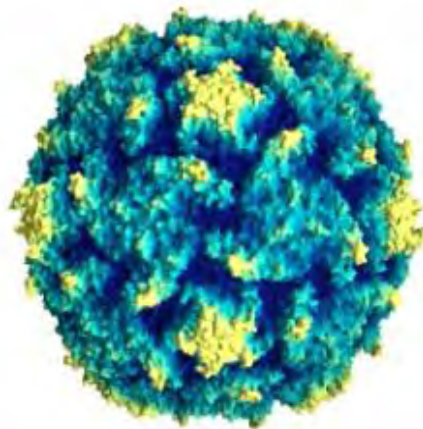




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πτυχιακή Μελέτη

Θερμική αδρανοποίηση των ιών Sabin 1 και Echo
12 και επιπτώσεις της θερμικής αδρανοποίησης
στο ιϊκό γονιδίωμα.



Πάτα Μαρία

Λάρισα 2019

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ ΤΗΛΕΜΑΧΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ):

ΣΥΜΒΑΣΙΟΥΧΟΣ ΔΙΔΑΣΚΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ:

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

ΜΟΣΙΑΛΟΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ:

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

Θερμική αδρανοποίηση των ιών Sabin 1 και Echo 12 και επιπτώσεις της θερμικής
αδρανοποίησης στο ιϊκό γονιδίωμα.

Thermal inactivation of Sabin 1 and Echo 12 viruses and effects of thermal
inactivation to the viral genome.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας Μικροβίων – Μοριακής Βακτηριολογίας – Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, από τον Φεβρουάριο του 2018 μέχρι τον Ιούλιο του 2019.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την συγκεκριμένη εργασία καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση του καθ' όλη την διάρκεια διεξαγωγής της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον διδάκτωρ και επιβλέποντα της πτυχιακής μου εργασίας Δημητρίου Τηλέμαχο για την πολύτιμη βοήθεια, την αμέριστη στήριξη και ενθάρρυνση καθώς και για την υπομονή που επέδειξε όλους αυτούς τους μήνες.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσιαλο Δημήτριο που δέχτηκε να συμμετέχει στην τριμελή επιτροπή.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Δάσκου Μαρία για την ατέρμονη βοήθεια και εμπιστοσύνη της καθώς και για τις γνώσεις που μου μετέδωσε όλο αυτό το διάστημα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και την φιλική τους διάθεση.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους γονείς μου, Παναγιώτη και Ανδρονίκη, και στα αδέρφια μου, Δημήτρη και Γιάννη, καθώς χάρη στην οικονομική αλλά κυρίως την ηθική στήριξη τους κατάφερα να ολοκληρώσω τις σπουδές μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος Enterovirus. Το γονιδίωμα τους αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7.500 βάσεων και περιβάλλεται από ένα καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Το ιικό γένωμα απαρτίζεται από μια συντηρημένη 5'αμετάφραστη περιοχή, ένα μοναδικό αναγνωστικό πλαίσιο και μια 3'αμετάφραστη περιοχή η οποία φέρει μια poly(A) ουρά.

Οι εντεροϊοί έχουν συσχετιστεί με πλήθος ασθενειών στον άνθρωπο. Προκαλούν κυρίως ασυμπτωματικές μολύνσεις. Ωστόσο, εμπλέκονται σε ένα σημαντικό ποσοστό σοβαρών ασθενειών του ανθρώπου όπως στην πολιομυελίτιδα και την άσηπτη μηνιγγίτιδα. Επομένως, είναι σημαντική η παρακολούθηση της κυκλοφορίας τους ώστε να είναι εφικτή η ριζική εξάλειψη τους. Η μελέτη του γονιδιώματος των εντεροϊών αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την κατανόηση της μόλυνσης και ως εκ τούτου την αποτελεσματική αντιμετώπιση τους.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε το ιικό στέλεχος Sabin 1 που ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας C και το στέλεχος Echo 12 το οποίο ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας B. Μάλιστα χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών των στελεχών, μία υψηλή της τάξης του 10^6 TCID₅₀ και μια χαμηλή της τάξης του 10 TCID₅₀. Τα στελέχη αυτά αδρανοποιήθηκαν με θέρμανση σε θερμοκρασίες που διέφεραν μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων και κατόπιν μελετήθηκε το γονιδίωμα ως προς τις επιπτώσεις που επιφέρει η θερμική αδρανοποίηση, όπως για παράδειγμα η εμφάνιση ρήξεων στο ιικό γονιδίωμα, με την βοήθεια της τεχνικής PCR. Συγκεκριμένα, οι περιοχές που ελέγχθηκαν ήταν η 5'UTR, η 3'UTR, η 3C και η 3D, οι οποίες σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη ευαισθησία στην πρόκληση ρήξεων.

ABSTRACT

Enteroviruses belong to genus Enterovirus of Picornaviridae family. Their genome is a positive sense single-stranded RNA molecule of 7.500 nucleotides in length, surrounded by a viral icosahedral protein capsid. Their genome is consisted of a highly conserved 5' untranslated region, an open reading frame and a 3' untranslated region with a poly (A)-tract.

The enteroviruses have been associated with many human diseases. Mainly they cause asymptomatic infections. However, they may be implicated in some serious human diseases such as poliomyelitis and aseptic meningitis. It is therefore important to monitor their circulation in order to eliminate them radically. The study of enteroviruses's genome is an important tool for understanding the infection and hence its effective treatment.

In the present work, the viral strain Sabin 1 belonging to group C of enteroviruses and the Echo12 strain belonging to group B of enteroviruses were studied. Two different concentrations of these strains were used, a high of 10^6 TCID₅₀ and a low of 10 TCID₅₀. These strains were inactivated by heating at temperatures that differed between the two concentrations, and then the genome was studied for the effects of thermal inactivation, such as breaks in the viral genome, by using PCR technique. Specifically, we studied the 5' UTR, 3' UTR, 3C and 3D regions which appear to be the most sensitive, according to the literature.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 9 |
| 1.1. | Ταξινόμηση των εντεροϊών | 9 |
| 1.2. | Δομή και αντιγονικότητα των ιϊκών σωματιδίων | 11 |
| 1.3. | Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών | 13 |
| 1.4. | Κύκλος ζωής των εντεροϊών | 15 |
| 1.5. | Παθογένεια | 16 |
| 1.6. | Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών | 17 |
| 1.6.1. | Μεταλλάξεις | 17 |
| 1.6.2. | Ανασυνδυασμός | 18 |
| 1.7. | Εμβόλια κατά των εντεροϊών | 19 |
| 1.7.1. | IPV | 19 |
| 1.7.2. | OPV | 20 |
| 1.8. | Επιδημιολογία | 20 |
| 2. | ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ | 22 |
| 3. | ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ | 23 |
| 3.1. | Πρότυπα στελέχη | 23 |
| 3.2. | Καλλιέργεια των ιών | 23 |
| 3.3. | Μέτρηση του ιϊκού τίτλου | 24 |
| 3.4. | Σειριακές αραιώσεις | 25 |
| 3.5. | Αδρανοποίηση του ιού | 25 |
| 3.6. | Εκχύλιση του ιϊκού RNA | 26 |
| 3.7. | Εκκνητές | 26 |
| 3.8. | Αντίστροφη Μεταγραφή | 27 |
| 3.9. | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 30 |
| 3.9.1. | PCR για την ανίχνευση πιθανών ρήξεων | 30 |
| 3.9.2. | Nested-PCR | 31 |
| 3.10. | Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR | 34 |
| 4. | ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 36 |
| 4.1. | Αποτελέσματα για το στέλεχος Sabin 1 [10^6] TCID ₅₀ | 36 |
| 4.1.1. | Περιοχή 5' UTR | 36 |
| 4.1.2. | Περιοχή 3C | 37 |
| 4.1.3. | Περιοχή 3D | 37 |
| 4.2. | Αποτελέσματα για το στέλεχος Sabin 1 [10] TCID ₅₀ | 38 |

| | | |
|--------|--|----|
| 4.2.1. | Περιοχή 5'UTR..... | 39 |
| 4.2.2. | Περιοχή 3C..... | 39 |
| 4.2.3. | Περιοχή 3D | 40 |
| 4.3. | Αποτελέσματα για το στέλεχος Echo 12 [10^6] TCID ₅₀ | 41 |
| 4.3.1. | Περιοχή 5'UTR..... | 41 |
| 4.3.2. | Περιοχή 3C..... | 41 |
| 4.3.3. | Περιοχή 3D | 42 |
| 4.4. | Αποτελέσματα για το στέλεχος Echo 12 [10] TCID ₅₀ | 43 |
| 4.4.1. | Περιοχή 5'UTR..... | 43 |
| 4.4.2. | Περιοχή 3C..... | 43 |
| 4.4.3. | Περιοχή 3D | 44 |
| 4.5. | Αποτελέσματα από την χρήση του Anchor εκκινητή..... | 45 |
| 4.5.1. | Sabin 1 [10^6] TCID ₅₀ | 45 |
| 4.5.2. | Echo 12 [10^6] TCID ₅₀ | 46 |
| 4.6. | Αποτελέσματα Nested-PCR..... | 46 |
| 4.7. | Συγκεντρικά..... | 47 |
| 5. | ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 54 |
| 6. | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 59 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στην οικογένεια Picornaviridae και στο γένος Enterovirus. Το γονιδίωμα των εντεροϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας (+ssRNA), μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Τα μέλη αυτής της οικογένειας είναι ιοί χωρίς φάκελο, ενώ το γονιδίωμα τους περιβάλλεται από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας. Στην οικογένεια Picornaviridae, πέραν των εντεροϊών συμπεριλαμβάνονται και άλλοι παθογόνοι ιοί των ανθρώπων και των θηλαστικών, όπως ο ιός της ηπατίτιδας Α, ο ιός της πολιομυελίτιδας, ο ρινοϊός, ο εντεροϊός 71 καθώς και ο FMDV (foot-and-mouth disease virus). Το όνομα της οικογένειας αυτής είναι σύνθετο, υποδηλώνοντας το μικρό μέγεθος των ιών που την απαρτίζουν (rico) αλλά και τον τύπο του νουκλεϊκού οξέος το οποίο αποτελεί το ιικό γονιδίωμα (RNA) (Knipe et al., 2013).

1.1. Ταξινόμηση των εντεροϊών

Η οικογένεια των Picorna ιών αποτελείται από 35 γένη και 80 διακριτά είδη σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των ιών (International Committee of Taxonomy of viruses, ICTV) (Zell et al., 2017).

| | | | | | | |
|----------------|-------------|-------------|--------------|---------------|-------------|-------------|
| Ampivirus | Cardiovirus | Gallivirus | Kunsagivirus | Oscivirus | Rabovirus | Senecavirus |
| Aphthovirus | Cosavirus | Harkavirus | Limnipivirus | Parechovirus | Rosavirus | Sicivirus |
| Aquamavirus | Dicipivirus | Hepatovirus | Megrivirus | Pasivirus | Sakobuvirus | Teschovirus |
| Avihepatovirus | Enterovirus | Hunnivirus | Mischivirus | Passerivirus | Salivirus | Torchivirus |
| Avisivirus | Erbovirus | Kobuvirus | Mosavirus | Potamipivirus | Sapelovirus | Tremovirus |

Πίνακας 1.1.1: Τα 35 γένη των Picorna ιών.

Τα γένη αυτά αποτελούνται από αντιγονικά διακριτά στελέχη, τα οποία διακρίνονται με βάση τις ομοιότητες που φέρουν όσον αφορά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοσώματος καθώς και την αλληλουχία και την οργάνωση του ιϊκού γονιδιώματος. (Knipe et al., 2013).

Αναφορικά με τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη της οικογένειας Picornaviridae στον άνθρωπο, οι εντεροϊοί είναι το πιο σημαντικό μέλος. Οι εντεροϊοί αποτελούνταν από μέλη που κατατάσσονταν στις εξής 4 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 1-6). Ωστόσο με την εξέλιξη του συστήματος ταξινόμησης οι εντεροϊοί χωρίστηκαν σε 12 διακριτά είδη με πολλαπλούς ορότυπους ο καθένας (Knipe et al., 2013).

| Είδος εντεροϊών | Ορότυποι |
|-----------------|----------|
| Enterovirus A | 25 |
| Enterovirus B | 61 |
| Enterovirus C | 23 |
| Enterovirus D | 5 |
| Enterovirus E | 4 |
| Enterovirus F | 6 |
| Enterovirus G | 11 |
| Enterovirus H | 1 |
| Enterovirus J | 6 |
| Rhinovirus A | 80 |
| Rhinovirus B | 32 |
| Rhinovirus C | 54 |

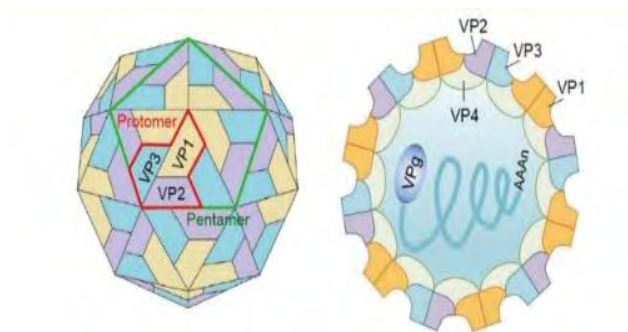
Πίνακας 1.1.2: Τα είδη των εντεροϊών και οι αντίστοιχοι ορότυποι τους.

Κάθε ορότυπος σχετίζεται με την ανοσολογική απόκριση του ξενιστή, την προστασία από την ασθένεια, την χρήση υποδοχέων και σε μικρότερη κλίμακα από το φάσμα της κλινικής νόσου. Αυτοί οι συσχετισμοί όμως έχουν μόνο μερική σχέση με την αρχική ταξινόμηση των εντεροϊών σε πολιοϊούς, ιούς Coxsackie A και B και Echo. Η αρχική ταξινόμηση βασίστηκε 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). Μεταξύ των ομάδων αυτών οι ιοί μπορούν να ξεχωρίσουν βάσει της αντιγονικότητας τους, όπως αυτή προσδιορίζεται με τη βοήθεια αντι-ορών (Knipe et al., 2013).

Αυτές οι αντιγονικές ομαδοποιήσεις που προσδιορίζουν τον ορότυπο έγιναν περισσότερο πολύπλοκες καθώς αυξάνονταν ο αριθμός των διαφορετικών ιών. Η διάκριση μεταξύ των οροτύπων άρχισε να περιπλέκεται καθώς ανακαλύπτονταν ιοί που σχετίζονταν ελάχιστα αντιγονικά με γνωστούς ορότυπους. Παρά τους περιορισμούς αυτούς ο ορότυπος παραμένει μια ιδιότητα που διαχωρίζει τους διαφορετικούς εντεροϊούς. 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 (Knipe et al., 2013).

1.2. Δομή και αντιγονικότητα των ιϊκών σωματιδίων



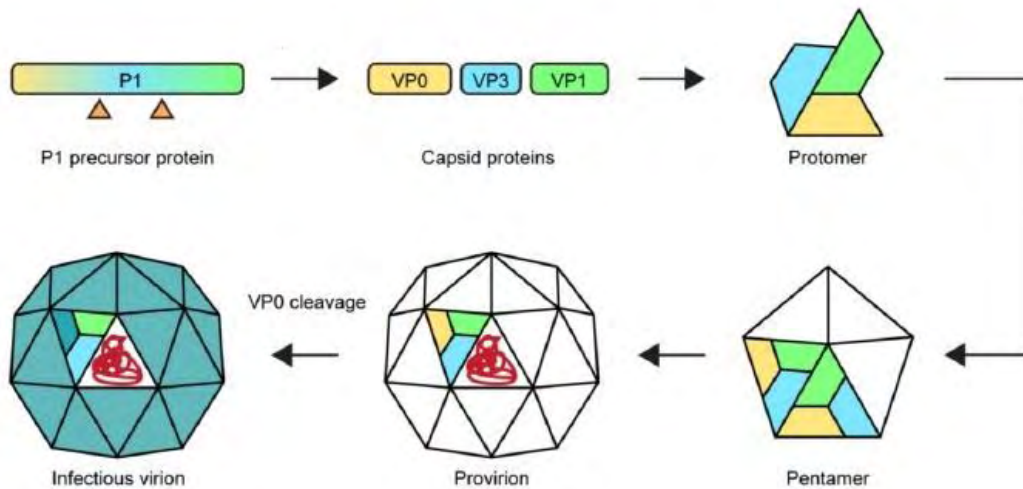
Εικόνα 1.2.1: Δομή ιοσωματίου εντεροϊού (Eun-Je Yi, 2017)

Τα ιοσωμάτια των εντεροϊών είναι σφαιρικά με διάμετρο περίπου 30 nm. Είναι απλά αφού αποτελούνται από πρωτεϊνικό περίβλημα που περιβάλλει το γυμνό RNA (Racaniello, 2013). Τα ιοσωμάτια δεν διαθέτουν λιπιδικό έλυτρο και η μολυσματικότητα τους

είναι μικρή σε οργανικούς διαλύτες. Ένα γεγονός που χαρακτηρίζει τους εντεροϊούς είναι η σταθερότητα που εμφανίζουν σε όξινο περιβάλλον, καθώς διατηρούν την μολυσματικότητα τους σε τιμές pH:3 και μικρότερες (Melnick, 1996).

Τα καψίδια των εντεροϊών χαρακτηρίζονται από εικοσαεδρική συμμετρία και απαρτίζονται από τέσσερις δομικές πρωτεΐνες: VP1, VP2, VP3 και VP4 (Knipe et al., 2013). Σύμφωνα με τις μελέτες των Caspar και Klug όσον αφορά τις αρχές δόμησης των ιών, ο καλύτερος τρόπος για να συναρμολογηθεί ένα κέλυφος με μη ταυτόσημες υπομονάδες είναι η συναρμολόγηση των πρωτεϊνών με εικοσαεδρική συμμετρία (Caspar & Klug, 1962). Ένα εικοσάεδρο είναι ένα στερεό σώμα αποτελούμενο από είκοσι τριγωνικές πλευρές και 12 κορυφές. Ο μικρότερος αριθμός υπομονάδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι 60. Το καψίδιο των εντεροϊών χαρακτηρίζεται από την παρουσία τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής άξονας συμμετρίας (5X), ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) άξονας και ο διμερής (2X) άξονας. Μέσω μελετών περίθλασης ακτίνων X, ηλεκτρονικού μικροσκοπίου και βιοχημικών μελετών προέκυψε πως τα καψίδια των εντεροϊών αποτελούνται από 60 δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες διατάσσονται σε εικοσαεδρική δομή (Rueckert et al., 1969).

Το πρωτομερές P1 αποτελεί το βασικό δομικό λίθο για την συναρμολόγηση του καψιδίου των εντεροϊών και περιέχει ένα αντίγραφο από κάθε δομική πρωτεΐνη VP1, VP2, VP3 και VP4. Η VP1, η VP2 και η VP3 σχηματίζουν το κέλυφος ενώ η VP4 βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια (Stanway, 1990). Οι δομικές πρωτεΐνες VP1, VP3 και η VP0 (η οποία αποτελεί πρόδρομη των VP2 και VP4) συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν ένα πρωτομερές. Ακολούθως από την ένωση πέντε πρωτομερών προκύπτει ένα πενταμερές με αποτέλεσμα τον σχηματισμό του προκαψιδίου από την συνένωση δώδεκα πενταμερών. Το τελευταίο στάδιο για την παραγωγή ενός μολυσματικού ιϊκού σωματιδίου είναι η ωρίμανση του ισώματος που επιτυγχάνεται με την διάσπαση της VP0 σε VP2 και VP4 (van der Linden et al., 2015).



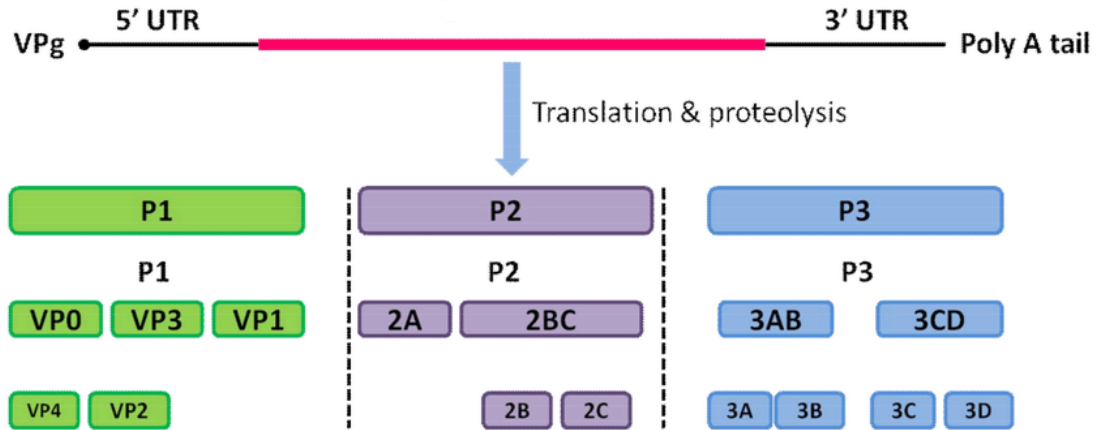
Εικόνα 1.2.2: Συναρμολόγηση του καψιδίου (van der Linden et al., 2015)

1.3. Οργάνωση του γενώματος των εντεροϊών

Το γονιδίωμα των εντεροϊών έχει μήκος περίπου 7.500 bp και αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας. Το γεγονός αυτό συνεπάγεται πως μετά την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή το γονιδίωμα του ιού λειτουργεί απευθείας ως mRNA το οποίο μεταφράζεται στο κυτταρόπλασμα με σκοπό την παραγωγή των ιικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την αναπαραγωγή του ιού (Knipe et al., 2013).

Το γονιδίωμα των εντεροϊών χωρίζεται στα εξής τμήματα: μια 5' μη κωδική περιοχή (5' UTR), ένα μοναδικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), μια 3' μη κωδική περιοχή (3' UTR) και την poly(A) ουρά (μια πολυαδενυλιωμένη περιοχή) (Knipe et al., 2013). Το RNA των εντεροϊών, σε αντίθεση με τα κυτταρικά mRNAs, δεν διαθέτει καλύπτρα στο 5' άκρο γεγονός που αποτελεί ένα μοναδικό γνώρισμα του γενώματος των ιών αυτών (Pelletier et al., 1988). Εντούτοις, το 5' άκρο του RNA είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη VPg (Virion Protein, genome-linked) (Lee et al., 1977; Lanegan et al., 1977). Η VPg διαφέρει μεταξύ των εντεροϊών και το μήκος της ποικίλλει από 22 έως 24 αμινοξικά κατάλοιπα. Η πρωτεΐνη VPg δεν απαιτείται για την μολυσματικότητα του ιικού RNA. Ο ρόλος της έγκειται στην

έναρξη της σύνθεσης του RNA αφού λειτουργεί ως εκκινητής της μεταγραφής (Nomoto et al., 1977; Pettersson et al., 1978).



Εικόνα 1.3.1: Οργάνωση του γονιδιώματος των εντεροϊών (Jin et al., 2018)

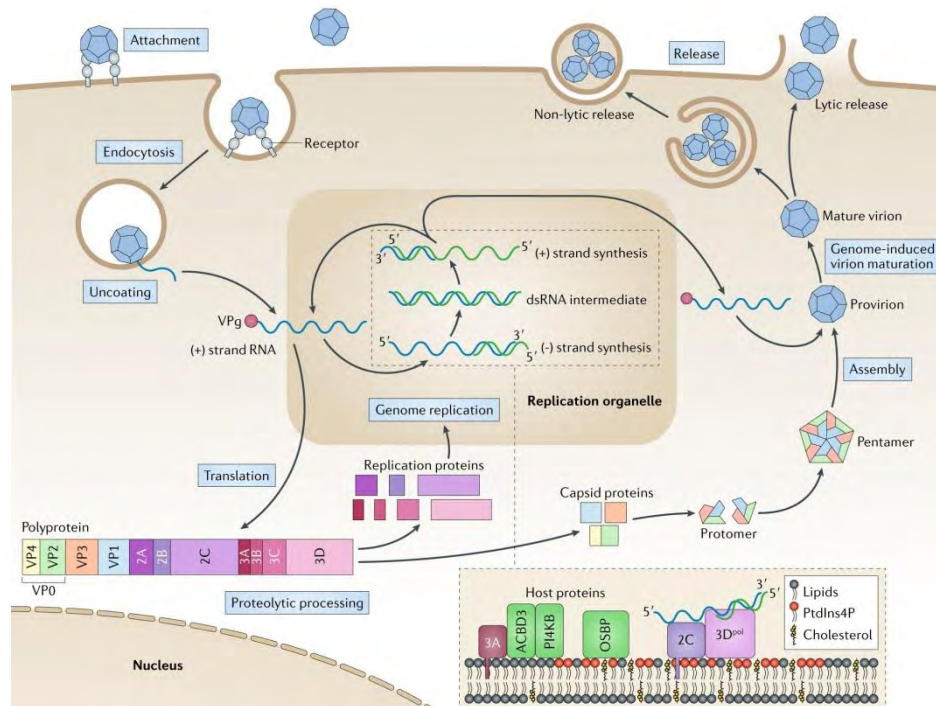
- Η 5' UTR των εντεροϊών είναι μακριά και υψηλά δομημένη. Αυτή η περιοχή του γονιδιώματος περιέχει αλληλουχίες που ελέγχουν τις διαδικασίες της αντιγραφής και της μετάφρασης. Στην περιοχή αυτή επίσης βρίσκεται μια εσωτερική θέση πρόσδεσης στα ριβοσώματα (Internal Ribosomal Entry Site – IRES) που χρησιμοποιείται ως εκκινητής της μετάφρασης έτσι ώστε η διαδικασία αυτή να πραγματοποιείται με έναν τρόπο ανεξάρτητο από την καλύπτρα (cap-independent) (Racaniello, 2013).
- Η 3' UTR είναι μικρή και επίσης φέρει μια δευτεροταγή δομή που εμπλέκεται στον έλεγχο της σύνθεσης του ιϊκού RNA (Jacobson S.J. et al., 1993). Η περιοχή αυτή είναι απαραίτητη για την φυσιολογική αντιγραφή του ιϊκού RNA και αποτελεί το σημείο έναρξης της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Oberste M.S., 2006). Ωστόσο, δεν απαιτείται ολόκληρη η 3' UTR για την μόλυνση των κυττάρων του ξενιστή (Brown et al., 2005; Todd et al., 1997).
- Το γονιδίωμα των εντεροϊών περιέχει ένα μοναδικό, μεγάλο πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) το οποίο κωδικοποιεί για μια μοναδική πολυπρωτεΐνη, η

οποία στην συνέχεια υφίσταται επεξεργασία για την παραγωγή όλων των απαραίτητων δομικών και λειτουργικών ιϊκών πρωτεϊνών (Summers et al., 1968). Η πολυπρωτεΐνη χωρίζεται σε τρεις επιμέρους περιοχές: P1, P2 και P3. Η περιοχή P1 κωδικοποιεί για τις καψιδιακές πρωτεΐνες του ιού, ενώ οι περιοχές P2 και P3 περιέχουν την πληροφορία που είναι απαραίτητη για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην περαιτέρω πρωτεϊνική επεξεργασία (2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro}) καθώς και στην αντιγραφή του γενώματος (2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol}) (Knipe et al., 2013).

1.4. Κύκλος ζωής των εντεροϊών.

Οι εντεροϊοί ολοκληρώνουν τον κύκλο ζωής τους στο κυτταρόπλασμα. Το πρώτο βήμα στον κύκλο ζωής αποτελεί η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή (Bergelson, 2010). Έπειτα πραγματοποιείται η είσοδος του ιού στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύττωσης (Levy et al., 2010). Ακολουθεί, η διαδικασία της απέκδυσης κατά την οποία το ιϊκό γένωμα απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα λόγω δομικών αλλαγών στο καψίδιο (Tuthill et al., 2010). Μετά την απελευθέρωση του, το ιϊκό RNA, το οποίο είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, λειτουργεί απευθείας ως mRNA και μεταφράζεται από τα κυτταρικά ριβοσώματα (Wimmer et al., 1993). Μετά το πέρας της μετάφρασης, παράγεται μια μοναδική πολυπρωτεΐνη η οποία στην συνέχεια τεμαχίζεται για να παραχθούν όλες οι δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού (Leong et al., 2002). Μεταξύ των πρωτεϊνών που παράγονται, βρίσκεται και η ιϊκή RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση η οποία καταλύει την αντιγραφή του ιού (Baltimore et al., 1963). Απαραίτητη προϋπόθεση για την έναρξη της αντιγραφής του ιού είναι η μετατροπή του γονιδιώματος του σε ενδιάμεσο μονόκλωνο μόριο RNA αρνητικής πολικότητας. Αυτό το ενδιάμεσο μόριο RNA στην συνέχεια αποτελεί μήτρα για την σύνθεση πολλών μορίων RNA αρνητικής πολικότητας. Ένα μέρος των νεοσυντιθέμενων μορίων RNA θετικής πολικότητας θα λειτουργήσει ως mRNA για την διαδικασία της μετάφρασης και για την παραγωγή των ιϊκών πρωτεϊνών και ένα μέρος αυτών θα αποτελέσει τα νέα γονιδιώματα που θα ενσωματωθούν σε καψίδια (Kirkegaard et

al., 2010). Τα νέα ώριμα πλέον ιικά σωματίδια θα απελευθερωθούν από το κύτταρο ξενιστή μέσω λύσης του κυττάρου (Jackson et al., 2005).



Εικόνα 1.4.1: Κύκλος ζωής εντεροϊών (Baggen et al., 2018).

1.5. Παθογένεια

Η είσοδος του εντεροϊού επιτελείται κυρίως από το στόμα ενώ η μόλυνση ξεκινά από το πεπτικό σύστημα. Αρχικά ο ιός μολύνει τους βλεννογόνους ιστούς του φάρυγγα και του εντέρου και ακολουθεί έπειτα η μόλυνση των τοπικών λεμφαδένων. Σε αυτό το στάδιο λαμβάνει χώρα ο αρχικός πολλαπλασιασμός του ιού. Επόμενο βήμα είναι η είσοδος του ιού στην κυκλοφορία του αίματος (ιαιμία) όπου και παρατηρείται περαιτέρω πολλαπλασιασμός του ιού στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος ο ιός τελικά μπορεί να μεταφερθεί στο όργανο-στόχο (Melnick et al., 1990).

Η περίοδος επώασης του ιού, δηλαδή ο χρόνος που μεσολαβεί από την είσοδο του ιού στο σώμα μέχρι την εκδήλωση της ασθένειας είναι περίπου 7-14

ημέρες αλλά σε ακραίες περιπτώσεις ενδέχεται να κυμαίνεται από 2-35 ημέρες. Μετά την μόλυνση ο ιός εκκρίνεται στα κόπρανα για 8 εβδομάδες και είναι παρών στο φάρυγγα για 1-2 εβδομάδες. Σε άτομα που έχουν μολυνθεί με εντεροϊό είναι δυνατή η απομόνωση του ιού, εκτός από τα κόπρανα και τα φαρυγγικά επιχρίσματα, από εγκεφαλονωτιαίο υγρό, από το νωτιαίο μυελό, από τον εγκέφαλο, από την καρδιά, από τον επιπεφυκότα ακόμα και από πληγές του δέρματος ή βλεννώδεις μεμβράνες των ασθενών (Melnick et al., 1990).

Οι κλινικές εκδηλώσεις της μόλυνσης με εντεροϊό ποικίλλουν από ασυμπτωματικές μολύνσεις (κοινό κρυολόγημα) μέχρι την εκδήλωση σοβαρών ασθενειών όπως της πολιομυελίτιδας ή ακόμα και την εμφάνιση άσηπτης μηνιγγίτιδας, μυοκαρδίτιδας, εγκεφαλοπάθειας και χαλαρής παράλυσης. Η έκβαση της κλινικής εικόνας έπειτα από μια μόλυνση με εντεροϊό σχετίζεται με την ηλικία αλλά και το ανοσολογικό επίπεδο του ασθενούς (Melnick et al., 1990; Palacios et al., 2005).

1.6. Μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών

Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί εξέλιξης των εντεροϊών: α) οι μεταλλάξεις και β) ο μοριακός ανασυνδυασμός. Και οι δύο αυτοί μηχανισμοί οδηγούν σε μεγάλη ποικιλομορφία ανάμεσα στους ιούς και συμβάλλουν στην εξέλιξη τους (Domingo et al., 1997).

1.6.1. Μεταλλάξεις

Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του ιϊκού RNA λαμβάνει χώρα μεγάλος αριθμός μεταλλάξεων. Αιτίες για το φαινόμενο αυτό αποτελούν: i) η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση του ιού η οποία είναι επιρρεπής σε λάθη και μάλιστα υπολογίζεται πως η συχνότητα λαθών ανέρχεται στο 1 στα 10^3 έως 10^4 νουκλεοτίδια και ii) η απουσία επιδιορθωτικών μηχανισμών (Wimmer et al., 1993).

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις που παρατηρούνται είναι οι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις (μεταπτώσεις και μεταστροφές). Μεταξύ αυτών το 80% των

μεταλλάξεων αφορά μεταπτώσεις (αντικατάσταση πουρίνης από πουρίνη ή πυριμιδίνης από πυριμιδίνη) ενώ μόνο το 20% αφορά μεταστροφές (αντικατάσταση πουρίνης από πυριμιδίνη ή το αντίθετο). Άλλες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί εμφανίζονται πιο σπάνια (Figlerowicz et al., 2003).

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γονιδιώματος των εντεροϊών αποτελεί ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης που παρουσιάζουν οι διάφορες περιοχές του. Οι περιοχές που χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων και ως εκ τούτου είναι και πιο ευμετάβλητες είναι οι κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3. Οι περιοχές αυτές συσσωρεύουν πολλές μεταλλάξεις λόγω της αντιγονικής πίεσης που δέχονται. Το αποτέλεσμα είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή. Υπάρχουν όμως κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις μεταλλάξεις που απαντώνται σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν οι περιοχές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ιικών ενζύμων. Οι περιοχές αυτές δεν εκτίθενται στο εξωτερικό του καψιδίου και επομένως ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης και διατηρούν την αλληλουχία τους (Lukashev et al., 2003).

1.6.2. Ανασυνδυασμός

Ο ανασυνδυασμός αποτελεί ισχυρό μηχανισμό εξέλιξης και κατέχει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών καθώς μπορεί να μεταφέρει έναν ορισμένο αριθμό ιδιοτήτων σε έναν ιό με ένα και μόνο γεγονός (Guillot et al., 2000). Λόγω του ανασυνδυασμού ευνοείται η εξάλειψη των δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την αντιγραφή των ιών επιτρέπεται η διατήρηση του γενοτύπου αγρίου τύπου. Ένα ακόμη αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού είναι η δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση. Απόρροια του ανασυνδυασμού επίσης αποτελεί η επιτάχυνση της εξέλιξης μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου ή ακόμα και διαφορετικών οροτύπων (Kottaridi et al., 2007; Dedepsidis et al., 2008).

Ο βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου επιτελείται ανασυνδυασμός είναι ο αντιγραφικός μηχανισμός ή αλλιώς μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό η πολυμεράση αλλάζει μήτρα κατά την διάρκεια σύνθεσης του αρνητικού κλώνου αν συναντήσει κάποιο εμπόδιο όπως μια δευτεροταγή δομή φουρκέτας ή ένα λάθος ενσωματωμένο νουκλεοτίδιο (Romanova et al., 1986; Pilipenko et al., 1995). Το αποτέλεσμα αυτού του μηχανισμού είναι η δημιουργία χμαιρικών μορίων (Kirkegaard et al., 1986).

Ένας ακόμη μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται ανασυνδυασμός είναι ο μη αντιγραφικός μηχανισμός μέσω θραύσης και επανασύνδεσης. Ωστόσο ο μηχανισμός αυτός είναι πιο σπάνιος και διεξάγεται μόνο σε DNA και RNA ιούς των οποίων η αντιγραφή επιτυγχάνεται με ενδιάμεσο μόριο DNA (Agol et al., 1997).

1.7. Εμβόλια κατά των εντεροϊών

1.7.1. IPV

Πρόκειται για το αδρανοποιημένο εμβόλιο (inactivated polio vaccine) το οποίο παράγεται από την μετατροπή των άγριων παθογόνων στελεχών σε μη μολυσματικά έπειτα από επεξεργασία τους με φορμαλδεΐδη. Το εμβόλιο αυτό είναι ασφαλές και μπορεί να προσφέρει ένα ικανοποιητικό ανοσολογικό επίπεδο στα εμβολιασμένα άτομα εφόσον εφαρμόζεται σε επαναληπτικές ανοσοποιήσεις. Ένα πλεονέκτημα του IPV είναι ότι μπορεί να χορηγηθεί ακόμα και σε ανοσοανεπαρκή ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Ανάμεσα στα μειονεκτήματα που παρουσιάζει το IPV βρίσκονται το υψηλό κόστος παραγωγής του, η ανεπαρκή τοπική ανοσία που επάγει καθώς και τα αυστηρά εργαστηριακά κριτήρια αδρανοποίησης που θα πρέπει να εφαρμόζονται ώστε να μην προκύπτουν προβλήματα, αφού για την παραγωγή του εμβολίου αυτού χρησιμοποιούνται στελέχη αγρίου τύπου (Blondel et al., 1998).

1.7.2. OPV

Το OPV (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών τα οποία προέκυψαν από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo*. Στα εξασθενημένα στελέχη ο ιός καθίσταται λιγότερο ικανός να προκαλεί την ασθένεια (Friedrich, 1996). Το OPV παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με το IPV. Πρώτα από όλα, επάγει ένα ιδιαίτερα ικανοποιητικό επίπεδο τοπικής, κυτταρικής και χυμικής ανοσίας καθώς παράγονται αντισώματα έναντι σχεδόν όλων των αντιγονικών επίτοπων. Ακόμη, σε αντίθεση με το IPV το OPV δεν απαιτεί επαναληπτικές δόσεις και η διαδικασία παραγωγής του έχει μικρό κόστος. Επιπρόσθετα, ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα του εμβολίου αυτού είναι η ευρύτερη ανοσοποίηση που προσφέρει λόγω της εξάπλωσης των ζωντανών εξασθενημένων στελεχών του εμβολίου από τα εμβολιασμένα άτομα στο άμεσα στενό οικογενειακό τους περιβάλλον (Dowdle et al., 2003). Παρόλα αυτά το OPV εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι το γεγονός πως δεν είναι δυνατή η χορήγηση του σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Επιπλέον, εφόσον πρόκειται για ένα ζωντανό στέλεχος υπάρχει ο κίνδυνος να μεταλλαχθεί και να οδηγήσει σε εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα αλλά και να οδηγήσει στην εμφάνιση εμβολιο-προερχόμενων μολυσματικών στελεχών προκαλώντας έτσι πιο γρήγορη εξάπλωση και νέα κρούσματα (Bandyopadhyay et al., 2015).

1.8. Επιδημιολογία

Με την βοήθεια μελετών μοριακής παραλλαγής ιικών πρωτεϊνών ή νουκλεϊκών οξέων οδηγούμαστε σε σημαντικές επιδημιολογικές πληροφορίες για ιογενείς ασθένειες. Οι μοριακές επιδημιολογικές μελέτες έχουν συνεισφέρει στην κατανόηση των εντεροϊών. Χάρη στις μελέτες αυτές είναι δυνατή η ακριβής ταυτοποίηση στελεχών, η κατάταξη και η ταξινόμηση των εντεροϊών καθώς και η εξακρίβωση της προέλευσης των κρουσμάτων (Pallansch et al., 2013).

Η κύρια επιδημιολογική μέθοδος που αξιοποιείται για την ανάλυση της γενετικής παραλλαγής των εντεροϊών είναι η αλληλούχηση. Η εφαρμογή αυτής της

τεχνικής στην μελέτη στελεχών αγρίου τύπου που έχουν απομονωθεί από διαφορετικές περιοχές του κόσμου αποτελεί ισχυρό εργαλείο στις μοριακές επιδημιολογικές μελέτες (Rico-Hesse et al., 1987).

Η αλληλούχηση έχει αποδειχθεί πολύτιμη για την υποστήριξη του παγκόσμιου προγράμματος εξάλειψης των πολιοϊών (Kew et al., 1993; Kew et al., 1995). Από τις μελέτες αυτές είναι δυνατόν να προσδιοριστεί α) εάν ένα απομονωμένο στέλεχος πολιοϊού σχετίζεται με τον ιό του εμβολίου, β) ομοιότητες μεταξύ των στελεχών σε μια επιδημία, γ) διαφορές μεταξύ των απομονώσεων από διαφορετικές περιοχές. Συγκρίνοντας τις διαφορές μεταξύ των διάφορων στελεχών είναι εφικτός ο προσδιορισμός της γεωγραφικής και χρονικής προέλευσης τους (Lipskaya et al., 1995; Mulders et al., 1995; Zheng et al., 1993).

2. ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν αρχικά η επιλογή και σχεδιασμός κατάλληλων εκκινητικών μορίων που υβριδίζονται σε διάφορες θέσεις στο γονιδίωμα των εντεροϊών. Χρησιμοποιώντας αυτούς τους εκκινητές εκτελέστηκαν διάφορες RT-PCR αντιδράσεις, με σκοπό τη μελέτη της θερμικής αδρανοποίησης στελεχών εντεροϊών, αλλά και την ανίχνευση πιθανών θέσεων ρήξεως του γονιδιώματος λόγω της θερμικής αδρανοποίησης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Πρότυπα στελέχη

Κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 σε συγκεντρώσεις 10 και 10^6 TCID₅₀ και το πρότυπο στέλεχος Echo 12 σε συγκεντρώσεις 10 και 10^6 TCID₅₀. Το εμβολιακό στέλεχος Sabin 1 ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας C ενώ το στέλεχος Echo 12 ανήκει στους εντεροϊούς της ομάδας B. Τα στελέχη αυτά απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα.

| Δείγμα | Στέλεχος | Αριθμός καταχώρησης |
|---------|----------|---------------------|
| Sabin 1 | LSc, 2ab | V01150 |
| Echo 12 | Travis | X79047 |

Πίνακας 3.1.1: Πρότυπα στελέχη εντεροϊών.

3.2. Καλλιέργεια των ιών

Αρχικά, ενοφθαλμίστηκαν 100μl από κάθε πρότυπο στέλεχος σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιιεργειών που περιείχαν κύτταρα Rd (κυτταρική σειρά ραβδομυοσαρκώματος) παρουσία θρεπτικού υλικού D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) με 2% ορό. Οι φιάλες επώαστηκαν στους 37° C μέχρι την εμφάνιση κυτταροπαθογόνου δράσης του ιού (CPE). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν και φιάλες που περιείχαν κύτταρα Rd μη μολυσμένα με ιό, ως μάρτυρες. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν αρκετές ανακαλλιέργειες του ιού με σκοπό την αύξηση του ιϊκού τίτλου έως ότου εμφανιστεί πλήρης καταστροφή των κυττάρων 24 ώρες μετά την μόλυνση. Τέλος, οι πλαστικές φιάλες διατηρήθηκαν στους -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί το επόμενο στάδιο της μέτρησης του ιϊκού τίτλου.

3.3. Μέτρηση του ιϊκού τίτλου

Με τον όρο ιϊκός τίτλος αναφερόμαστε στον αριθμό των ιϊκών σωματιδίων που βρίσκονται σε 100μl του ιϊκού δείγματος. Η μέτρηση του ιϊκού τίτλου γίνεται με τον υπολογισμό της τιμής TCID₅₀. Το μέγεθος αυτό αντιστοιχεί στην ποσότητα του ιού που είναι απαραίτητη για να προκαλέσει κυτταρικές αλλοιώσεις στο 50% των κυττάρων μιας κυτταροκαλλιέργειας. Ο τύπος μέσω του οποίου υπολογίστηκε ο ιϊκός τίτλος είναι:

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

Όπου:

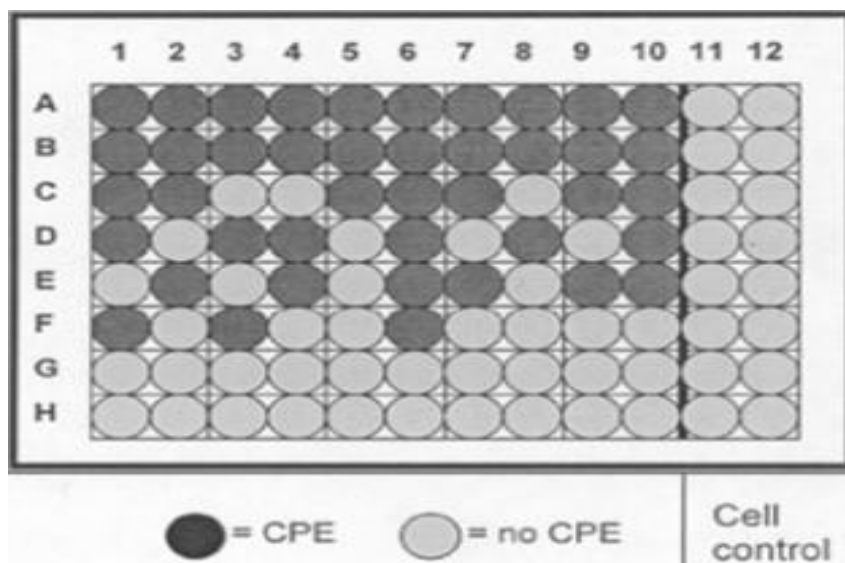
TCID₅₀: Tissue Culture Infective Dose

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 επόμενη μέρα αφού τα κύτταρα προσκολλήθηκαν στην πλάκα, για κάθε ιϊκό δείγμα έγιναν σειριακές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως την αραιώση 10⁻⁸. Ακολούθως, 100μl από την αντίστοιχη αραιώση ενοφθαλμίστηκαν στην πλάκα και η πλάκα τοποθετήθηκε για επώαση στους 37° C. Η πλάκα παρακολουθούνταν για εμφάνιση πλήρους κυτταροπαθογόνου δράσης καθημερινά μέχρι την παρατήρηση καταστροφής των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του TCID₅₀ με την βοήθεια του τύπου που αναγράφεται παραπάνω.



Εικόνα 3.3.1: Πλάκα μικροτιτλοποίησης για τον υπολογισμό $TCID_{50}$. Οριζόντια τοποθετούνται οι σειριακές αραιώσεις με την αραιώση 10^{-1} να αντιστοιχεί στην γραμμή A και την αραιώση 10^{-8} να αντιστοιχεί στην γραμμή H. Οι δύο τελευταίες στήλες αντιστοιχούν στον αρνητικό μάρτυρα της αντίδρασης.

3.4. Σειριακές αραιώσεις

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις για την απόκτηση δύο συγκεντρώσεων από κάθε στέλεχος, μιας υψηλής της τάξης του 10^6 $TCID_{50}$ και μιας χαμηλής της τάξης του 10 $TCID_{50}$.

3.5. Αδρανοποίηση του ιού

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιήθηκαν οι αδρανοποιήσεις του ιού με επώαση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή για μισή ώρα. Κατά την διάρκεια της επώασης εκτελέστηκαν vortex ανά 10 λεπτά έτσι ώστε να διασπαστούν τυχόν συσσωματώματα ιικών σωματιδίων. Οι θερμοκρασίες στις οποίες επώαστηκαν τα δείγματα ήταν οι εξής: α) για τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 με συγκέντρωση 10^6 $TCID_{50}$: $55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$, $65^{\circ}C$, $70^{\circ}C$, $75^{\circ}C$, $80^{\circ}C$, $82^{\circ}C$, ενώ για τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 με συγκέντρωση 10 $TCID_{50}$: $45^{\circ}C$, $50^{\circ}C$, $55^{\circ}C$, $60^{\circ}C$ και $65^{\circ}C$.

Αμέσως μετά την αδρανοποίηση του ιού ακολούθησε εκχύλιση του γενετικού υλικού χωρίς την μεσολάβηση μόλυνσης κυττάρων.

3.6. Εκχύλιση του ιϊκού RNA

Η εκχύλιση του γενετικού υλικού (RNA) του ιού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα, σε erpendorf των 2 ml τοποθετήθηκαν 300 μl Lysis Buffer, το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN (θειοκυανιούχο γουανιδίνη), 0,5% N-lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate. Επίσης προστέθηκαν 10μl γλυκογόνου (100mg/ml) και τέλος 100μl δείγματος. Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση (vortex) και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Εν συνεχεία, προστέθηκαν 400μl ισοπροπανόλης (-20° C) και ακολούθησε ξανά vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Αμέσως μετά την επώαση έγινε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000 rcf και έπειτα απομακρύνθηκε το υπερκείμενο. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκαν 500μl αιθανόλης 70% και έπειτα ακολούθησε vortex για την διαλυτοποίηση του ιζήματος και πάλι φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000 rcf. Τέλος, το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100μl διπλά απεσταγμένου ύδατος (ddH₂O). Τα erpendorf παρέμειναν στους -20° C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της αντίστροφης μεταγραφής.

3.7. Εκκινητές

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία σχεδιάστηκαν μέσω του προγράμματος Primer Explorer με βάση τα εξής κριτήρια:

- μήκος εκκινητών από 20 έως 22 βάσεις
- σημείο τήξης (Tm) από 56° C έως 63° C
- ποσοστό σε GC από 50% έως 60%

Από τα ζεύγη εκκινητών που προέκυψαν επιλέχθηκαν εκείνα που εμφάνιζαν την μικρότερη συμπληρωματικότητα τόσο στα άκρα όσο και σε ολόκληρο το μήκος τους, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία διμερών μεταξύ των εκκινητών και δομών φουρκέτας, φαινόμενο που παρεμποδίζει την διαδικασία της PCR.

| Αριθμός | Όνομα | Αλληλουχία (5' → 3') | Πολικότητα | Tm | Γενωμική Περιοχή | Θέση |
|---------|---------------|--|------------|-------|------------------|------|
| 1 | UG52 | CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG | Sense | 61,8 | 5'UTR | 162 |
| 2 | UC53 | TGTTCACCATAACCAGCCA | Antisense | 56,4 | 5'UTR | 577 |
| 3 | SAB1-3CF1 | CCCACCATTAGGACAGCAAA | Sense | 60,88 | 3C | 5448 |
| 4 | SAB1-3CR1 | CTGGATTTACCTTGA | Antisense | 59,33 | 3C | 6035 |
| 5 | SAB1-3DF2 | CAACCTCCCCTGGTGA | Sense | 60 | 3D | 6452 |
| 6 | SAB1-3DR2 | TCTCGTCTGCCCTGAAGAAT | Antisense | 59,95 | 3D | 7149 |
| 7 | ECHO12P3-CF1 | GTGCCACTCTGAGACAAGC | Sense | 61,02 | 3C | 5401 |
| 8 | ECHO12P3-CR1 | CCTAAGAAGAGCAGCGGAGA | Antisense | 59,85 | 3C | 5958 |
| 9 | ECHO12P3-DF2 | AAGGCAATAAAGAGCCAGCA | Sense | 59,98 | 3D | 6052 |
| 10 | ECHO12P3-DR2 | AGGTGGCCGTCTAACATCAC | Antisense | 60 | 3D | 6634 |
| 11 | ECHO12P3-DR3 | TGAAGCTGGGAAGGGTTATG | Sense | 60,07 | 3D | 6983 |
| 12 | ECHO12P3-DF3 | CAAGCCAATAAGCACACGCA | Antisense | 59,87 | 3D | 7216 |
| 13 | Anchor dT | GACCACGCGTATCGATGTCGAC TTTTTTTTTTTTTTTTTV | Antisense | 72 | Poly (A) | 7461 |
| 14 | Anchor Primer | GACCACGCGTATCGATGTCGAC | Antisense | 66 | Poly (A) | 7503 |

Πίνακας 3.7.1: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.

Να σημειωθεί πως για τα δείγματα Sabin χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές με την ονομασία SAB1 (δηλαδή: SAB1-3CF1/ SAB1-3CR1 για την ενίσχυση της 3C περιοχής και SAB1-3DF2/ SAB1-3DR2 για την ενίσχυση της 3D περιοχής), ενώ για τα δείγματα Echo χρησιμοποιήθηκαν οι ειδικοί εκκινητές με την ονομασία ECHO12 (δηλαδή: ECHO12P3-CF1/ ECHO12P3-CR1 και ECHO12P3-DF2/ ECHO12P3-DR2 για την στόχευση των περιοχών 3C και 3D αντίστοιχα). Οι εκκινητές UG52/UC53 χρησιμοποιήθηκαν από κοινού για την ενίσχυση της 5'UTR τόσο σε δείγματα Sabin όσο και δείγματα Echo.

3.8. Αντίστροφη Μεταγραφή

Το γενετικό υλικό των εντεροϊών είναι ένα μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Για τον λόγο αυτό η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription – RT) είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να πραγματοποιηθεί στην συνέχεια PCR για την ενίσχυση ενός τμήματος που μας ενδιαφέρει. Κατά την

αντίστροφη μεταγραφή συντίθεται ένα μόριο cDNA που είναι συμπληρωματικό ως προς το RNA το οποίο αποτέλεσε την μήτρα για την παραγωγή του.

Στην συγκεκριμένη μελέτη, ακολουθήθηκαν δύο ξεχωριστές προσεγγίσεις για την διεξαγωγή της αντίστροφης μεταγραφής. Σε μια πρώτη προσέγγιση η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με την χρήση του antisense εκκινητή. Συγκεκριμένα, για κάθε δείγμα διεξήχθησαν 3 διαφορετικές αντιδράσεις RT με την χρήση διαφορετικού antisense εκκινητή στοχεύοντας σε διαφορετική περιοχή κάθε φορά. Οι περιοχές αυτές ήταν η 5' UTR, η 3C και η 3D, για τις οποίες πιθανολογούμε ότι θα είναι ευαίσθητες σε ρήξη. Έτσι, όσον αφορά το στέλεχος Sabin 1 εκτελέστηκαν οι εξής 3 αντιδράσεις αντίστροφης μεταγραφής: μια RT με στόχο την ενίσχυση της 5' UTR με την χρήση του antisense εκκινητή UC53, μια RT με στόχο την ενίσχυση της 3C περιοχής με την χρήση του antisense εκκινητή SAB1-3CR1 και μια RT με στόχο την ενίσχυση της 3D περιοχής με την χρήση του antisense εκκινητή SAB1-3DR2. Αντίστοιχα, για το στέλεχος Echo 12 πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω 3 αντιδράσεις: μια RT με στόχο την ενίσχυση της 5' UTR με την χρήση του antisense εκκινητή UC53, μια RT με στόχο την ενίσχυση της 3C περιοχής με την χρήση του antisense εκκινητή ECHO12P3-CR1 και μια RT με στόχο την ενίσχυση της 3D περιοχής με την χρήση του antisense εκκινητή ECHO12P3-DR2.

Η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 0,5ml με τελικό όγκο αντίδρασης 20μl. Αρχικά, προετοιμάστηκε το μίγμα 1 (M1) το οποίο περιείχε για κάθε αντίδραση:

- 5 pmol από τον antisense εκκινητή
- 4 mM dNTPs
- 4 μl ddH₂O

Κατόπιν προστέθηκαν 7μl από το M1 και 5μl RNA (από την εκχύλιση) σε erpendorf των 0,5ml και ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των δειγμάτων στους 65° C για 5 λεπτά σε θερμοκυκλοποιητή Erpenforf - Mastercycler με σκοπό την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών του RNA.

Αμέσως μετά το πέρας των 5 λεπτών, τα δείγματα τοποθετήθηκαν απευθείας στον πάγο και προετοιμάστηκε το δεύτερο μίγμα (M2).

Το M2 περιείχε για κάθε αντίδραση:

- 1X Fast Gene Buffer
- 1 μM DTT
- 10 U RNase out
- 100 U RT FastGene Scriptase II NIPPON Genetics
- 1 μl ddH₂O

Αφού προστέθηκαν 8μl από το M2 σε κάθε erpendorf πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση των δειγμάτων και έπειτα ακολούθησαν δύο διαδοχικές επωάσεις στις παρακάτω συνθήκες: 50° C για 50 λεπτά (για την σύνθεση του cDNA) και 70° C για 15 λεπτά (για την απενεργοποίηση του ενζύμου). Μοναδική εξαίρεση αποτελεί η χρήση του antisense εκκινητή UC53. Στην περίπτωση αυτή οι δύο διαδοχικές επωάσεις έχουν ως εξής: 42° C για 50 λεπτά και 70° C για 15 λεπτά.

Η δεύτερη προσέγγιση αφορούσε την χρήση του εκκινητή dT anchor για την εκτέλεση της αντίστροφης μεταγραφής. Ο εκκινητής αυτός διαθέτει μια σειρά από θυμίνες (T) με αποτέλεσμα να υβριδίζει πάνω στην πολύ(A) ουρά και να ξεκινά από εκεί την σύνθεση του συμπληρωματικού cDNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την εκτέλεση της αντίστροφης μεταγραφής στην περίπτωση του dT anchor εκκινητή είναι αυτό που περιγράφηκε παραπάνω κατά την χρήση του antisense εκκινητή.

Οι συγκεκριμένες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και για τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία (Sabin 1 και Echo 12) τόσο για την συγκέντρωση 10⁶ όσο και για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀.

3.9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με την αντίδραση της PCR επιτυγχάνεται η ενίσχυση ενός τμήματος του cDNA που ορίζεται από το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που επιλέγονται. Έτσι ανάλογα με τους εκκινητές που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά ενισχύονταν τμήμα από μια συγκεκριμένη περιοχή την οποία στόχευαν οι εκκινητές και τα ενισχυμένα προϊόντα χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση πιθανών ρήξεων στο γονιδίωμα.

3.9.1. PCR για την ανίχνευση πιθανών ρήξεων

Για κάθε ένα από τα δύο στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (Sabin 1 και Echo 12) εκτελέστηκαν 3 αντιδράσεις PCR χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών κάθε φορά που επιτρέπουν την στόχευση των τριών διαφορετικών περιοχών (5' UTR, 3C, 3D) οι οποίες ενδέχεται να υφίστανται ρήξη κατά την διάρκεια της θερμικής αδρανοποίησης. Οι αντιδράσεις αυτές πραγματοποιήθηκαν τόσο στα στελέχη με ιικό τίτλο 10^6 όσο και στα στελέχη με ιικό τίτλο 10 TCID₅₀.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις διάφορες αντιδράσεις PCR παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον ακόλουθο πίνακα:

| Όνομα | Αλληλουχία | Πολικότητα | Περιοχή | Θέση | Tm | Μέγεθος προϊόντος |
|--------------|------------------------|------------|---------|------|-------|-------------------|
| UG52 | CAAGCACTTCTGTTCCTCCCGG | Sense | 5' UTR | 162 | 61,8 | 423bp |
| UC53 | TTGTCACCATAAACCAGCCA | Antisense | 5' UTR | 577 | 56,4 | |
| SAB1-3CF1 | CCCACCAATTAGGACAGCAAA | Sense | 3C | 5448 | 60,88 | 588bp |
| SAB1-3CR1 | CTGGATTTCACCTTGACTCTGA | Antisense | 3C | 6035 | 59,33 | |
| ECHO12P3-CF1 | CAACCTCCCCTGGTACTT | Sense | 3C | 6452 | 60 | 558bp |
| ECHO12P3-CR1 | TCTCGTCTGCCCTGAAGAAT | Antisense | 3C | 7149 | 59,95 | |
| SAB1-3DF2 | GTGCCCACTCTGAGACAAGC | Sense | 3D | 5401 | 61,02 | 698bp |
| SAB1-3DR2 | CCTAAGAAGAGCAGCGGAGA | Antisense | 3D | 5958 | 59,85 | |
| ECHO12P3-DF2 | AAGGCAATAAAGAGCCAGCA | Sense | 3D | 6052 | 59,98 | 583bp |
| ECHO12P3-DR2 | AGGTGGCCGTCTAACATCAC | Antisense | 3D | 6634 | 60 | |

Πίνακας 3.9.1.1: Εκκινητικά ζεύγη που χρησιμοποιήθηκαν για όλες τις αντιδράσεις PCR. Απεικονίζονται η αλληλουχία τους, η πολικότητα του κάθε εκκινητή, η περιοχή που στοχεύει, η θέση υβριδισμού του, το Tm του καθενός καθώς και το μήκος των προϊόντων ανά ζεύγος εκκινητών.

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε σε μικροσωληνάρια των 0,2 ml και σε τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Αρχικά προετοιμάστηκε το μίγμα το οποίο αποτελούνταν από 1 mM dNTPs, 1X KAPA Taq Buffer (στο οποίο περιέχονται ήδη 1,5 mM MgCl₂), 1,5 U ενζύμου KAPA Taq Polymerase, 25 pmol από κάθε εκκινήτη (sense και antisense) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47 μl. Ακολούθως, προστέθηκαν σε κάθε μικροσωληνάριο errendorf 3μl του αντίστοιχου δείγματος cDNA και ακολούθησε επώαση των δειγμάτων σε θερμοκυκλοποιητή Errendorf - Mastercycler στις συνθήκες που αναφέρονται στον πίνακα που ακολουθεί.

| Ζεύγος εκκινήτων | Συνθήκες αντίδρασης PCR | |
|------------------|-------------------------|---|
| | 1 κύκλος | 3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA |
| UG52 / UC53 | 40 κύκλοι | -30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 50° C για τον υβριδισμό των εκκινήτων -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση |
| | 1 κύκλος | 2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων |

| Ζεύγη εκκινήτων | Συνθήκες αντίδρασης PCR | |
|--|-------------------------|---|
| | 1 κύκλος | 3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA |
| -SAB1-3CF1 / SAB1-3CR1 -SAB1-3DF2 / SAB1-3DR2 -ECHO12P3-CF1 / ECHO12P3-CR1 -ECHO12P3-DF2 / ECHO12P3-DR2 | 40 κύκλοι | -30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινήτων -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση |
| | 1 κύκλος | 2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων |

Πίνακας 3.9.1.2: Συνθήκες διεξαγωγής της αντίδρασης PCR ανάλογα με τα ζεύγη εκκινήτων.

3.9.2. Nested-PCR

Πρόκειται για μια μοριακή τεχνική που εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με την απλή PCR. Η Nested-PCR αποτελεί τον συνδυασμό δύο διαδοχικών

PCR. Πιο συγκεκριμένα, τα προϊόντα της πρώτης PCR υποβάλλονται σε μια δεύτερη PCR με την χρήση ενός νέου εσωτερικού ζεύγους εκκινητών αυξάνοντας έτσι την ειδικότητα της μεθόδου. Ωστόσο, το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης ενίσχυσης αυτής της τεχνικής αποτελεί ταυτόχρονα και μειονέκτημα της καθώς παρατηρείται αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης επιμολύνσεων. Έτσι για την μείωση της πιθανότητας εμφάνισης επιμολύνσεων και οι δύο αντιδράσεις PCR εκτελούνται στους 30 κύκλους.

Η διαδικασία αυτή εφαρμόστηκε για το στέλεχος Echo 12 με συγκέντρωση 10^6 TCID₅₀. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη ECHO12P3-DF2/Anchor (PCR προενίσχυσης) και ECHO12P3-DR3/ ECHO12P3-DF3 (δεύτερη PCR).

| Όνομα | Αλληλουχία | Πολικότητα | Περιοχή | Θέση | Tm | Μέγεθος προϊόντος |
|--------------|------------------------|------------|---------|------|-------|-------------------|
| ECHO12P3-DF2 | AAGGCAATAAAGAGCCAGCA | Sense | 3D | 6052 | 59.98 | 1450bp |
| Anchor | GACCACGCGTATCGATGTCGAC | Antisense | 3D | 7500 | 66 | |
| ECHO12P3-DR3 | TGAAGCTGGGAAGGGTTATG | Sense | 3D | 6983 | 60.07 | 234bp |
| ECHO12P3-DF3 | CAAGCCAATAAGCACAACGA | Antisense | 3D | 7216 | 59.87 | |

Πίνακας 3.9.1.3: Ζεύγη εκκινητικών μορίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την Nested-PCR.

Η PCR προενίσχυσης πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και στις εξής συνθήκες:

| Ζεύγος εκκινητών | Συνθήκες αντίδρασης PCR | |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|
| | 1 κύκλος | 3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA |
| ECHO12P3-DF2 / Anchor primer | 30 κύκλοι | -30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 55° C για τον υβριδισμό των εκκινητών -1 min στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση |
| | 1 κύκλος | 2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων |

Πίνακας 3.9.1.4: Συνθήκες διεξαγωγής της PCR προενίσχυσης.

Έπειτα τα προϊόντα της PCR προενίσχυσης υποβλήθηκαν σε μια δεύτερη PCR χρησιμοποιώντας το εκκινητικό ζεύγος ECHO12P3-DR3/ECHO12P3-DF3. Αναλυτικότερα, προετοιμάστηκε πρώτα το μίγμα που περιείχε: 1mM dNTPs, 1X KAPA Taq Buffer, 1,5 Units ενζύμου KAPA Taq Polymerase, 25 pmol από κάθε εκκινητή και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 48μl. Έπειτα προστέθηκαν 2μl από το προϊόν της πρώτης PCR και ακολούθησαν οι παρακάτω συνθήκες επώασης:

| Ζεύγος εκκινήτων | Συνθήκες αντίδρασης PCR |
|------------------------------------|--|
| | 1 κύκλος 3 min στους 95° C για αποδιάταξη του cDNA |
| ECHO12P3-DR3 / ECHO12P3-DF3 | 30 κύκλοι -30 sec στους 95° C για την αποδιάταξη του DNA -30 sec στους 50° C για τον υβριδισμό των εκκινήτων -30 sec στους 72° C για την επιμήκυνση των κλώνων από την πολυμεράση |
| | 1 κύκλος 2 min στους 72° C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων |

Πίνακας 3.9.1.5: Συνθήκες διεξαγωγής της Nested-PCR.

3.10. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR

Αρχικά, για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR έγινε η προετοιμασία του πηκτώματος. Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Αναλυτικότερα, σε κωνική φιάλη των 250ml αναμείχθηκαν 0,8gr αγαρόζης (Ultra-Pure Gel Agarose, Invitrogen, UK) και 40ml TBE (Tris – Boric acid – EDTA). Έπειτα το μίγμα αυτό θερμάνθηκε σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 λεπτό ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Μόλις το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία 40° C προστέθηκε βρωμιούχο αιθίδιο μέχρι τελικής συγκεντρώσεως 1μg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών βάσεων του DNA, απορροφά στα 290nm και φθορίζει στα 605nm, με αποτέλεσμα την εμφάνιση ορατών ζωνών πορτοκαλί χρώματος. Ακολούθως, το διάλυμα προστέθηκε στην ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης ώστε να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό του πηκτώματος ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Για τον σκοπό αυτό 10μl από το δείγμα αναμίχθηκαν με 2μl Gel Loading Buffer 10X (κυανό της βρωμοφαινόλης, σουκρόζη 40% w/v και TBE) και τα δείγματα προστέθηκαν στις ειδικές θέσεις του πηκτώματος. Στην συγκεκριμένη διαδικασία είναι απαραίτητη η χρήση ενός μάρτυρα μοριακού βάρους ώστε να είναι εφικτός ο προσδιορισμός του μήκους των PCR προϊόντων και κατ' επέκταση ο προσδιορισμός του ειδικού προϊόντος. Έτσι λοιπόν χρησιμοποιήθηκε ο 100bp DNA Ladder (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή τάσης 120 Volts και έντασης 500mA για περίπου 30 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση

της διαδικασίας το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός Foto/Phoresis system (Fotodyne, USA) και έπειτα φωτογραφήθηκε με την βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής.

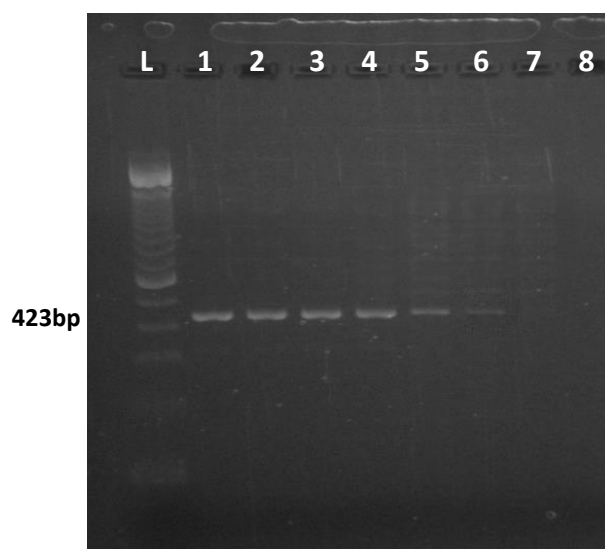
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως ήδη αναφέρθηκε ο στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η θερμική αδρανοποίηση των δύο ιικών στελεχών, Sabin 1 και Echo 12 σε συγκεντρώσεις 10⁶ και 10 TCID₅₀, καθώς και η ανίχνευση πιθανών ρήξεων στο ιικό γονιδίωμα που συνδέονται με τη θερμική αδρανοποίησή τους. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν ανά περιοχή που εξετάστηκε και για τις δύο συγκεντρώσεις των στελεχών που μελετήθηκαν. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την χρήση του antisense εκκινητή για την δημιουργία του cDNA.

4.1. Αποτελέσματα για το στέλεχος Sabin 1 [10⁶] TCID₅₀

4.1.1. Περιοχή 5'UTR

Για την στόχευση της περιοχής 5'UTR χρησιμοποιήθηκε το εκκινητικό ζεύγος UG52/UC53 και πραγματοποιήθηκε η αντίδραση PCR για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω. Το αναμενόμενο προϊόν από την ενίσχυση της PCR έχει μήκος 423bp.



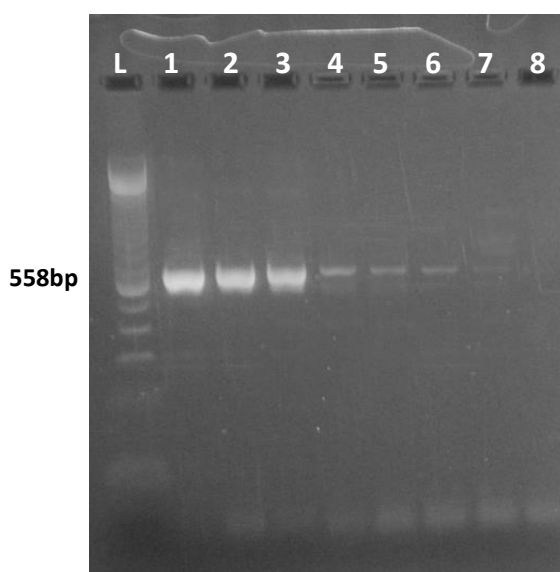
Εικόνα 4.1.1.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 5'UTR στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------------|------------|
| 1 | S1 10 ⁶ 55° C | + |
| 2 | S1 10 ⁶ 60° C | + |
| 3 | S1 10 ⁶ 65° C | + |
| 4 | S1 10 ⁶ 70° C | + |
| 5 | S1 10 ⁶ 75° C | + |
| 6 | S1 10 ⁶ 80° C | + |
| 7 | S1 10 ⁶ 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.1.1.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀ στην περιοχή 5'UTR.

4.1.2. Περιοχή 3C

Για την ενίσχυση της περιοχής 3C στο στέλεχος Sabin 1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών SAB1-3CF1/SAB1-3CR1 και η PCR πραγματοποιήθηκε σε όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του ιού. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων με το ειδικό προϊόν να αναμένεται στις 588bp.



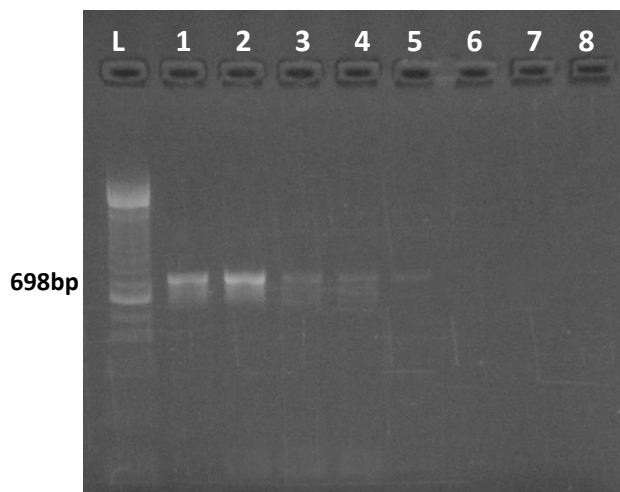
Εικόνα 4.1.2.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3C στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------|------------|
| 1 | S1 10^6 55° C | + |
| 2 | S1 10^6 60° C | + |
| 3 | S1 10^6 65° C | + |
| 4 | S1 10^6 70° C | + |
| 5 | S1 10^6 75° C | + |
| 6 | S1 10^6 80° C | + |
| 7 | S1 10^6 82° C | + |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.1.2.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ για την περιοχή 3C.

4.1.3. Περιοχή 3D

Στο σημείο αυτό χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητικών μορίων SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 με στόχο την ενίσχυση της περιοχής 3D του ιού Sabin 1 με συγκέντρωση 10^6 TCID₅₀. Το μήκος του προϊόντος από αυτή την αντίδραση ενίσχυσης είναι 698bp.



Εικόνα 4.1.3.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------------|------------|
| 1 | S1 10 ⁶ 55° C | + |
| 2 | S1 10 ⁶ 60° C | + |
| 3 | S1 10 ⁶ 65° C | + |
| 4 | S1 10 ⁶ 70° C | + |
| 5 | S1 10 ⁶ 75° C | + |
| 6 | S1 10 ⁶ 80° C | - |
| 7 | S1 10 ⁶ 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.1.3.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.2. Αποτελέσματα για το στέλεχος Sabin 1 [10] TCID₅₀.

Οι παραπάνω δοκιμές πραγματοποιήθηκαν και για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀ του στελέχους Sabin 1 στις θερμοκρασίες αδρανοποίησης 45° C, 50° C 55° C, 60° C και 65° C για τις περιοχές 5' UTR, 3C και 3D.

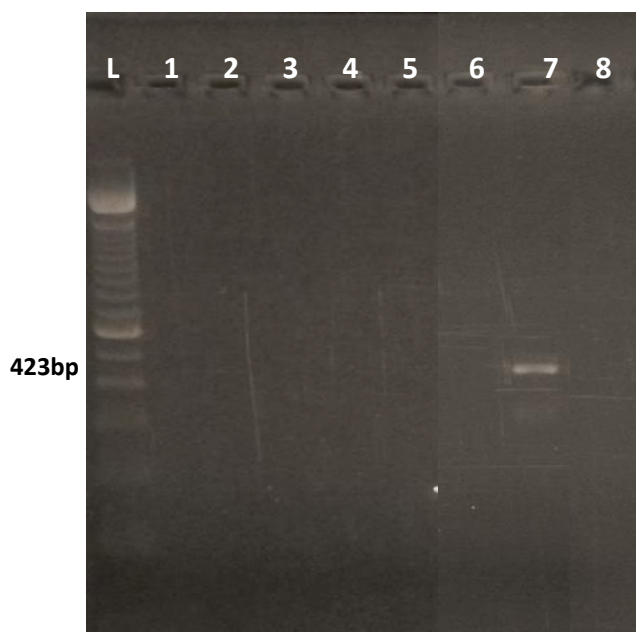
Εκτελέστηκαν οι ίδιες αντιδράσεις όπως περιγράφηκαν προηγουμένως για την συγκέντρωση 10⁶ TCID₅₀ με την διαφορά ότι στην συγκέντρωση 10 TCID₅₀ πραγματοποιήθηκαν οι θερμικές αδρανοποιήσεις του ιού σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε σχέση με την υψηλότερη συγκέντρωση 10⁶. Οι θερμοκρασίες αδρανοποίησης του ιού στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης ήταν οι εξής: 45° C, 50° C 55° C, 60° C και 65° C. Σε συγκέντρωση του ιού της τάξης του 10 TCID₅₀ αναμένεται να πραγματοποιηθεί η αδρανοποίηση σε χαμηλότερη θερμοκρασία από αυτήν που απαιτείται για την αδρανοποίηση του ιού όταν αυτός βρίσκεται σε συγκέντρωση 10⁶ TCID₅₀ καθώς η συγκέντρωση αυτή περιέχει λιγότερα ιικά σωματίδια τα οποία θα αδρανοποιηθούν ευκολότερα σε σχέση με την συγκέντρωση 10⁶ όπου είναι πιθανή η δημιουργία συσσωματωμάτων μεταξύ των

ϊικών σωματιδίων με αποτέλεσμα να μην αδρανοποιούνται πλήρως όλα τα ιικά σωματίδια. Επιπλέον στις παρακάτω αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκαν δύο θετικοί μάρτυρες της κάθε αντίδρασης, μη αδρανοποιημένος ιός χαμηλής συγκέντρωσης (10 TCID₅₀) και μη αδρανοποιημένος ιός υψηλής συγκέντρωσης (10⁶ TCID₅₀), για την επαλήθευση της PCR.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανά περιοχή:

4.2.1. Περιοχή 5'UTR

Το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση αυτής της περιοχής είναι, όπως προαναφέρθηκε, το UG52/UC53 και το μήκος του προϊόντος ενίσχυσης είναι 423bp.



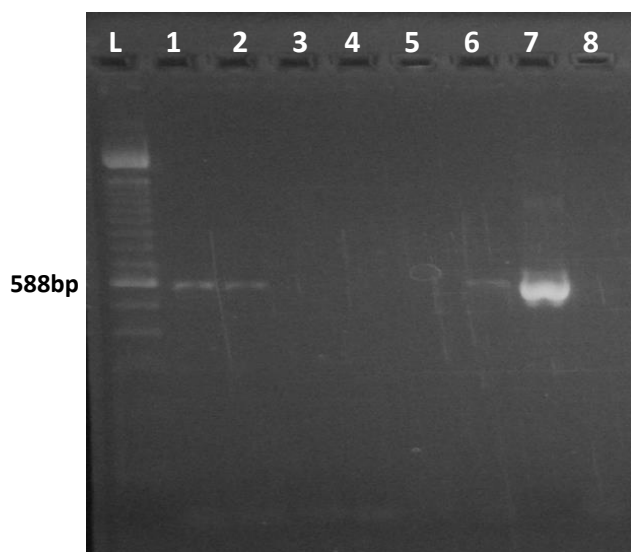
| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|------------------------|------------|
| 1 | S1 10 45° C | - |
| 2 | S1 10 50° C | - |
| 3 | S1 10 55° C | - |
| 4 | S1 10 60° C | - |
| 5 | S1 10 65° C | - |
| 6 | S1 10 (+) | - |
| 7 | S1 10 ⁶ (+) | + |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Εικόνα 4.2.1.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 5'UTR στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

Πίνακας 4.2.1.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 5'UTR.

4.2.2. Περιοχή 3C

Εδώ η PCR πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές SAB1-3CF1/SAB1-3CR1 και το παραγόμενο προϊόν έχει μήκος 588bp.



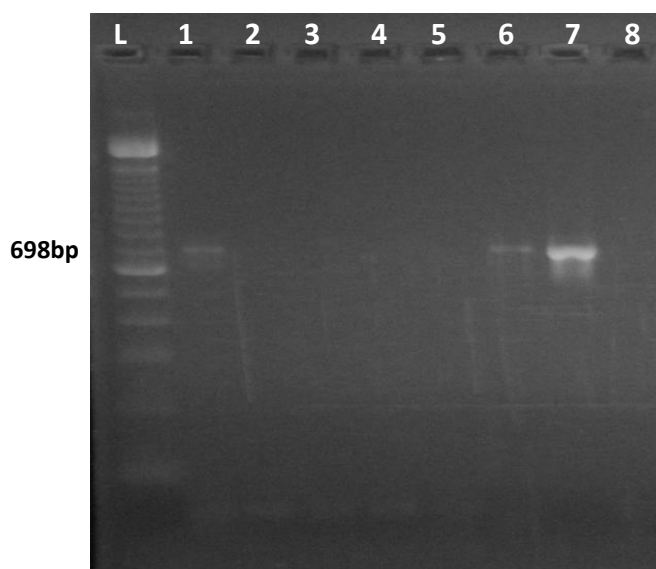
Εικόνα 4.2.2.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3C στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|------------------------|------------|
| 1 | S1 10 45° C | + |
| 2 | S1 10 50° C | + |
| 3 | S1 10 55° C | - |
| 4 | S1 10 60° C | - |
| 5 | S1 10 65° C | - |
| 6 | S1 10 (+) | + |
| 7 | S1 10 ⁶ (+) | + |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.2.2.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 3C.

4.2.3. Περιοχή 3D

Η PCR για την ενίσχυση της 3D περιοχής επιτεύχθηκε με την χρήση των εκκινητών SAB1-3DF2/SAB1-3DR2. Το προϊόν που προκύπτει από αυτή την ενίσχυση έχει μήκος 698bp.



Εικόνα 4.2.3.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Sabin1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

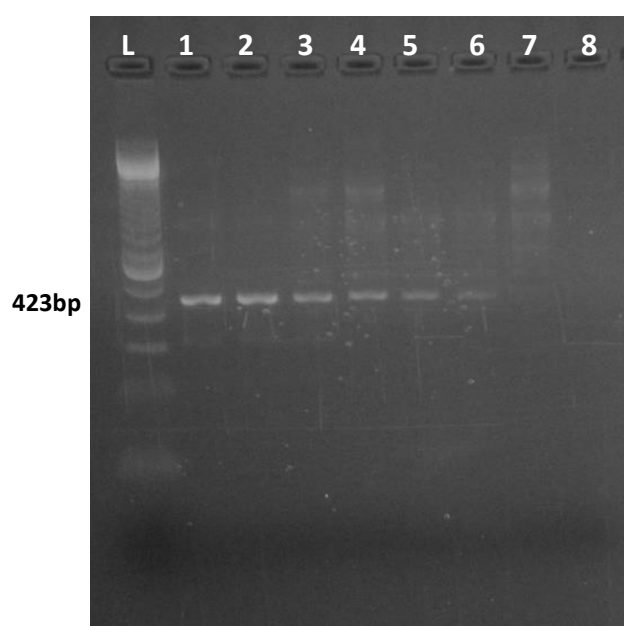
| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|------------------------|------------|
| 1 | S1 10 45° C | + |
| 2 | S1 10 50° C | - |
| 3 | S1 10 55° C | - |
| 4 | S1 10 60° C | - |
| 5 | S1 10 65° C | - |
| 6 | S1 10 (+) | + |
| 7 | S1 10 ⁶ (+) | + |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.2.3.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.3. Αποτελέσματα για το στέλεχος Echo 12 [10⁶] TCID₅₀.

4.3.1. Περιοχή 5'UTR

Όπως και για το στέλεχος Sabin 1, η ενίσχυση της περιοχής 5'UTR για το στέλεχος Echo 12 πραγματοποιήθηκε με την χρήση των εκκινητών UG52/UC53. Μετά την PCR πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων. Το μήκος του ειδικού προϊόντος είναι 423bp.



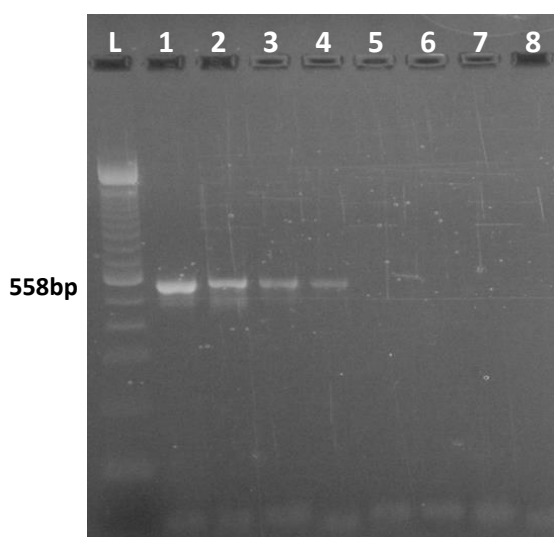
| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|---------------------------|------------|
| 1 | E12 10 ⁶ 55° C | + |
| 2 | E12 10 ⁶ 60° C | + |
| 3 | E12 10 ⁶ 65° C | + |
| 4 | E12 10 ⁶ 70° C | + |
| 5 | E12 10 ⁶ 75° C | + |
| 6 | E12 10 ⁶ 80° C | + |
| 7 | E12 10 ⁶ 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Εικόνα 4.3.1.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 5'UTR στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀.

Πίνακας 4.3.1.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀ για την περιοχή 5'UTR.

4.3.2. Περιοχή 3C

Χρησιμοποιήθηκε το ειδικό εκκινητικό ζεύγος ECHO12P3-CF1 / ECHO12P3-CR1 με στόχο την ενίσχυση της περιοχής 3C του στελέχους Echo 12. Μετά την ηλεκτροφόρηση το προϊόν που προκύπτει από την αυτή την ενίσχυση έχει μήκος 558bp.



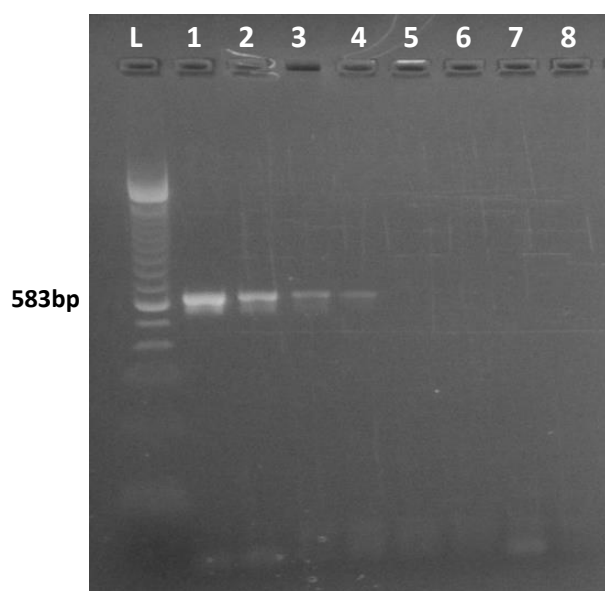
Εικόνα 4.3.2.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3C στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------|------------|
| 1 | E12 10^6 55° C | + |
| 2 | E12 10^6 60° C | + |
| 3 | E12 10^6 65° C | + |
| 4 | E12 10^6 70° C | + |
| 5 | E12 10^6 75° C | - |
| 6 | E12 10^6 80° C | - |
| 7 | E12 10^6 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.3.2.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ για την περιοχή 3C.

4.3.3. Περιοχή 3D

Η PCR για την ενίσχυση της περιοχής 3D πραγματοποιήθηκε με το εκκινητικό ζεύγος ECHO12P3-DF2/ECHO12P3-DR2. Το προϊόν που προκύπτει έχει μήκος 583bp.



Εικόνα 4.3.3.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------|------------|
| 1 | E12 10^6 55° C | + |
| 2 | E12 10^6 60° C | + |
| 3 | E12 10^6 65° C | + |
| 4 | E12 10^6 70° C | + |
| 5 | E12 10^6 75° C | - |
| 6 | E12 10^6 80° C | - |
| 7 | E12 10^6 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

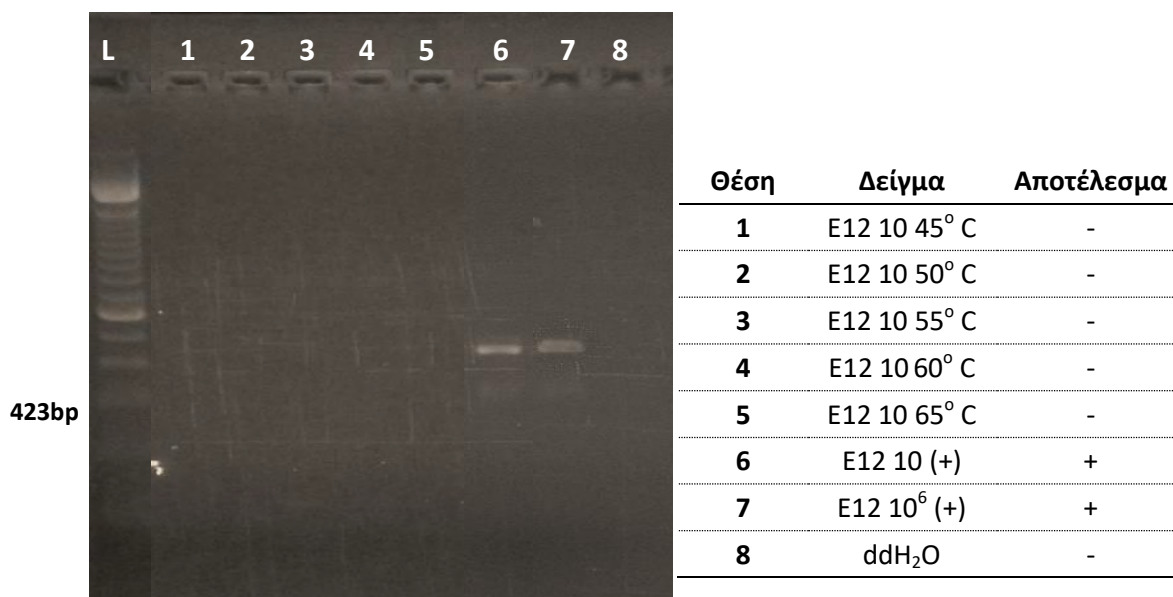
Πίνακας 4.3.3.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.4. Αποτελέσματα για το στέλεχος Echo 12 [10] TCID₅₀.

Οι ίδιες αντιδράσεις PCR πραγματοποιήθηκαν και για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀ του στελέχους Echo 12 στις θερμοκρασίες αδρανοποίησης: 45°C, 50°C, 55°C, 60°C και 65°C. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε περιοχή παρουσιάζονται παρακάτω. Και σε αυτή τη σειρά αντιδράσεων, λόγω του χαμηλού τίτλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν 2 θετικοί μάρτυρες, μη αδρανοποιημένος ιός υψηλής και χαμηλής συγκέντρωσης (10⁶ και 10 TCID₅₀ αντίστοιχα).

4.4.1. Περιοχή 5'UTR

Το ζεύγος των εκκινητικών μορίων που αξιοποιήθηκε για την ενίσχυση αυτής της περιοχής είναι το ζεύγος UG52/UC53. Το προϊόν αυτής της ενίσχυσης έχει μήκος 423bp, όπως ήδη προαναφέρθηκε.

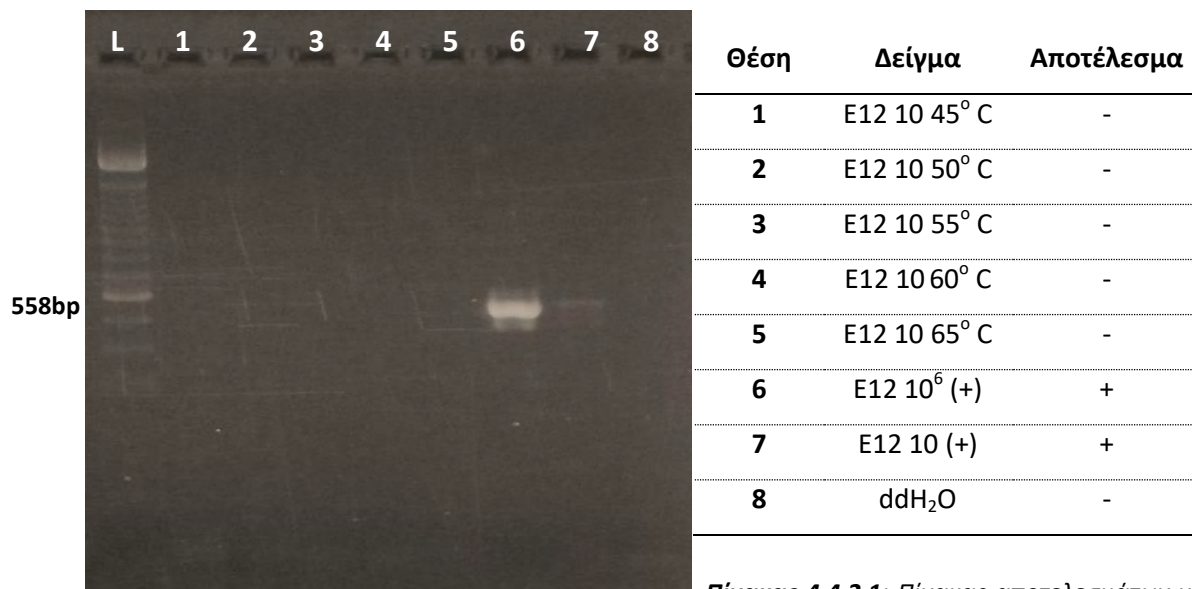


Εικόνα 4.4.1.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 5'UTR στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

Πίνακας 4.4.1.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 5'UTR.

4.4.2. Περιοχή 3C

Η περιοχή 3C για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀ του στελέχους Echo 12 ενισχύθηκε με τους εκκινητές ECHO12P3-CF1 / ECHO12P3-CR1 και το προϊόν που προκύπτει έχει μήκος 558bp.

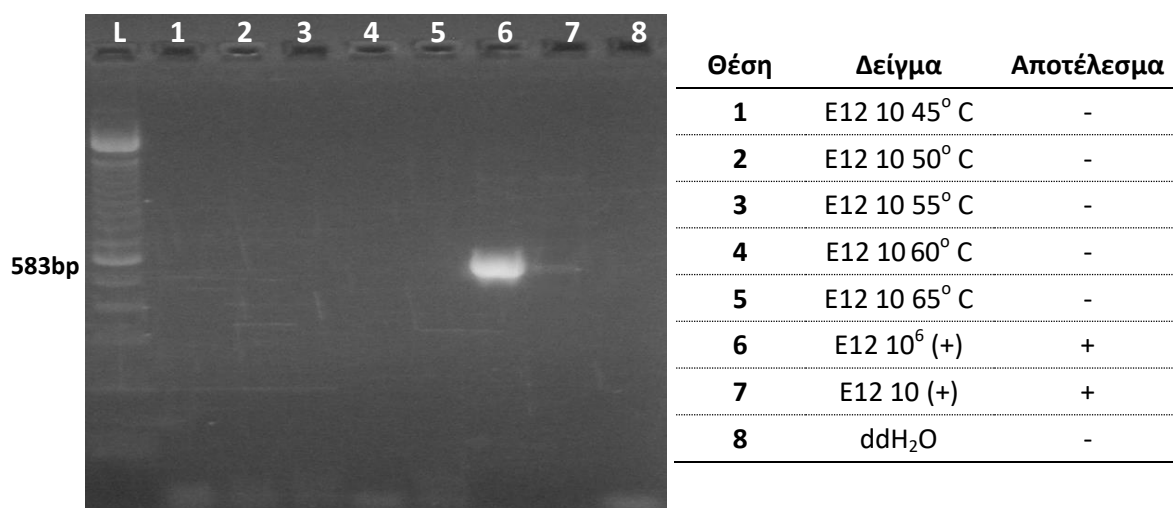


Εικόνα 4.4.2.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3C στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

Πίνακας 4.4.2.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 3C.

4.4.3. Περιοχή 3D

Αξιοποιήθηκαν και πάλι οι εκκινητές ECHO12P3-DF2 / ECHO12P3-DR2 με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής 3D για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀ του στελέχους Echo 12.



Εικόνα 4.4.3.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀.

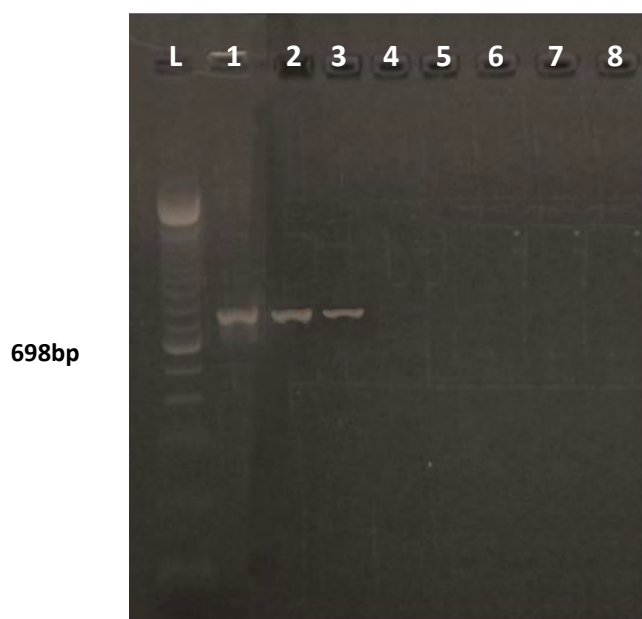
Πίνακας 4.4.3.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.5. Αποτελέσματα από την χρήση του Anchor εκκινητή

Τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν μέχρι εδώ αφορούσαν την πρώτη προσέγγιση που ακολουθήθηκε, δηλαδή την χρήση του antisense εκκινητή για την διεξαγωγή της αντίστροφης μεταγραφής και την δημιουργία του cDNA. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την δημιουργία του cDNA με τη χρήση του εκκινητή dT anchor. Η συγκεκριμένη προσέγγιση εφαρμόστηκε τόσο για το στέλεχος Sabin 1 όσο και για το στέλεχος Echo 12 με συγκέντρωση 10^6 TCID₅₀. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της αντίστροφης μεταγραφής (η οποία πραγματοποιήθηκε με τον εκκινητή dT anchor) στα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ ακολούθησε PCR με τα ειδικά ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν στην 3D περιοχή και τα προϊόντα της αντίδρασης PCR ηλεκτροφορήθηκαν. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται παρακάτω.

4.5.1. Sabin 1 [10^6] TCID₅₀

Πραγματοποιήθηκε PCR με το ειδικό εκκινητικό ζεύγος SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀. Το μήκος του προϊόντος από αυτή την αντίδραση ενίσχυσης είναι 698bp.



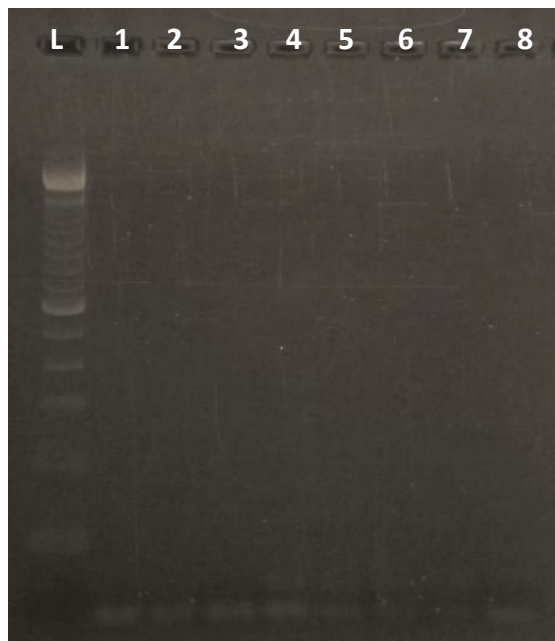
Εικόνα 4.5.1.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------|------------|
| 1 | S1 10^6 55° C | + |
| 2 | S1 10^6 60° C | + |
| 3 | S1 10^6 65° C | + |
| 4 | S1 10^6 70° C | - |
| 5 | S1 10^6 75° C | - |
| 6 | S1 10^6 80° C | - |
| 7 | S1 10^6 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

Πίνακας 4.5.1.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.5.2. Echo 12 [10^6] TCID₅₀

Στην περίπτωση του στελέχους Echo 12 η PCR πραγματοποιήθηκε με την χρήση των εκκινητών ECHO12P3-DF2/ECHO12P3-DR2. Το προϊόν που προκύπτει έχει μήκος 583bp.



Εικόνα 4.5.2.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

| Θέση | Δείγμα | Αποτέλεσμα |
|------|--------------------|------------|
| 1 | E12 10^6 55° C | - |
| 2 | E12 10^6 60° C | - |
| 3 | E12 10^6 65° C | - |
| 4 | E12 10^6 70° C | - |
| 5 | E12 10^6 75° C | - |
| 6 | E12 10^6 80° C | - |
| 7 | E12 10^6 82° C | - |
| 8 | ddH ₂ O | - |

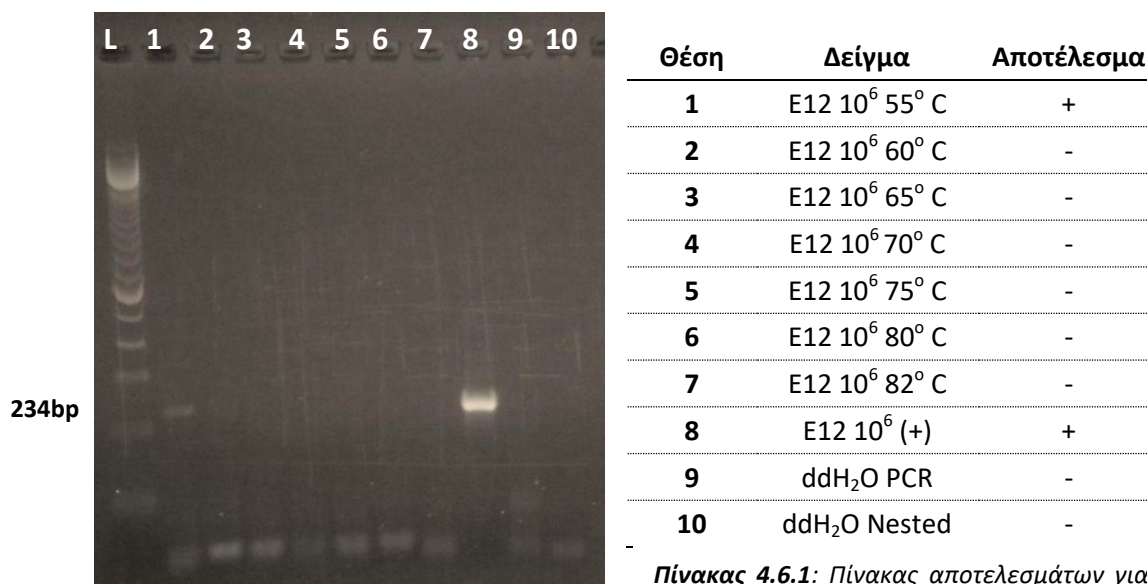
Πίνακας 4.5.2.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.6. Αποτελέσματα Nested-PCR

Η Nested-PCR πραγματοποιήθηκε για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀. Η πρώτη PCR προενίσχυσης πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές ECHO12P3-DF2/Anchor. Η δεύτερη PCR πραγματοποιήθηκε με τους εκκινητές ECHO12P3-DR3/ECHO12P3DF3.

Αφού δημιουργήθηκε το cDNA με τον dT anchor εκκινητή, ακολούθησε Nested-PCR. Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά οι εκκινητές ECHO12P3-DF2/Anchor για την πρώτη PCR προενίσχυσης. Το προϊόν που ενισχύεται έχει μήκος 1450bp. Ακολούθως, τα δείγματα της πρώτης PCR υποβάλλονται σε δεύτερη PCR με τη χρήση των εκκινητών ECHO12P3-DR3/ ECHO12P3-DF3. Κατόπιν, τα ενισχυμένα

προϊόντα της δεύτερης PCR ηλεκτροφορούνται και τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω. Το ενισχυμένο προϊόν από την δεύτερη αντίδραση έχει μήκος 234bp.

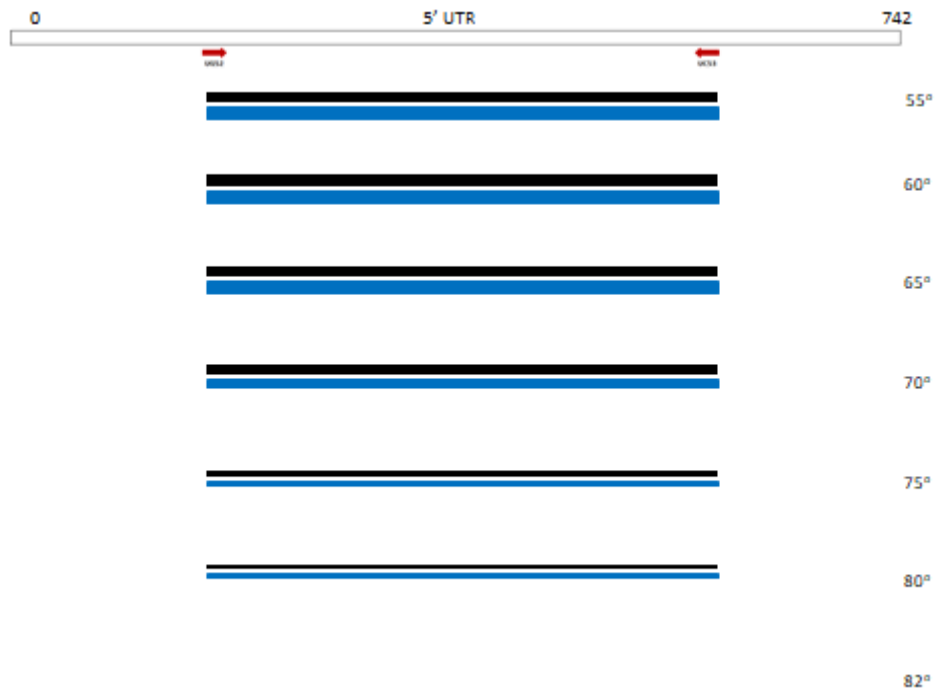


Εικόνα 4.6.1: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για την περιοχή 3D στο πρότυπο στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀.

Πίνακας 4.6.1: Πίνακας αποτελεσμάτων για όλες τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης του στελέχους Echo 12 συγκέντρωσης 10⁶ TCID₅₀ για την περιοχή 3D.

4.7. Συγκεντρωτικά

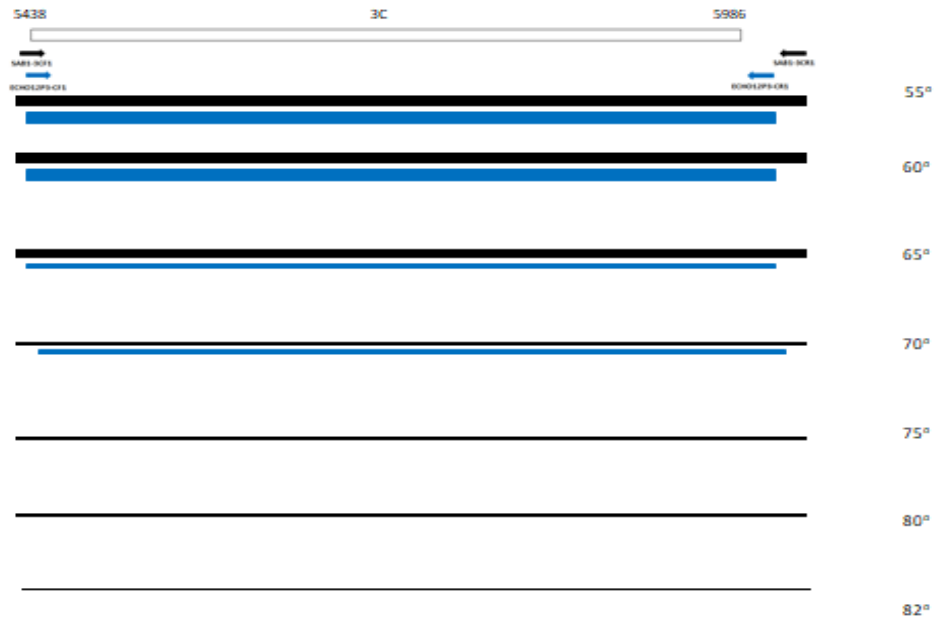
Παρακάτω παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα με τη μορφή εικόνων ανά περιοχή και ιικό τίτλο. Συγκεκριμένα, σε κάθε εικόνα αναπαριστώνται μια συγκεκριμένη περιοχή του γενώματος του ιού για μια συγκέντρωση (10⁶ ή 10 TCID₅₀) καθώς και η θέση υβριδισμού των εκκινητών πάνω στο ιικό γονιδίωμα. Επιπρόσθετα, σε κάθε εικόνα αναπαριστώνται τα προϊόντα που προκύπτουν για κάθε ενίσχυση με την μορφή μπάρας το μέγεθος της οποίας αντικατοπτρίζει την ένταση της αντίστοιχης ζώνης του πηκτώματος. Οι πρώτες εικόνες που παρατίθενται αντιστοιχούν στις δοκιμές όπου χρησιμοποιήθηκε ο antisense εκκινητής για την δημιουργία του cDNA.



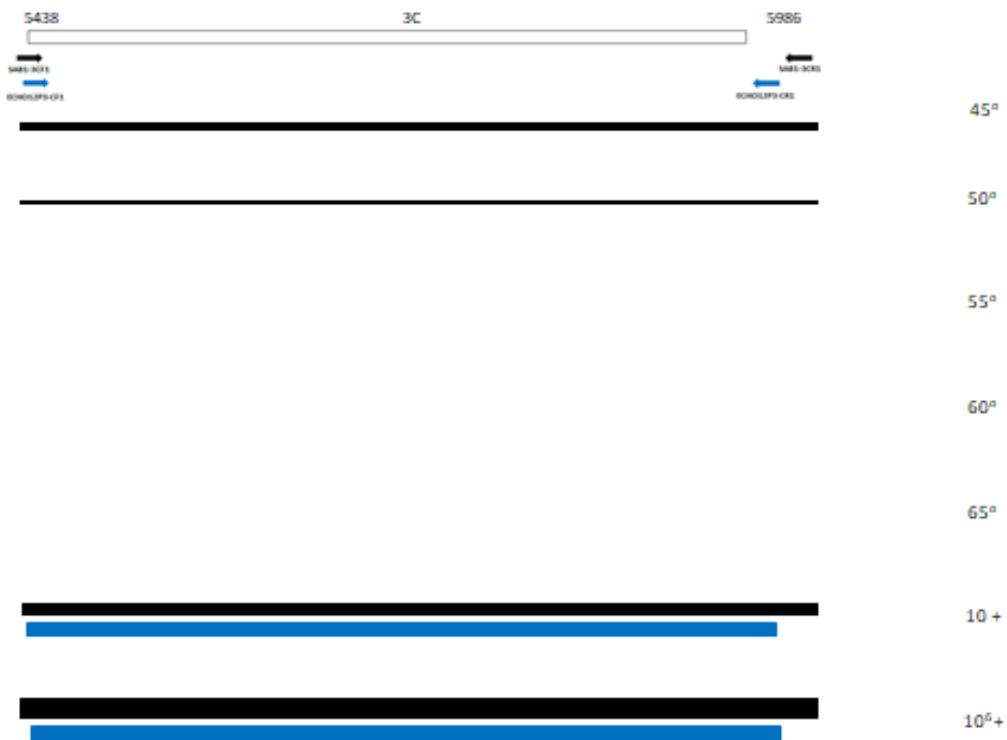
Εικόνα 4.7.1: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 5' UTR και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκινητών UG52/UC53. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10^6] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10^6] TCID₅₀.



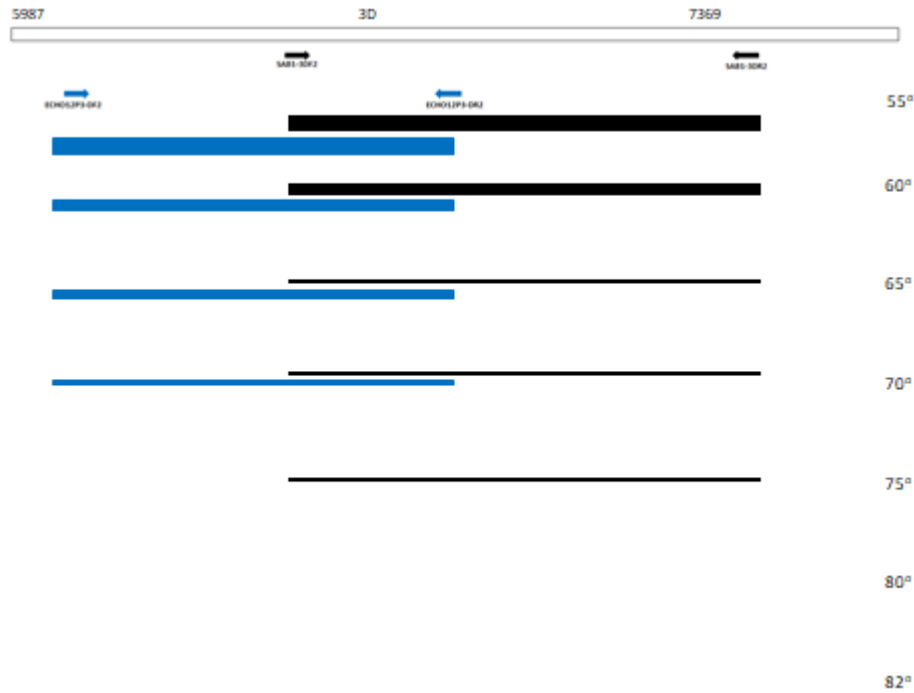
Εικόνα 4.7.2: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 5' UTR και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκινητών UG52/UC53 για τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10] TCID₅₀.



Εικόνα 4.7.3: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 3C και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκλητητών SAB1-3CF1/SAB1-3CR1 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ και ECHO12P3-CF1/ECHO12P3-CR1 για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10^6] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10^6] TCID₅₀.



Εικόνα 4.7.4: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 3C και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκλητητών SAB1-3CF1/SAB1-3CR1 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ και ECHO12P3-CF1/ECHO12P3-CR1 για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10] TCID₅₀.

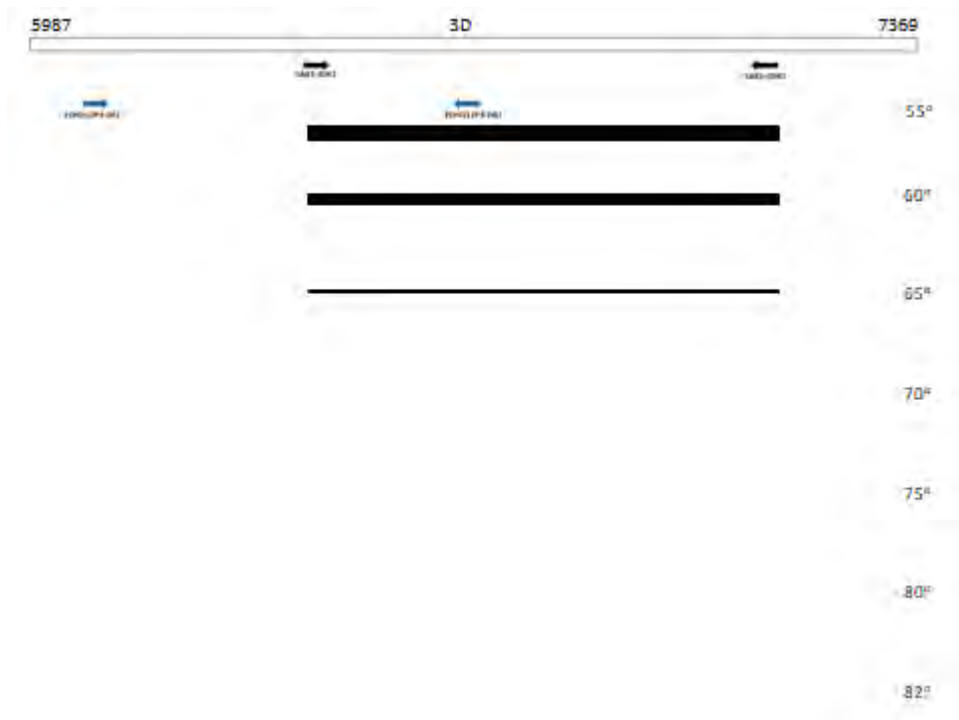


Εικόνα 4.7.5: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 3D και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκινητών SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ και ECHO12P3-DF2/ECHO12P3-DR2 για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10^6] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10^6] TCID₅₀.



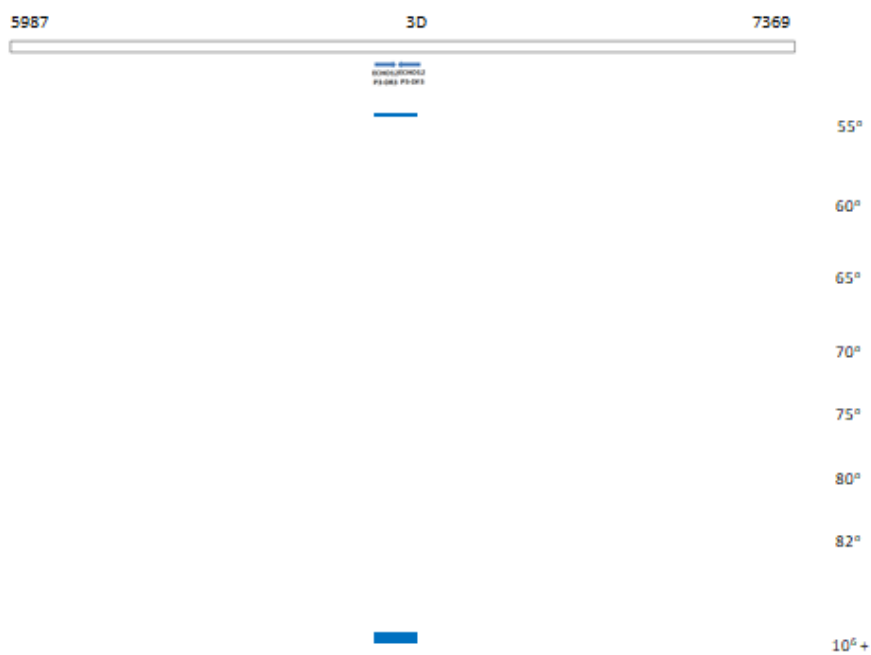
Εικόνα 4.7.6: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 3D και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκινητών SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀ και ECHO12P3-DF2/ECHO12P3-DR2 για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10] TCID₅₀ ενώ με μπλε χρώμα τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Echo 12 [10] TCID₅₀.

Η δεύτερη δοκιμασία που εκτελέστηκε σε αυτή την πτυχιακή μελέτη αφορούσε την δημιουργία του cDNA με την χρήση του εκκινητή dT anchor και κατόπιν την ενίσχυση της 3D περιοχής για την υψηλή ιϊκή συγκέντρωση (10^6 TCID₅₀) τόσο για το στέλεχος Sabin 1 όσο και για το στέλεχος Echo 12. Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή την δοκιμασία.



Εικόνα 4.7.7: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής 3D και των προϊόντων που προκύπτουν από την ενίσχυση των εκκινητών SAB1-3DF2/SAB1-3DR2 για το στέλεχος Sabin 1 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ και ECHO12P3-DF2/ECHO12P3-DR2 για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀. Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται τα προϊόντα που αντιστοιχούν στο στέλεχος Sabin 1 [10^6] TCID₅₀. Για το στέλεχος Echo 12 [10^6] TCID₅₀ δεν προέκυψαν προϊόντα από την αντίδραση ενίσχυσης. Η συγκεκριμένη εικόνα αντιστοιχεί στην δοκιμή όπου το cDNA δημιουργήθηκε με την βοήθεια του dT anchor εκκινητή.

Στην συνέχεια παρατίθεται η συγκεντρωτική εικόνα που αφορά την αντίδραση Nested-PCR. Υπενθυμίζεται ότι η Nested-PCR πραγματοποιήθηκε για το στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.



Εικόνα 4.7.8: Σχηματική αναπαράσταση των προϊόντων της Nested-PCR που προκύπτουν από την χρήση των εκκινητών ECHO12P3-DF2 /Anchor και ECHO12P3-DR3/ECHO12P3DF3για το στέλεχος Echo12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι εντεροϊοί ανήκουν στο γένος Enterovirus της οικογένειας Picornaviridae. Πρόκειται για ιούς που έχουν ως γονιδίωμα ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας μήκους περίπου 7.500 βάσεων. Το γονιδίωμα τους περιβάλλεται αποκλειστικά από ένα πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, ενώ δεν φέρουν λιπιδικό περίβλημα (Racaniello et al., 2013).

Οι εντεροϊοί ανήκουν στους πιο κοινούς ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο παγκοσμίως (Khetsuriani et al., 2006). Οι ιοί αυτοί έχουν συσχετιστεί με την πρόκληση πολλών ασθενειών στον άνθρωπο, οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται από ασυμπτωματικές μολύνσεις (κοινό κρυολόγημα) μέχρι και σοβαρές ασθένειες όπως είναι η πολιομυελίτιδα, η άσηπτη μηνιγγίτιδα και η μυοκαρδίτιδα (Kargar et al., 2009).

Φαίνεται λοιπόν πως είναι πολύ σημαντική η παρακολούθηση της κυκλοφορίας τους μέσω ανάλυσης δειγμάτων για την ανίχνευση εντεροϊών, ώστε να είναι δυνατή η αποτελεσματική εξάλειψη τους. Η μελέτη του γονιδιώματος των εντεροϊών μπορεί να προσφέρει σημαντικές πληροφορίες και να βοηθήσει στην κατανόηση της μόλυνσης και ως εκ τούτου στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των εντεροϊών.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά θερμική αδρανοποίηση των στελεχών Sabin 1 και Echo 12, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις, μία υψηλή της τάξης του 10^6 TCID₅₀ και μία χαμηλή της τάξης του 10 TCID₅₀.

Κατά την θερμική αδρανοποίηση είναι δυνατόν να προκληθούν βλάβες στο ιικό γένωμα, με χαρακτηριστικό παράδειγμα την δημιουργία ρήξεων. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία οι περιοχές οι οποίες φαίνεται να είναι ευαίσθητες στην πρόκληση ρήξεων είναι η 5' UTR, η 3C, η 3D και η 3' UTR (Jin et al., 2012; Jin et al., 2013; Simonet et al., 2004).

Για αυτό τον λόγο αφού πραγματοποιήθηκαν αδρανοποιήσεις του ιού σε διαφορετικές θερμοκρασίες για κάθε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε, και μελετήθηκε το ιϊκό γονιδίωμα ως προς την ύπαρξη ρήξεων, με την βοήθεια της τεχνικής PCR στοχεύοντας κάθε φορά μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος με την χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών.

Αρχικά, τα στελέχη Sabin 1 και Echo 12 αδρανοποιήθηκαν στις εξής θερμοκρασίες:

- για την συγκέντρωση 10^6 TCID₅₀ του ιού οι θερμοκρασίες αδρανοποίησης ήταν 55° C, 60° C, 65° C, 70° C, 75° C, 80° C και 82° C ενώ
- για την συγκέντρωση 10 TCID₅₀ του ιού οι θερμοκρασίες αδρανοποίησης ήταν 45° C, 50° C, 55° C, 60° C και 65° C.

Κατόπιν ακολούθησε απομόνωση του γενετικού υλικού των εντεροϊών χωρίς την μεσολάβηση κυτταροκαλλιέργειας.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή για την δημιουργία του cDNA. Η αντίστροφη μεταγραφή έγινε αρχικά με την χρήση του antisense εκκινητή από το ειδικό ζεύγος κάθε περιοχής και σε δεύτερο στάδιο με τον εκκινητή dT anchor.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν χρησιμοποιώντας τον antisense εκκινητή παρατηρούμε πως τα δύο στελέχη εμφανίζουν διαφορετικά προφίλ στις διάφορες περιοχές, καθώς και ότι εμφανίζονται διαφορές και ανάμεσα στις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε στέλεχος.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά την υψηλή ιϊκή συγκέντρωση [10^6] TCID₅₀ παρατηρούμε πως η περιοχή 5' UTR εμφανίζει το ίδιο πρότυπο και στα δύο στελέχη. Για την συγκεκριμένη περιοχή παίρνουμε θετικό σήμα στις θερμοκρασίες αδρανοποίησης από 55° C έως 80° C ενώ στους 82° C δεν εμφανίζεται ζώνη στο πήκτωμα.

Η περιοχή 3C παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ. Στο στέλεχος Sabin 1 η περιοχή 3C ανιχνεύεται σε όλες τις θερμοκρασίες, αλλά το σήμα σταδιακά ελαττώνεται και μάλιστα στους 82° C η περιοχή 3C ανιχνεύεται οριακά (πολύ αχνή ζώνη στο πήκτωμα). Αντίθετα η περιοχή 3C στο στέλεχος Echo 12 εμφανίζεται από τους 55° C έως τους 70° C. Στις θερμοκρασίες από 75° C μέχρι 82° C η περιοχή 3C δεν ανιχνεύεται στο στέλεχος Echo 12.

Τέλος, για την συγκέντρωση 10⁶ TCID₅₀ η περιοχή 3D εμφανίζει παρόμοιο μοτίβο. Στο στέλεχος Sabin 1 ανιχνεύεται μέχρι 75° C με αχνής έντασης ζώνη στους 65° C, 70° C και 75° C ενώ στο στέλεχος Echo 12 εμφανίζεται μέχρι τους 65° C με μια αχνή ζώνη στους 70° C.

Αναφορικά με την χαμηλότερη συγκέντρωση 10 TCID₅₀, η περιοχή 5'UTR δεν ανιχνεύεται σε κανένα από τα δύο στελέχη και σε καμία θερμοκρασία αδρανοποίησης. Η περιοχή 3C ανιχνεύεται μόνο στο στέλεχος Sabin 1 στους 45° C και στους 50° C ενώ στο στέλεχος Echo 12 δεν εμφανίζεται σε καμία από τις θερμοκρασίες αδρανοποίησης. Τέλος, η περιοχή 3D ανιχνεύεται μόνο στο στέλεχος Sabin 1 στους 45° C ενώ στις υπόλοιπες θερμοκρασίες δεν εμφανίζεται σήμα. Στο στέλεχος Echo 12 η 3D δεν ανιχνεύεται.

Το γεγονός ότι στους υψηλούς ιικούς τίτλους ανιχνεύονται τμήματα σε διάφορες περιοχές, ενώ στους χαμηλούς ιικούς τίτλους δεν ανιχνεύονται, πιθανώς οφείλεται στη δημιουργία συσσωματωμάτων μεταξύ των ιικών σωματιδίων. Στις υψηλές συγκεντρώσεις δημιουργούνται συσσωματώματα, με αποτέλεσμα ορισμένα σωματίδια που βρίσκονται στο κέντρο του συσσωματώματος να μην αδρανοποιούνται αποτελεσματικά και να απαιτείται έτσι υψηλότερη θερμοκρασία για την αδρανοποίηση αυτών των ιών. Επίσης, είναι αναμενόμενο στις ίδιες συνθήκες αδρανοποίησης να είναι ευκολότερη και πιο αποτελεσματική η αδρανοποίηση του χαμηλού ιικού τίτλου (10 TCID₅₀), σε σχέση με τον υψηλότερο ιικό τίτλο 10⁶ TCID₅₀, καθώς πρόκειται για μικρότερη συγκέντρωση του ιού.

Σε επόμενο στάδιο η αντίστροφη μεταγραφή πραγματοποιήθηκε με την χρήση του εκκινητή dT anchor και ακολούθησε PCR με τους ειδικούς για την 3D

εκκινητές και στα δύο ιϊκά στελέχη για τις συγκεντρώσεις 10^6 TCID₅₀. Ο εκκινητής dT anchor διαθέτει μια σειρά από θυμίνες (T) στο 5' άκρο του έτσι ώστε να υβριδοποιείται στην πολύ(A) ουρά στο 3' άκρο του RNA του ιού. Εδώ η περιοχή 3D ανιχνεύεται μόνο στο στέλεχος Sabin 1 στις θερμοκρασίες από 55° C έως 65° C ενώ για το Echo 12 δεν λαμβάνουμε σήμα σε καμία θερμοκρασία. Από την δοκιμή αυτή προκύπτει ότι η περιοχή 3' UTR είναι αυτή που διαθέτει την μεγαλύτερη ευαισθησία στην δημιουργία ρήξεων κατά την θερμική αδρανοποίηση, καθώς το σήμα σταματά ήδη από τους 70° C για το στέλεχος Sabin 1 και μάλιστα για τον υψηλότερο ιϊκό τίτλο, γεγονός το οποίο δεν παρατηρήθηκε σε προηγούμενες δοκιμές. Αυτά τα αποτελέσματα συνάδουν και με άλλες μελέτες όπου με χημική αδρανοποίηση η 3' UTR εμφανίζεται ως η πιο ευαίσθητη περιοχή (Simonet et al., 2006).

Ακολούθησε μια Nested-PCR αντίδραση για το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ στο cDNA που είχε δημιουργηθεί με τον εκκινητή dT anchor. Η Nested-PCR πραγματοποιήθηκε με τα εξής εκκινητικά ζεύγη: ECHO12P3-DF2/Anchor και ECHO12P3-DR3/ECHO12P3-DF3. Στην αντίδραση επίσης χρησιμοποιήθηκε και μη αδρανοποιημένο δείγμα ως θετικός μάρτυρας. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα θετικό σήμα εμφανίζεται μόνο στους 55° C και στο μη αδρανοποιημένο δείγμα (θετικός μάρτυρας).

Συνοψίζοντας, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές θερμοκρασίες αδρανοποίησης για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των δύο στελεχών και σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν συμπεραίνουμε πως εμφανίζονται διαφορές στο προφίλ αδρανοποίησης και στην ανίχνευση των περιοχών που μελετήθηκαν τόσο μεταξύ των διαφορετικών στελεχών όσο και μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων του ίδιου στελέχους. Από την μελέτη αυτή προκύπτει ότι το στέλεχος Echo 12 εμφανίζει γενικά μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με το στέλεχος Sabin 1 κατά την θερμική αδρανοποίηση. Επίσης, η πιο σταθερή περιοχή του γονιδιώματος των εντεροϊών φαίνεται να είναι η 5' UTR, ενώ η πιο εύθραυστη έπειτα από θερμική αδρανοποίηση είναι η 3' UTR. Τέλος, οι θερμοκρασίες που προτείνονται για την αποτελεσματική θερμική αδρανοποίηση, με βάση τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, είναι όσον αφορά το στέλεχος Sabin 1

συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ οι θερμοκρασίες 80° C και 82° C για 30 min, ενώ όσον αφορά το στέλεχος Echo 12 συγκέντρωσης 10^6 TCID₅₀ οι θερμοκρασίες 75° C έως 82° C για 30 min. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνονται και από άλλες μελέτες (Sauerbrei et al., 2009; Shiomi et al., 2004; Strazynski et al., 2002). Για την χαμηλότερη ιϊκή συγκέντρωση, όπως είναι αναμενόμενο, απαιτείται και χαμηλότερη θερμοκρασία για την αποτελεσματική αδρανοποίηση του ιού (για παράδειγμα στο στέλεχος Sabin 1 παρατηρείται αδρανοποίηση του ιού ήδη από τους 50° C). Φυσικά απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση ώστε να επιβεβαιωθούν πλήρως αυτά τα αποτελέσματα, κάτι το οποίο προγραμματίζεται να πραγματοποιηθεί σε μελλοντικά πειράματα.

6. BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agol VI. Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology*. 1997; 8:77-84.
- Baltimore D, Eggers HJ, Franklin RM, Tamm I. Poliovirus-induced RNA polymerase and the effects of virus-specific inhibitors on its production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1963; 49:843-9.
- Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol*. 2015; 10(5):791-808.
- Bergelson JM. Receptors, p 73-86. In Ehrenfeld E, Domingo E, Roos RP (ed). *The picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC. 2010
- Blondel B, Duncan G, Couderc T, Delpeyroux F, Pavio N, Colbere-Garapin F. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J Neurovirol*. 1998; 4(1):1-26.
- Brown DM, Cornell CT, Tran GP, Nguyen JH, Semler BL. An authentic 3' noncoding region is necessary for efficient poliovirus replication. *J Virol*. 2005; 79(18):11962-73.
- Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Meth*. 1995; 53:25-36.
- Caspar DL, Klug A. Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962; 27:1-22.
- Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulias 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.
- Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*. 1997; 5:151-178.
- Dowdle, WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA, Wood DJ. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol*. 2003; 13(5):277-291.
- Yi EJ, Shin YJ, Kim JH, Kim TG, Chang SY. Enterovirus 71 infection and vaccines. *Clin Exp Vaccine Res*. 2017; 6(1): 4-1.
- Figlerowicz M, Alejska M, Kurzynska-Kokorniak A, Figlerowicz M. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews*. 2003; 23(4):488-518.
- Flanegan JB, Baltimore D. Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(9):3677-80.
- Friedrich F. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol*. 1996; 40(3):157-170.

- Palacios G, Oberste MS. Enteroviruses as agents of emerging infectious diseases. *Journal of neurovirology*. 2005; 11: 424-433.
- Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, Aubert-Combiescu A, Delpeyroux F, Crainic R. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*. 2000; 74(18):8434-8443.
- Jackson WT, Gibbings TH, Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol*. 2005; 3:e156.
- Jacobson SJ, Konings DA, Sarnow P. Biochemical and genetic evidence for a pseudoknot structure at the 3' terminus of the poliovirus RNA genome and its role in viral RNA amplification. *J Virol*. 1993; 67(6):2961-71.
- Jin M, Zhao Z, Wang X, Shen Z, Xu L, Yu Y, Qiu Z, Chen Z, Wang J, Huang A, Li J. The 40-80 nt region in the 5'-NCR of genome is a critical target for inactivating poliovirus by chlorine dioxide. *J Med Virol*. 2012; 84(3):526-35.
- Jin M, Shan J, Chen Z, Guo X, Shen Z, Qiu Z, Bin X, Wang Y, Zhu D, Wang X, Li J. Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environ Sci Technol*. 2013; 47(9):4590-7.
- Baggen J, Thibaut HJ, Strating JRPM, van Kuppeveld FJM. The life cycle of non-polio enteroviruses and how to target it. *Nature Reviews Microbiology*. 2018; 16:368-381.
- Kargar M, Sadeghipour S, Nategh R. Environmental surveillance of non-polio enteroviruses in Iran. *Virol J*. 2009; 6:149.
- Kew O, De L, Yang CF, et al. The role of virological surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. *Appl Virol Res*. 1993; 215-246.
- 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.
- Khetsuriani N, Lamonte-Fowlkes A, Oberste MS, Pallansch MA. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. *MMWR Surveill Summ*. 2006; 55:1-20.
- Kirkegaard K, Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*. 1986; 47(3): 433-443.
- Kirkegaard K, Semler BL. Genome replication II: the process, p 127-140. In Ehrenfeld E., Domingo E., Roos RP (ed), *The picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC. 2010.
- Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology, 6th Edition Vol:1*, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins. 2013.
- 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.
- Lee YF, Nomoto A, Detjen BM, Wimmer E. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(1):59-63.

- Leong LE, Cornell CT, Semler BL, in *Molecular Biology of Picornaviruses* (eds Semler B. L. & Wimmer E.) 187-197. ASM Press Washington DC. 2002.
- Levy HC, Bostina M, Filman DJ, Hogle JM. Cell entry: a biochemical and structural perspective, p87-104. In Ehrenfeld E., Domingo E., Roos R. P. (ed), *The picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC. 2010.
- Lipskaya G, Chervonskaya EA, Belova GI, Maslova SV, Kutateladze TN, Drozdov SG, Mulders M, Pallansch MA, Kew OM, Agol VI. Geographical genotypes (geotypes) of poliovirus case isolates from the former Soviet Union: relatedness to other known poliovirus genotypes. *J Gen Virol*. 1995; 76(Pt 7):1687-99.
- Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol*. 2003; 77(19):10423-31.
- Melnick JL. *Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses and Newer Enteroviruses*. *Virology*, Second Edition (ed. Fields B. N.)1990; 549-605.
- Melnick JL. Current Status of Poliovirus Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996; p. 293-300.
- Mulders MN, Lipskaya GY, van der Avoort HG, Koopmans MP, Kew OM, van Loon AM. Molecular epidemiology of wild poliovirus type 1 in Europe, the Middle East, and the Indian subcontinent. *J Infect Dis*. 1995; 171:1399-1405.
- Nomoto A, Detjen B, Pozzatti R, Wimmer E. The location of the polio genome protein in viral RNAs and its implication for RNA synthesis. *Nature*. 1977; 268(5617):208-213.
- 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.
- Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol*. 1988; 8(3): 1103-1112.
- Pettersson RF, Ambros V, Baltimore D. Identification of a protein linked to nascent poliovirus RNA and to the polyuridylic acid of negative-strand RNA. *J Virol*. 1978; 27(2): 357-365.
- Pilipenko EV, Gmyl AP, Agol VI. A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc Ac Res*. 1995; 23(11):1870-1875.
- Racaniello VR. *Picornaviridae: The Viruses and Their Replication*, in: Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*, 6th Edition Vol:1, Copyright: Lippincott Williams and Wilkins. 2013.
- Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*. 1987; 160:311-322.
- Romanova LI, Blinov VM, Tolskaya EA, Victorova EG, Kolesnikova MS, Guseva EA, Agol VI. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 1986; 155: 202-213.
- 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.

- Sauerbrei A, Wutzler P. Testing thermal resistance of viruses. *Arch Virol.* 2009; 154(1):115-9.
- Shiomi H, Urasawa T, Urasawa S, Kobayashi N, Abe S, Taniguchi K. Isolation and characterisation of poliovirus mutants resistant to heating at 50 degrees Celsius for 30 min. *J Med Virol.* 2004; 74(3):484-91.
- Stanway G. Structure, function and evolution of picornaviruses. *J Gen Virol.* 1990; 71(11): 2483-2501.
- Strazynski M, Krämer J, Becker B. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int J Food Microbiol.* 2002; 74(1-2):73-8.
- Summers DF, Maizel JV. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968; 59(3): 966-971.
- Simonet J, Gantzer C. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *J Appl Microbiol.* 2006; 100(4):862-70.
- Todd S, Towner JS, Brown DM, Semler BL. Replication-competent picornaviruses with complete genomic RNA 3' noncoding region deletions. *J Virol.* 1997; 71(11):8868-74.
- Tuthill TJ, Groppe E, Hogle JM, Rowlands DJ. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010; 343:43-89.
- van der Linden L, Wolthers KC, van Kuppeveld FJ. Replication and Inhibitors of Enteroviruses and Parechoviruses. *Viruses.* 2015;7(8):4529-62.
- Wimmer E, Hellen CU, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics.* 1993; 27:353-436.
- Jin Y, Zhang R, Wu W, Duan G. Antiviral and Inflammatory Cellular Signaling Associated with Enterovirus 71 Infection. *Viruses.* 2018; 10(4) pii: E155.
- Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, Hovi T, King AMQ, Knowles NJ, Lindberg AM, Pallansch MA, Palmenberg AC, Reuter G, Simmonds P, Skern T, Stanway G, Yamashita T. and ICTV Report Consortium, [ICTV Virus Taxonomy Profile: Picornaviridae](#), *Journal of General Virology*, 98: 2421-2422.
- Zheng DP, Zhang LB, Fang ZY, Yang CF, Mulders M, Pallansch MA, Kew OM. Distribution of wild type 1 poliovirus genotypes in China. *J Infect Dis.* 1993; 168:1361-1367.