το λόγο είναι πολύ σημαντική η έγκαιρη και άμεση διάγνωση τους.

Παραδοσιακά, η διάγνωση των μολύνσεων από εντεροϊούς περιλαμβάνει κυτταροκαλλιέργεια, ακολουθούμενη από οροξεουδετέρωση μέσω χρήσης των κατάλληλων αντισωμάτων. Παρόλα αυτά, η μέθοδος αυτή είναι πολύ χρονοβόρα, ακριβή και όχι τόσο πρακτική. Έχουν αναπτυχθεί πλέον μοριακές τεχνικές ανίχνευσης των εντεροϊών, όπως για παράδειγμα νέες εκδοχές PCR, RT-PCR και qRT-PCR, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα. [65,66,67]. Όμως κάθε μία από αυτές τις μεθόδους έχει τα δικά της μειονεκτήματα. Πιο συγκεκριμένα, ο εξοπλισμός που απαιτείται για την ανίχνευση μέσω αυτών των τεχνικών είναι αρκετά ακριβός και οι μέθοδοι οπτικοποίησης των αποτελεσμάτων είναι περίπλοκες. Έτσι, είναι αναγκαίο να αναπτυχθούν νέες μοριακές τεχνικές οι οποίες να είναι γρήγορες, εύκολες και χαμηλού κόστους.

Μία εναλλακτική προσέγγιση μπορεί να αποτελέσει η LAMP (Loop-mediated isothermal amplification). Η LAMP είναι μία σχετικά νέα τεχνική ενίσχυσης νουκλεϊκών οξέων, που πραγματοποιείται σε ένα βήμα [68]. Η αντίδραση της LAMP βασίζεται στην ενεργότητα εκτόπισης κλώνου της Bst DNA πολυμεράσης, του ενζύμου που χρησιμοποιείται στη LAMP. Είναι ισόθερμη τεχνική και το εύρος της θερμοκρασίας κυμαίνεται από 60 °C έως 65 °C. Το γεγονός αυτό προσδίδει το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτείται χρήση θερμοκυκλοποιητή για τη διεξαγωγή της, καθώς η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε επωαστήρα ή υδατόλουτρο. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση τεσσάρων διαφορετικών εκκινητών που στοχεύουν σε έξι διακριτές περιοχές του γονιδίου στόχου. Η LAMP έχει υψηλή αποτελεσματικότητα ενίσχυσης του στόχου, καθώς αυτός ενισχύεται $10^9 - 10^{10}$ φορές μέσα σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Έτσι προκύπτει το πλεονέκτημα πως η οπτικοποίηση έκτος από τις συμβατικές μεθόδους, όπως είναι η ηλεκτροφόρηση, μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω χρήσης κάποιων χρωστικών φθορισμού ή σε κάποιες περιπτώσεις και με γυμνό μάτι βάσει της θολρότητας των θετικών δειγμάτων που οφείλεται στην ύπαρξη των πυροφωσφορικών [69].

Σε αυτή την εργασία έγινε προσπάθεια για το σχεδιασμό ενός πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη μίας γρήγορης, εύκολης, ευαίσθητης και υψηλής εξειδίκευσης ισοθερμικής τεχνικής αντίστροφης μεταγραφής Reverse Transcription-Loop mediated amplification, (RT-LAMP) για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C (HEV-C).

Για αυτό το σκοπό σχεδιάστηκαν τέσσερις εκκινητές, οι οποίοι αναγνωρίζουν έξι διακριτές περιοχές πάνω στην 5'UTR των HEV-C. Η περιοχή αυτή είναι ιδιαίτερα συντηρημένη στους εντεροϊούς. Έτσι, οι περισσότερες τεχνικές ανίχνευσης των εντεροϊών στοχεύουν στην 5'UTR. Ο σχεδιασμός των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος Primer Explorer V4. Αρχικά, έγινε ομοπαράθεση όλων των αλληλουχιών της 5'UTR όλων των HEV-C και προέκυψε μία consensus αλληλουχία στην οποία βασιστήκαμε για να γίνει ο σχεδιασμός. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, επειδή η 5'UTR των εντεροϊών αποτελεί μία πολύ συντηρημένη περιοχή, προσπαθήσαμε ο ένας εκ των τεσσάρων εκκινητών (F3) που χρησιμοποιήθηκαν στη LAMP να είναι ειδικός μόνο για τους

HEV-C. Ο F3 είναι ένας από τους εξωτερικούς εκκινητές και είναι απαραίτητος για τη δημιουργία της βασικής θηλιάς, η οποία είναι αυτή που στη συνέχεια ενισχύεται και δίνει τα τελικά προϊόντα της LAMP. Έτσι, αν ο F3 δεν μπορέσει να υβριδοποιηθεί, δεν μπορεί να δημιουργηθεί η βασική θηλιά, με αποτέλεσμα να μην έχουμε ενίσχυση.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια ανεύρεσης των βέλτιστων συνθηκών πάνω στα πρότυπα εμβολιακά στελέχη Sabin 1,2 και 3. Τελικά, οι συνθήκες που προέκυψαν ύστερα από αρκετές δοκιμές ήταν:

1. Επώαση στους 65° C για 40 λεπτά, για την ενίσχυση του στόχου
2. Επώαση στους 80 ° C για 5 λεπτά, για την απενεργοποίηση του ενζύμου

Αφού βρέθηκαν οι κατάλληλες συνθήκες, έγινε εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε πρότυπα στελέχη HEV-C. Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ανιχνεύθηκαν με επιτυχία. Ακολούθησε εφαρμογή του πρωτοκόλλου σε κλινικά δείγματα όπου και πάλι η ανίχνευση ήταν επιτυχημένη.

Στη συνέχεια, έγινε έλεγχος της ευαισθησίας της μεθόδου εκφρασμένη τόσο σε CCID₅₀, όσο και σε αντίγραφα ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με τμήμα της 5'UTR για τα Sabin 1 και 3, για τα οποία είχε προηγουμένως κατασκευαστεί πρότυπη καμπύλη μέσω Real-time PCR. Η ευαισθησία της μεθόδου βρέθηκε να είναι στα 10 CCID₅₀ και στα 10 αντίγραφα αντίστοιχα. Έπειτα έγινε συσχέτιση των CCID₅₀ και των πλασμιδιακών αντιγράφων μέσω Real-time PCR όπου βρέθηκε πως το 1 CCID₅₀ αντιστοιχεί σε 1 αντίγραφο, τα 10 CCID₅₀ στα 10 αντίγραφα κ.ο.κ. Επομένως, πρόκειται για μία αρκετά ευαίσθητη τεχνική καθώς το όριο ανίχνευσης είναι αρκετά χαμηλό και ίσως λίγο καλύτερο από τη συμβατική PCR.

Όσον αφορά την εξειδίκευση της μεθόδου, αυτή ελέγχθηκε με 3 ξεχωριστούς τρόπους:

Αρχικά, έγινε πέψη των προϊόντων της LAMP με το ένζυμο περιορισμού HinfI, το οποίο αναγνωρίζει την αλληλουχία που βρίσκεται ανάμεσα στις αλληλουχίες υβριδισμού των εκκινητών F2/F1c. Το αποτέλεσμα της πέψης ήταν πως

μόνο τα θετικά για τον ιό δείγματα παρουσίασαν το αναμενόμενο προφίλ πέψης, καθώς οι αρνητικοί μάρτυρες (ddH₂O και κύτταρα Rd) ήταν καθαροί.

Έπειτα, η εξειδίκευση της μεθόδου ελέγχθηκε μέσω εφαρμογής του πρωτοκόλλου σε πρότυπα στελέχη HEV-B. Τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά για τα περισσότερα από τα στελέχη αυτά.

Τέλος, η εξειδίκευση της μεθόδου ελέγχθηκε μέσω αλληλούχισης των προϊόντων της LAMP, τα οποία προηγουμένως είχαν κλωνοποιηθεί. Συγκεκριμένα, η ζώνη που μπόρεσε να κλωνοποιηθεί, ήταν η δεύτερη από το τέλος. Μία πιθανή εξήγηση είναι πως η στερεοδιαμόρφωση μόνο της συγκεκριμένης ζώνης επιτρέπει την κλωνοποίηση μέσω του συγκεκριμένου kit κλωνοποίησης που χρησιμοποιούμε στο εργαστήριο. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης των προϊόντων επιβεβαίωσαν την εγκυρότητα της τεχνικής, καθώς όλες οι αλληλουχίες αντιστοιχούσαν στο στέλεχος από το οποίο προέρχονταν, καθώς και στην αναμενόμενη περιοχή του γονιδιώματος όπου πραγματοποιήθηκε η ενίσχυση.

Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια για ποσοτική LAMP (Real-time LAMP), με την τεχνολογία SYBR-Green. Όπως έχουμε αναφέρει και παραπάνω, μέσω της LAMP παράγονται προϊόντα διαφόρων δομών, από την ενίσχυση της βασικής θηλιάς. Γνωρίζουμε επίσης πως η SYBR-Green είναι μία χρωστική που έχει την ιδιότητα να συνδέεται σε δίκλινα μόρια παράγοντας φθορισμό. Επομένως, η ανάπτυξη μίας Real-time LAMP με τη χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας ήταν αρκετά δύσκολο να αναπτυχθεί. Όμως, εν μέρει καταφέραμε να ανιχνεύσουμε σε πραγματικό χρόνο τον κύκλο θετικοποίησης κάθε δείγματος. Όσον αφορά τη συγκεκριμένη μέθοδο, χρειάζονται περαιτέρω δοκιμές έτσι ώστε να πούμε με σιγουριά πως αποτελεί κατάλληλο διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση των HEV-C.

Συνοψίζοντας, η LAMP αποτελεί μία γρήγορη, ευαίσθητη, υψηλής εξειδίκευσης και χαμηλού κόστους τεχνική για την ανίχνευση των εντεροϊών της ομάδας C. Έτσι, μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για αυτή την ομάδα ιών καθώς και για άλλους παθογόνους παράγοντες.

6. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Knipe D. M., and Howley P. M. (2007) *Fields Virology, 5th Edition Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins.
2. Adams, M.J., Lefkowitz, E.J., King, A.M.Q., Bamford, D.H., Breitbart, M., Davison, A.J., Ghabrial, S.A., Gorbalenya, A.E., Knowles, N.J., Krell, P., Lavigne, R., Prangishvili, D., Sanfaçon, H., Siddell, S.G., Simmonds, P. and Carstens, E.B. (2015). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). *Arch. Virol.* 160: 1837-1850.
3. Knowles, N.J., Hovi, T., Hyypiä, T., King, A.M.Q., Lindberg, A.M., Pallansch, M.A., Palmenberg, A.C., Simmonds, P., Skern, T., Stanway, G., Yamashita, T. and Zell, R. (2012). Picornaviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, pp 855-880.
4. Flanagan JB, Petterson RF, Ambros V, et al. Covalent linkage of a protein to a defined nucleotide sequence at the 5'-terminus of virion and replicative intermediate RNAs of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:961-965.
5. Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1962;27:1-22.
6. Rueckert RR, Dunker AK, Stoltzfus CM. The structure of mouse-Elberfeld virus: a model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969;62:912-919.
7. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* 1985;229:1358-1365.
8. Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.*1990;71(11): 2483-2501
9. Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. *Molecular Biology of poliovirus*. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e. 1999
10. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, et al. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:59-63
11. Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, et al. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*1977;268:208-213.
12. Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol* 1978;27:357-365

13. Racaniello V. Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology* 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2007, p. 796-830.
14. Summers DF, Maizel JV. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968;59:966–971.
15. Kitamura N, Semler BL, Rothberg PG, et al. Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature* 1981;291: 547–553.
16. Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol* 1993;67:2961–2971.
17. Oberste MS, Maher K, Williams AJ, Dybdahl-Sissoko N, Brown BA, Gookin MS, Peñaranda S, Mishrik N, Uddin M, Pallansch MA. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses. *J Gen Virol*.2006;87(Pt 1):119-28.
18. Brown DM, Cornell CT, Tran GP, et al. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol* 2005;79:11962–11973.
19. Todd S, Towner JS, Brown DM, et al. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol*. 1997;71:8868–8874.
20. Yogo Y, Teng MH, Wimmer E. Poly(U) in poliovirus minus RNA is 5'-terminal. *Biochem Biophys Res Commun* 1974;61:1101–1109.
21. Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 1989;56:855–865.
22. Rossmann M. G., He Y., Kuhn R. J. Picornavirus-receptor interactions. *Trends Microbiol*.2002;10(7): 324–331.
23. Koike S, Taya C, Kurata T, et al. Transgenic mice susceptible to poliovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88: 951–955.
24. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science* 1981;214:916–919.
25. Fricks CE, Hogle JM. Cell-induced conformational change in poliovirus: externalization of the amino terminus of VP1 is responsible for liposome binding. *J Virol* 1990;64:1934–1945.
26. Ambros V, Baltimore D. Purification and properties of a HeLa cell enzyme able to remove the 5'- terminal protein from poliovirus RNA. *J Biol Chem*1980: 255:6739–6744

27. Egger D, Teterina N, Ehrenfeld E, et al. Formation of the poliovirus replication complex requires coupled viral translation, vesicle production, and viral RNA synthesis. *J Virol*
28. Egger D., Bienz K. Recombination of poliovirus RNA proceeds in replication complexes originating from distinct replication starts. *J. Virol.* 2002;76(21): 10960 – 10971.2000;74: 6570–6580.
29. Bienz K, Egger D, Pasamontes L. Association of polioviral proteins of the P2 genomic region with the viral replication complex and virus-induced membrane synthesis as visualized by electron microscopic immunocytochemistry and autoradiography. *Virology* 1987;160:220–226.
30. Cho MW, Teterina N, Egger D, et al. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells.*Virology* 1994;202:129–145
31. Echeverri AC, Dasgupta A. Amino terminal regions of poliovirus 2C protein mediate membrane binding. *Virology* 1995;208:540–553.
32. Murray K. E., and Barton D. J. Poliovirus CRE – dependent VPg uridylylation is required for positive – strand RNA synthesis but not for negative – strand RNA synthesis. *J. Virol.* 2003;77(8):4739–4750.
33. 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.
34. Rieder E, Paul AV, Kim DW, et al. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000;74: 10371–10380.
35. Paul AV, Rieder E, Kim DW, et al. Identification of an RNA hairpin in poliovirus RNA that serves as the primary template in the in vitro uridylylation of VPg. *J Virol* 2000;74:10359–10370.
36. Yin J, Paul AV, Wimmer E, et al. Functional dissection of a poliovirus cis-acting replication element [PV-cre(2C)]: analysis of single- and dual-cre viral genomes and proteins that bind specifically to PV-cre RNA. *J Virol* 2003;77:5152–5166.
37. Gamarnik AV, Andino R. Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes Dev* 1998;12:2293–2304
38. Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993. Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.
39. Melnick J. L. Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.)1990;549 – 605.

40. G.Palacios and MS Oberste. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of neurovirology* 2005;11: 424 – 433
41. Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
42. Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
43. Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzynska-Kokorniak. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518 (2003)
44. Lukashov A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E., Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J. Virol.* 2003;77(19): 10423-31.
45. Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert-Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 2000;74(18):8434-8443.
46. Kottaridi C., Bolanaki E., Kyriakopoulou Z., Dedepsidis E., Pratti A., Markoulatos P. Possible recombination and gene adaptation exchanges among clinical echovirus strains: crossing the temporal and topological barriers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007;58(4): 407 – 412
47. Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulis C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/ Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:343 - 351.
48. Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 1986;155: 202–213.
49. Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* 1995;23(11): 1870–1875.
50. Kirkegaard K., and Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 1986;47(3): 433 – 443
51. Agol V. I. 1997. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.
52. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987;160:311-322.

53. Kew O, De L, Yang C-F, et al. The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res* 1993;215-246.
54. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, et al. Molecular epidemiology of polioviruses. In: Kew OM, Nathanson N, eds. *Molecular Epidemiology. Seminars in Virology, Vol 6*. New York: Academic Press; 1995:401-414.
55. Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, et al. Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol* 1995;76:1687-1699.
56. Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, et al. Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis* 1995;171:1399-1405
57. Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, et al. Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis* 1993;168:1361-1367.
58. Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
59. Nikolaos Siafakas, Panayotis Markoulatos, Constantin Vlachos, Glyn Stanway, Georgina Tzanakaki, Jenny Kourea-Kremastinou. Molecular sub-grouping of enterovirus reference and wild type strains into distinct genetic clusters using a simple RFLP assay. 2003 *Molecular and cellular probes*.
60. Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, Pallansch MA. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ.* 2006;55:1-20.
61. Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J.* 2009;6:149. doi: 10.1186/1743-422X-6-149.
62. Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields virology*. 4. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press; 2001. pp. 723-775
63. Rajtar B, Majek M, Polański Ł, Polz-Dacewicz M. Enteroviruses in water environment-a potential threat to public health. *Ann Agric Environ Med.* 2008;15:199-203
64. Lee HK, Jeong YS. Comparison of total culturable virus assay and multiplex integrated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:3632-3636. doi: 10.1128/AEM.70.6.3632-3636.2004

65. Hymas WC, Aldous WK, Taggart EW, Stevenson JB, Hillyard DR. Description and validation of a novel real-time RT-PCR enterovirus assay. *Clin Chem*. 2008;54:406–413. doi: 10.1373/clinchem.2007.095414.
66. Hu X, Zhang Y, Zhou X, Xu B, Yang M, Wang M, Zhang C, Li J, Bai R, Xu W, Ma X. Simultaneously typing nine serotypes of enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease by a GeXP analyzer-based multiplex reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2012;50:288–293. doi: 10.1128/JCM.05828-11
67. Pusch D, Ihle S, Lebuhn M, Graeber I, Lopez-Pila JM. Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge by cell culture and real-time RT-PCR using paramagnetic capturing. *J Water Health*. 2005;3:313–324.
68. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000;28:e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
69. Zhao, H.-B., Yin, G.-Y., Zhao, G.-P., Huang, A.-H., Wang, J.-H., Yang, S.-F., ... Kang, W.-J. (2014). Development of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Universal Detection of Enteroviruses. *Indian Journal of Microbiology*, 54(1), 80–86.
70. Ellie Ehrenfeld, Esteban Domingo, Raymond P. Roos. *The Picornaviruses*. ASM Press, 2010
71. Intercellular Adhesion Molecule-1: binding to cellular and viral ligands, with implications for biotherapeutics, Jin Lab, Weill Cornell Medical College