ΤΜΗΜΑ
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΕΤΟΣ ΙΔΡΥΣΗΣ 1984

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ TOEHOLD SWITCH RNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΣΤΥΛΙΑΝΙΔΟΥ ΖΩΗ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΑΝΑΠΤΥΞΗ TOEHOLD SWITCH RNA ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

DEVELOPMENT OF TOEHOLD SWITCH RNA BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF WEST NILE VIRUS

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΝ): ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Α. ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ-ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ: ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας-Γενετικής-Διαγνωστικοί Δείκτες», του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε με την πολύτιμη βοήθεια ορισμένων ατόμων, καθένα από τα οποία έπαιξε ένα σημαντικό ρόλο στην εξέλιξή της. Θα ήταν λοιπόν σημαντική παράλειψη αν δεν εξέφραζα τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν σε αυτή την προσπάθεια.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της μεταπτυχιακής μου διατριβής, κ. Κώστα Ματθιόπουλο ο οποίος μου εμπιστεύτηκε την παρούσα εργασία, ενθαρρύνοντάς με και παροτρύνοντάς με σε όλο το χρονικό διάστημα εκπόνησής της. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Αντώνιο Γιακουντή, για την αμέριστη συμπαράστασή του, την καθοδήγησή του και την άμεση βοήθειά του όποτε τη χρειαζόμουν. Και οι δυο τους, ήταν πάντα εκεί όταν τους χρειαζόμουν, προσφέροντας απλόχερα τις ουσιώδεις συμβουλές τους και την καλή τους διάθεση. Χωρίς την πνευματική καθοδήγησή τους και την ηθική στήριξή τους η ολοκλήρωση αυτής της εργασίας δεν θα ήταν εφικτή. Είμαι παραπάνω από ευγνώμον απέναντί τους.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα υπόλοιπα (νυν και πρώην) μέλη του εργαστηρίου για την εξίσου πολύτιμη βοήθεια: την Κωνσταντίνα Τσουμάνη, την Μαριλένα Γρηγορίου, τον Αλέξανδρο Μπελαβίλα, τον Λευτέρη Ζορμπά, την Αντωνία Σπανομήτρου, την Ελένη-Ροντιόλα Μπεγκόλλι, τον Μιχάλη Παπαμαργαρίτη, τον Γρηγόρη Κόσκορο-Αδάμ, τον Νίκο Σιδέρη, την Κατερίνα Μπίκου, τον Μάριο Λάνγκε, την Βάσω Τσικλή, την Χριστίνα Παρασκευά, την Φωτεινή Τσακίρογλου και την Δήμητρα Βασιλακοπούλου. Χάρις σε αυτά τα άτομα, το κλίμα στο εργαστήριο (αλλά και εκτός εργαστηρίου) ήταν πάντα εύθυμο, ακόμη και στις δύσκολες μέρες.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μόσιαλο που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου εξεταστικής επιτροπής. Το εκτιμώ ιδιαιτέρως.

Σας ευχαριστώ πολύ όλους.

Στυλιανίδου Ζωή

Λούβεν, 2020

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (West Nile Virus, WNV) είναι ένας αναδυόμενος νευροτρόπος RNA ιός, που ανήκει στην οικογένεια των Flaviviridae. Διατηρείται στην φύση σε έναν ενζωοτικό κύκλο μεταξύ ορνιθοφιλικών κουνουπιών και πτηνών, με τα κουνούπια του γένους *Culex* (ή αλλιώς τα «κοινά» κουνούπια της πόλης) να αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του ιού. Ο ιός, με το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, μπορεί να μεταδοθεί και σε ορισμένα θηλαστικά, όπως ο άνθρωπος και τα ιπποειδή. Ωστόσο, κύρια φυσική δεξαμενή του ιού αποτελούν τα πτηνά, διότι αναπτύσσουν υψηλή ιαιμία τεταμένης διάρκειας η οποία επιτρέπει την περεταίρω μόλυνση των κουνουπιών. Από την άλλη, ο άνθρωπος και τα άλλα θηλαστικά αναπτύσσουν χαμηλά επίπεδα παρωδικής ιαιμίας που δεν επιτρέπουν την μετάδοση του ιού και για τον λόγο αυτό θεωρούνται αδιέξοδοι ή ευκαιριακοί ξενιστές.

Στον άνθρωπο, από την στιγμή της μόλυνσης ο χρόνος επώασης της νόσου κυμαίνεται σε 2 με 14 ημέρες. Η πλειονότητα των ανθρώπινων λοιμώξεων με τον ιό (σε ποσοστό που αγγίζει το 80%) είναι ασυμπτωματικές. Περίπου το 20% των ατόμων που έχουν μολυνθεί εκδηλώνουν πυρετό του Δυτικού Νείλου, που αποτελεί την ήπια μορφή της νόσου και η συμπτωματολογία της ομοιάζει την γριπώδη συνδρομή. Δυστυχώς, σε ένα ποσοστό μικρότερο του 1% ο ιός καταφέρνει να προσβάλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) αναπτύσσοντας νευροδιεισδυτική νόσο, με εκδηλώσεις εγκεφαλίτιδας, μηνιγγίτιδας και πολύ σπανιότερα οξείας χαλαρής παράλυσης.

Ο ιός του Δυτικού Νείλου θεωρείται πλέον ενδημικός σε αρκετές περιοχές του κόσμου, κυρίως σε Αμερική και Νότια Ευρώπη συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. Συγκεκριμένα, από το 2010 και μετά, καταγράφονται ετησίως κρούσματα του ιού στην χώρα μας, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα (κυρίως πτηνά και ιπποειδή). Ειδικά το 2018 σημειώθηκε στην Ελλάδα αυξημένος αριθμός κρουσμάτων συγκριτικά με τα προηγούμενα έτη, με πρώιμη έναρξη της κυκλοφορίας του ιού. Για την ακρίβεια, κατά το 2018 δηλώθηκαν συνολικά 316 περιστατικά λοίμωξης στην χώρα μας, όπου στα 73 από αυτά σημειώθηκε προσβολή στο ΚΝΣ, ενώ δυστυχώς τα 50 κατέληξαν σε θάνατο. Την ίδια χρονιά κατεγράφησαν 15 κρούσματα σε ιπποειδή. Ομοίως, ο αριθμός των κρουσμάτων κατά την περίοδο του 2019 ήταν εξίσου αυξημένος στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα, διαγνώστηκαν συνολικά 227 κρούσματα λοίμωξης από τον ιό, εκ των οποίων τα 140 παρουσίασαν εκδηλώσεις στο ΚΝΣ, ενώ τα 32 κατέληξαν σε θάνατο. Επιπλέον, σημειώθηκαν 23 κρούσματα σε ιπποειδή.

Η εργαστηριακή διάγνωση της μόλυνσης από ιό του Δυτικού Νείλου βασίζεται σε δύο κύριες προσεγγίσεις: α) σε ορολογικές μεθόδους και β) στην ανίχνευση του ιικού RNA. Στην πρώτη περίπτωση, η οποία βασίζεται στην χρήση ή στην ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων, κυριαρχεί η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλους συγγενικούς ιούς Flavi. Κατά αυτόν τον τρόπο, ένα δείγμα μπορεί να αξιολογηθεί ως ψευδώς θετικό, στην περίπτωση που ελλοχεύει μόλυνση με κάποιον άλλον ιό Flavi. Από την άλλη, οι συνήθεις μοριακές μέθοδοι, όπως η RT-PCR, που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση του γενετικού υλικού του ιού αυξάνουν πολύ το κόστος της διάγνωσης, ενώ παράλληλα απαιτούν την χρήση ειδικού εξοπλισμού. Πέρα από την κλινική ανίχνευση, η υποδιάγνωση και το μεγάλο κόστος δυσχεραίνουν και την πραγματοποίηση μιας ολοκληρωμένης επιδημιολογικής μελέτης του γενικού ανθρώπινου πληθυσμού, της ορνιθολογικής δεξαμενής, των κουνουπιών-διαβιβαστών του ιού και των άλλων ευκαιριακών ξενιστών.

Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος της Συνθετικής Βιολογίας έχει επιτρέψει την ανάπτυξη νέων ευέλικτων μεθόδων με υψηλή διαγνωστική αξία. Το 2016, ο Pardee και οι συνεργάτες του γνωστοποίησαν την ανάπτυξη μίας διαγνωστικής μεθόδου βασισμένη στην Συνθετική Βιολογία, για την γρήγορη, ειδική και κυρίως χαμηλού κόστους ανίχνευση του ιού Zika, συγγενικού ιού του WNV. Αξιοποιώντας την τεχνολογία των Toehold Switch RNAs, δημιούργησαν εξειδικευμένους βιοαισθητήρες RNA, όπου παρουσία του ιικού RNA στόχου επάγουν την οπτικοποίηση του θετικού αποτελέσματος με γυμνό μάτι. Η προσέγγιση που περιέγραψαν μπορεί να επεκταθεί και να τροποποιηθεί για την ανίχνευση οποιουδήποτε αναδυόμενου μολυσματικού παράγοντα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, η μεθοδολογία που περιεγράφηκε από τον Pardee το 2016, προσαρμόστηκε και τροποποιήθηκε αναλόγως για την προσπάθεια ανίχνευσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Για την οπτικοποίηση της ανίχνευσης αξιοποιήθηκαν δύο γονίδια αναφοράς: το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (GFP) και το γονίδιο Λουσιφεράσης. Τα πρώτα αποτελέσματα αυτής της προσπάθειας απεδείχθησαν ελπιδοφόρα και πολλά υποσχόμενα. Τα Toehold Switch RNAs που κατασκευάστηκαν και δοκιμάστηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή διατριβή κατάφεραν να ανιχνεύσουν το ιικό RNA με εξαιρετική ευαισθησία και ενδιαφέρουσα εξειδίκευση, αποδεικνύοντας την εφικτότητα της ιδέας. Μελλοντικά, μένει η δοκιμή περεταίρω Toehold Switch RNAs για την εύρεση αυτών που επιδεικνύουν υψηλότερη εξειδίκευση, ενώ αυτά διατηρούν την επιθυμητή ευαισθησία. Αυτή η νέα προσέγγιση υπόσχεται υψηλή εξειδίκευση, ενώ έρχεται να μειώσει το κόστος της ανίχνευσης του ιού του Δυτικού Νείλου, όχι μόνο σε κλινικό επίπεδο αλλά και σε επίπεδο επιδημιολογικής μελέτης του ιού.

Λέξεις-κλειδιά: WNV, διάγνωση, χαμηλού-κόστους ανίχνευση, επιτήρηση, συνθετική βιολογία

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ABSTRACT

West Nile Virus (WNV) is an emerging neurotropic RNA virus and is a member of the genus *Flavivirus* in the *Flaviviridae* family. The virus is maintained in nature in an enzootic cycle involving many avian and mosquito species, predominantly *Culex* spp. Disease can also be caused in humans and other mammals, especially horses, through the bite of infected mosquitoes. Birds are the principal amplifying hosts of WNV; they develop viremia levels of high magnitude with long duration, sufficient to infect ornithophilic mosquitoes. On the contrary, humans and the rest of the mammals develop low levels of transient viremia, insufficient to infect the feeding mosquitoes. Hence, they are considered to be incidental or dead-end hosts of WNV.

In humans, the incubation period for WNV disease ranges from 2 to 14 days. The majority of infected people, an estimated of 80%, are asymptomatic. About 20% of infected people develop a mild febrile infection called West Nile fever, with flu-like symptoms. Less than 1% of infected people develop neuroinvasive disease, such as meningitis or encephalitis.

West Nile virus is now endemic in many parts of the world, particularly in USA and southern Europe, including Greece. Specifically, since 2010, cases of West Nile virus infection in both humans and animals have been recorded in various regions of Greece, meaning that the WNV has been established in our country. During the 2018 transmission season, it was recorded an increased number of cases and an early onset of WNV circulation in our country. Notably, an unpresented number of 316 and 227 WNV infection cases were recorded in 2018 and 2019, respectively.

Laboratory diagnosis of the WNV presence is generally accomplished by two main approaches: a) serological methods and b) viral RNA detection. Regarding the serological approach, diagnosis is extremely challenging due to cross-reactivity with other related flaviviruses. As a result, accurate diagnosis requires nucleic acid-based detection methods, such as RT-PCR. However, such techniques require technical expertise and equipment, but most importantly they are relatively expensive. The limited diagnostic value, in combination with the high cost, hold back the clinical diagnosis and the surveillance of WNV in bird, mosquito and human populations.

During the last decades, Synthetic Biology is increasingly transitioning to the diagnostics, via engineering and repurposing natural biological components, allowing the development of extremely sensitive and versatile methods of detection. In 2016, Pardee and his colleagues announced the development of programmable diagnostic RNA sensors for the rapid, inexpensive and sequence-specific detection of Zika virus. By taking advantage of the Toehold Switch RNA's technology, they came up with programmable synthetic riboregulators, that induce the expression of a reference gene, in presence of the trigger ZIKV RNA. This allows the immediate visualization of the positive result, due to the colorimetric output. These sensors are a solution for the rapid response to any emerging outbreak caused by any potential infectious agent.

In the present study, the method that was described by Pardee, was modified and adapted accordingly for the detection of West Nile Virus. For the visualization of the output, two different reference genes were deployed: the Green Fluorescence Protein (GFP) gene and the Luciferase gene. The first trials of this attempt proved to be encouraging and well-promising. The Toehold Switch RNAs that were constructed and tested during this study, managed to detect the WNV RNA successfully, with a remarkable sensitivity and interesting specificity. In the future, more Toehold Switch RNAs are planned to be tested, to find those that exhibit high specificity, while retaining the desired sensitivity. This approach promises to reduce the cost and increase the diagnostic value, contributing to a better clinical diagnosis and surveillance of West Nile virus in humans and the other animals, as well as birds and mosquitoes.

Keywords: WNV, diagnosis, low-cost detection, surveillance, synthetic biology

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 10
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ 10
1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ 10
1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ 12
1.3.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ 12
1.3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ 14
1.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ WNV 15
1.5. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ WNV 17
1.5.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ WNV ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ 19
1.6 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ WNV 20
1.6.1 ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ WNV ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ 21
1.6.2 ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ WNV 22
1.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ WNV 24
1.7.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ 24
1.7.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΠΤΗΝΑ, ΙΠΠΟΕΙΔΗ, ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ 25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο} 27
2.1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ 27
2.1.1 ΡΙΒΟΔΙΑΚΟΠΤΕΣ 27
2.1.2 TOEHOLD SWITCHES 28
2.1.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ZIKV ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ TOEHOLD SWITCHES 29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} 32
3.1 ΣΚΟΠΟΣ 32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 33
4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 33
4.1.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ TOEHOLD SWITCHES 33
4.1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ 34
4.1.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA 35
4.1.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ DNase 35
4.1.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΛΩΝΩΝ cDNA 36
4.1.6 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ qPCR 36
4.1.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΙΙΚΟΥ RNA-MOLES ΙΟΥ 37
4.1.8 IN VITRO TRANSCRIPTION-TRANSLATION 37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 39
5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 39
5.1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ 39

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

5.1.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ 40
5.1.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ qPCR 40
5.1.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΙΙΚΟΥ RNA-MOLES ΙΟΥ 41
5.1.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ WNV TOEHOLD SWITCH RNA ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΓΟΝΙΔΙΟ GFP 42
5.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ WNV TOEHOLD SWITCH RNA ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΓΟΝΙΔΙΟ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ 44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 46
6.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ 46
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 50
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ 59

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου (WNV) απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1937 στην επαρχία του Δυτικού Νείλου στην Ουγκάντα, από το αίμα μίας γυναίκας που εμφάνισε εμπύρετη νόσο. Πρόκειται για έναν RNA ιό θετικής πολικότητας, με το γενετικό του υλικό να κυμαίνεται περίπου στα 11.000 νουκλεοτίδια και το μέγεθος του ιοσωματίου προσεγγίζει τα 50nm (1). Ο WNV μεταδίδεται στους ανθρώπους κυρίως με το τσίμπημα μολυσμένου κουνουπιού, με τα κουνούπια του γένους *Culex* να αποτελούν τους κύριους διαβιβαστές του ιού. Κύρια φυσική δεξαμενή του ιού είναι τα πτηνά, ενώ οι άνθρωποι θεωρούνται αδιέξοδοι ξενιστές καθότι αναπτύσσουν χαμηλή ιαιμία, η οποία δεν είναι επαρκής για την επακόλουθη μόλυνση ενός νέου κουνουπιού (2).

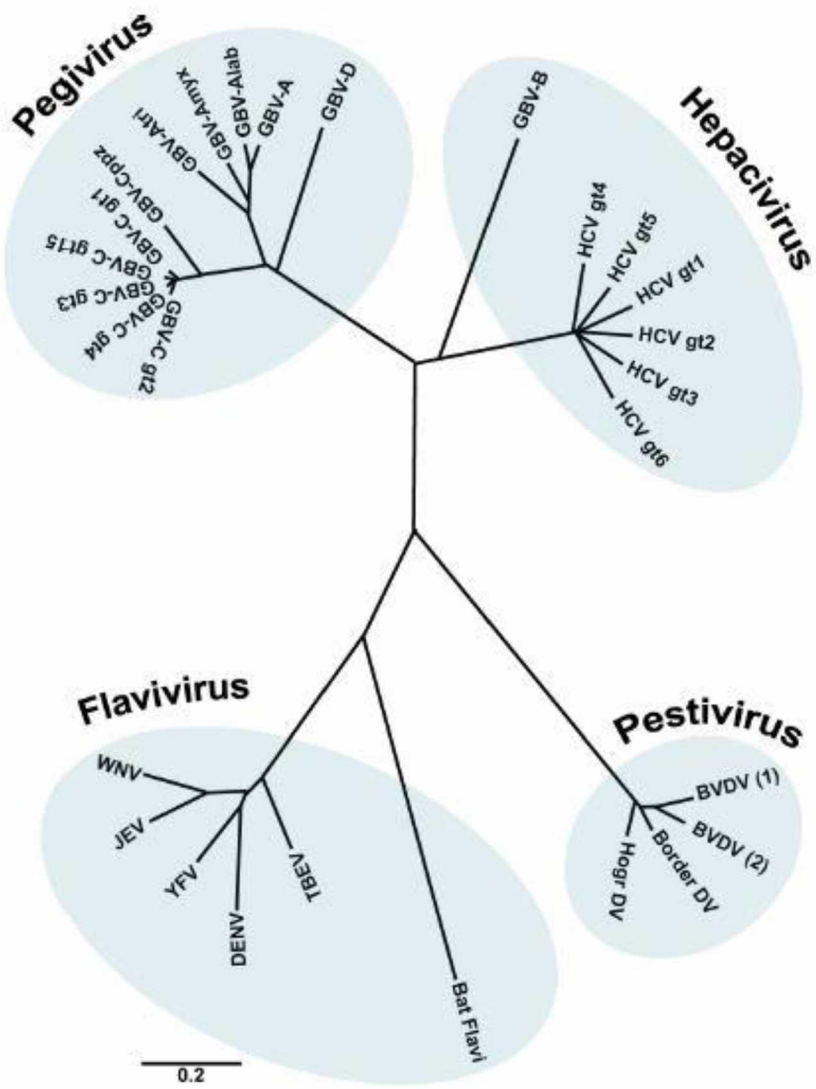
Κατά την μόλυνση ενός ατόμου με τον ιό, ο χρόνος επώασης της νόσου υπολογίζεται στις 2-14 μέρες, διάστημα κατά το οποίο εκδηλώνονται και τα συμπτώματα (1). Για την ακρίβεια, το μεγαλύτερο ποσοστό των μολυνθέντων ατόμων παραμένει πλήρως ασυμπτωματικό και κατά πάσα πιθανότητα δεν καταλαβαίνει ότι έχει έλθει σε επαφή με τον ιό. Ένα μικρότερο ποσοστό, που προσεγγίζει το 20%, εκδηλώνει την ήπια μορφή της νόσου η οποία ομοιάζει την συμπτωματολογία γριπώδους συνδρομής. Στο 1% των μολυνθέντων, ο ιός προσβάλλει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) με αποτέλεσμα την εκδήλωση νευροδιεισδυτικής νόσου. Η προσβολή του ΚΝΣ αποτελεί και την σοβαρότερη έκφανση της νόσου, καθώς η κλινική εικόνα μπορεί να εξελιχθεί σε μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα ή οξεία χαλαρή παράλυση (1).

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι πλέον ενδημικός σε αρκετές χώρες παγκοσμίως, χαρακτηριστικά στην Αμερική και στην Νότια Ευρώπη, ενώ επίσης ενδημεί και στην χώρα μας. Συγκεκριμένα, την τελευταία δεκαετία, καταγράφονται κρούσματα του ιού ετησίως, σχεδόν σε όλες τις περιφέρειες, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ιός έχει πλέον εγκατασταθεί στην χώρα μας (3). Κατά συνέπεια, η εμφάνιση νέων κρουσμάτων είναι αναμενόμενη και στα επόμενα έτη, ιδιαίτερα κατά την περίοδο των θερινών μηνών η οποία συμπίπτει και με την περίοδο κυκλοφορίας των κουνουπιών του γένους *Culex*. Περισσότερα στοιχεία για την παγκόσμια αλλά και την εγχώρια επιδημιολογία του ιού παρατίθενται σε παρακάτω ενότητες της παρούσας εργασίας.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ

Ο WNV ανήκει στην οικογένεια Flaviviridae. Σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ταξινόμησης των Ιών (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV), η οικογένεια Flaviviridae συνίσταται από 4 γένη: α) το γένος flavi, β) το γένος hepaci, γ) το γένος pesti και δ) το γένος pegi (Εικόνα 1). Ο WNV κατατάσσεται στο πρώτο και μεγαλύτερο γένος, σε αυτό των ιών flavi, μαζί με άλλους 50 περίπου, συμπεριλαμβανομένων των συγγενικών του ιών Zika (ZIKV), Dengue (DENV) και Yellow Fever (YFV). Οι ιοί του γένους flavi διαχωρίζονται περεταίρω βάσει των διαβιβαστών με τους οποίους μεταδίδονται. Έτσι, μπορούν να ομαδοποιηθούν σε ιούς που μεταδίδονται με αρθρόποδα όπως τα κουνούπια (αρμποϊοί, **ar**thropod-**bo**rne viruses ή **arbo**viruses) και σε ιούς που μεταδίδονται με κρότωνες (tick-borne viruses). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, κύριος διαβιβαστής του ιού του Δυτικού Νείλου είναι τα κουνούπια του γένους *Culex*, συνεπώς πρόκειται για έναν αρμποϊό (1).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο της οικογένειας των Flaviviridae (4).

Ο WNV ανήκει στο αντιγονικό σύμπλεγμα της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας (JE Serocomplex), μαζί με τους Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis Virus, Murrey Valley Encephalitis Virus και πρόκειται για ιούς που συχνά προκαλούν επιδημίες σε ανθρώπους αλλά και σε ζώα (5).

Οι φυλογενετικές αναλύσεις των αλληλουχιών του ιικού γονιδιώματος ανέδειξαν ότι τα διάφορα στελέχη του ιού ταξινομούνται σε τουλάχιστον 8 γενετικούς εξελικτικούς κλάδους (lineages) (6). Παρ' όλα αυτά, τα στελέχη που είναι ικανά να προκαλέσουν νόσο στον άνθρωπο κατατάσσονται στον 1ο και 2ο κλάδο (lineages 1 και 2)(7):

-1ος γενετικός εξελικτικός κλάδος (Lineage 1): Στον κλάδο αυτό ανήκουν τα περισσότερα κυκλοφορούντα στελέχη και απομονώθηκαν κυρίως από Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Αφρική και Βόρεια Αμερική (Δυτικό ημισφαίριο). Μέχρι πρόσφατα θεωρούνταν και τα πιο παθογόνα στελέχη του ιού. Ο κλάδος 1 χωρίζεται περεταίρω σε 3 υποκλάδους: τους 1a, 1b και 1c. Στον κλάδο 1a συγκαταλέγονται απομονώσεις του ιού από Αφρική, Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Ρωσία και Αμερική. Ο κλάδος 1b αποτελείται κυρίως από απομονώσεις ενός υποτύπου του ιού του Δυτικού Νείλου, του

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ιού Kunjin, ο οποίος απομονώθηκε από την Αυστραλία. Ο κλάδος 1c περιλαμβάνει στελέχη που έχουν απομονωθεί από την Ινδία (8).

-2ος γενετικός εξελικτικός κλάδος (Lineage 2): Μέχρι το 2004 απομονώσεις του 2ου κλάδου προέρχονταν κυρίως από την Υποσαχάρια Αφρική και την Μαδαγασκάρη, αλλά έκτοτε έχουν υπάρξει κρούσματα, σε ζώα αλλά και σε ανθρώπους, αρχικά στην Ουγγαρία και στην συνέχεια στην Ρωσία, στην και στην Κύπρο (7,8,9) Τα αυξανόμενα κρούσματα επέτρεψαν τις ακριβέστερες φυλογενετικές μελέτες, οι οποίες αποκάλυψαν ότι ο 2ος κλάδος χωρίζεται περεταίρω σε 4 υποκλάδους: 2a-2d (10).

1.3 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

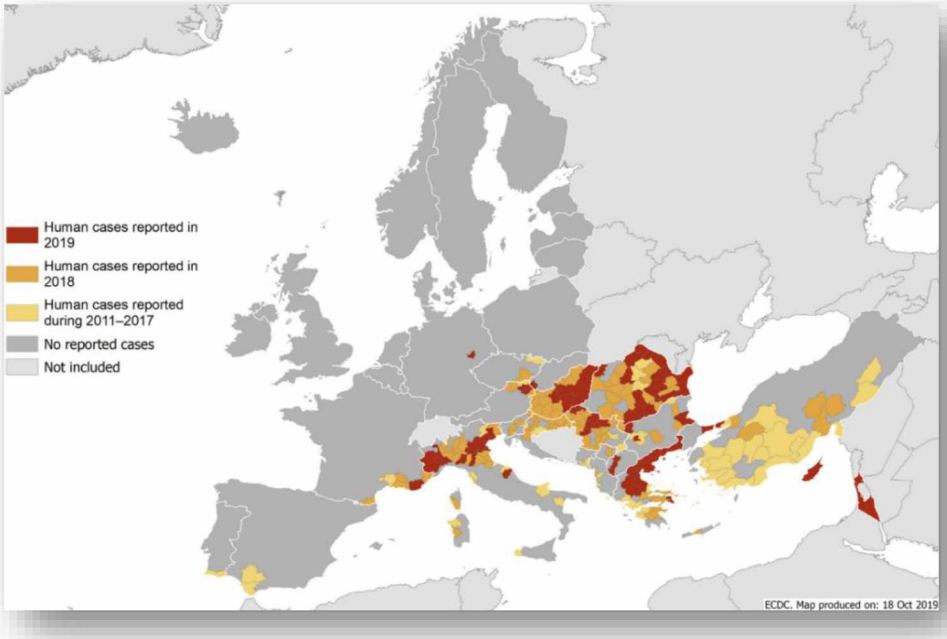
1.3.1 ΠΑΓΚΟΣΜΙΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1937 στην Ουγκάντα, στην επαρχία του Δυτικού Νείλου από μία γυναίκα που εμφάνισε εμπύρετη νόσο. Όμως, η επιδημιολογία και οικολογία του ιού πρωτοχαρακτηρίστηκε λεπτομερώς τις δεκαετίες 1950 και 1960, όπου και σημειώθηκαν αρκετά κρούσματα στην Μεσογειακή λεκάνη. Για την ακρίβεια, το 1950 ο ιός απομονώθηκε ξανά στην Αίγυπτο κι έκτοτε ο ιός εξαπλώθηκε παγκοσμίως, προσβάλλοντας ανθρώπους, πτηνά και ιπποειδή (11). Το 1951, στο Ισραήλ, σημειώθηκε η πρώτη επιδημία σε ανθρώπους, ενώ επίσης κατεγράφησαν και τα πρώτα περιστατικά προσβολής στο ΚΝΣ (12). Τα επόμενα χρόνια, σημειώθηκαν κρούσματα του ιού σε Ρωσία, Ισπανία, Γαλλία, Νότια Αφρική και Ινδία. Το διάστημα 1970-1980 τα κρούσματα που σημειώθηκαν παγκοσμίως ήταν αρκετά μειωμένα. Όμως, από τα μέσα της δεκαετίας του 90 και μετά, ο αριθμός των επιδημιών αυξήθηκε αισθητά. Από το 1996 κι έκτοτε προέκυψαν σημαντικές επιδημίες σε Ευρώπη και Μέση Ανατολή, με κυριότερες το 1996 στην Ρουμανία και Τυνησία, το 1996 στο Μαρόκο, το 1998 σε Ιταλία και Ισραήλ και το 1999 στην Ρωσία (12). Το 1999, ο ιός έφτασε για πρώτη φορά στο δυτικό ημισφαίριο, όπου και περιγράφηκαν αυξημένα κρούσματα νευροδιεισδυτικής νόσου στη Νέα Υόρκη (13). Μέσα στην επόμενη πενταετία ο ιός εξαπλώθηκε σε Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, Καναδά, Καραϊβική και Λατινική Αμερική. Εκεί, πλέον η νόσος θεωρείται ενδημική καθώς ο ιός έχει εγκατασταθεί στην Αμερικανική ήπειρο (14).

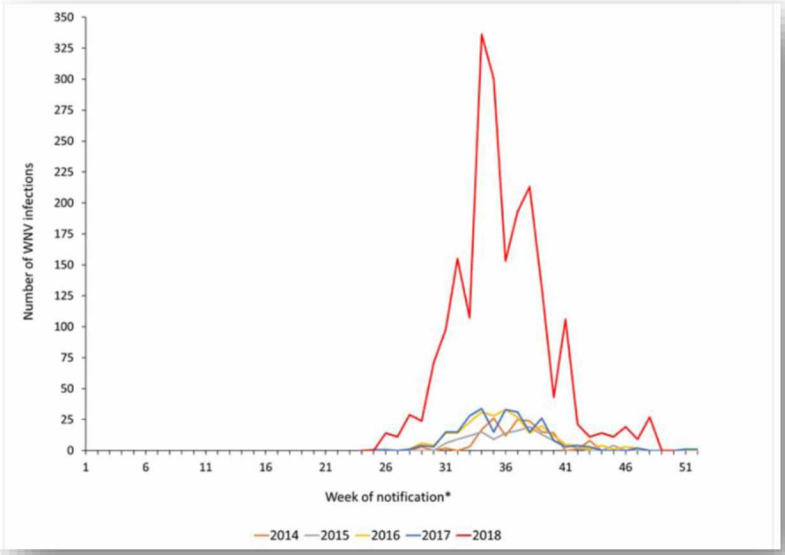
Από το 2000 και μετά, έχουν υπάρξει αρκετές αναφορές κρουσμάτων με εκδηλώσεις νευροδιεισδυτικής νόσου παγκοσμίως. Οι πιο αξιοσημείωτες αναφέρθηκαν στην Γαλλία (2000 και 2003), στην Αμερική (2002 και 2012), στην Ιταλία (2008 και 2009), στην Ουγγαρία (2008), στην Ρωσία (2007, 2010 και 2012), στην Ελλάδα (2010 και 2018) (14).

Το 2018, σημειώθηκαν στην Ευρωπαϊκή ένωση τα περισσότερα κρούσματα σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη. Συνολικά, έγινε η αναφορά 2.083 περιστατικών, αριθμός ο οποίος ξεπερνά τον συνολικό αριθμό κρουσμάτων των τελευταίων 7 χρόνων (n=1.832) (Εικόνες 2, 3) (15).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 2: Κατανομή των ανθρώπινων κρουσμάτων WNV στις χώρες της Ευρωπαϊκής ένωσης και σε γειτονικές χώρες, στις περιόδους 2019, 2018, 2011-2017. Με κεραμμυδί επισημαίνονται οι χώρες που υπήρξαν ανθρώπινα κρούσματα κατά το έτος 2019. Με **πορτοκαλί** επισημαίνονται οι χώρες που υπήρξαν ανθρώπινα κρούσματα κατά το έτος 2018. Με κίτρινο επισημαίνονται οι χώρες που υπήρξαν ανθρώπινα κρούσματα κατά την διάρκεια 2011-2017. Με **σκούρο γκρι** υποδεικνύονται οι χώρες στις οποίες δεν έχουν αναφερθεί περιστατικά λοίμωξης WNV (15).



Εικόνα 3: Αριθμός κρουσμάτων λοίμωξης WNV στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης ανά εβδομάδα, για τα έτη 2014-2018. Ο αριθμός κρουσμάτων που σημειώθηκαν το 2018 στις χώρες τις Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι ο μεγαλύτερος μέχρι στιγμής, συγκριτικά με τα συνολικά περιστατικά των προηγούμενων ετών (15).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

1.3.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

[1]**Λοιμοτοξικότητα (virulence):** Η ικανότητα ενός παθογόνου να μολύνει και να προκαλέσει βλάβη στον ξενιστή. Μπορεί να εκτιμηθεί με βάση τον δείκτη θνησιμότητας.

Η πρώτη αναφορά ανθρώπινου περιστατικού λοίμωξης WNV στην Ελλάδα έγινε το 2010. Την χρονιά αυτή εμφανίστηκε για πρώτη φορά επιδημία στον ελλαδικό χώρο, σε ανθρώπους και ζώα, με επίκεντρο στην περιοχή της Κεντρικής Μακεδονίας. Παρ' όλα αυτά, παλαιότερες επιδημιολογικές μελέτες είχαν αποκαλύψει την ύπαρξη αντισωμάτων κατά του ιού στον γενικό πληθυσμό της Κεντρικής Μακεδονίας. Από την ταυτοποίηση των στελεχών που απομονώθηκαν ανεδείχθη ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της επιδημίας ανήκε στον 2ο γενετικό εξελικτικό κλάδο. Τα στελέχη αυτά διέθεταν στενή φυλογενετική σχέση με τα στελέχη της επιδημίας στην Ουγγαρία, το 2004. Μάλιστα, το ελληνικό στέλεχος βρέθηκε ότι διαθέτει την αμινοξική υποκατάσταση H249P στην πρωτεΐνη NS3, η οποία πιθανώς παίζει ρόλο στην αυξημένη λοιμοτοξικότητα[1] αυτού (14,16) Τις επόμενες χρονιές ο ιός εξαπλώθηκε νοτιότερα, σε Θεσσαλία και Αττική. Από τότε και κάθε χρόνο, με εξαίρεση τα έτη 2015 και 2016, καταγράφονται κρούσματα της λοίμωξης από WNV σε ανθρώπους και ζώα σχεδόν σε όλες τις Περιφέρειες (*Πίνακας 1*). Αυτό υποδηλώνει ότι ο ιός έχει πλέον εγκατασταθεί στον ελλαδικό χώρο και κατ' επέκταση αναμένεται να συνεχιστεί η κυκλοφορία του και στα επόμενα έτη (3).

Το 2018, σημειώθηκε αυξημένος αριθμός κρουσμάτων σε σύγκριση με τα προηγούμενα έτη, τόσο στην χώρα μας καθώς και σε γειτονικές ευρωπαϊκές χώρες, με πρώιμη έναρξη της κυκλοφορίας του ιού, ήδη από το πρώτο δεκαπενθήμερο του Μαΐου. Συγκεκριμένα, σχεδόν το 77% των κρουσμάτων που δηλώθηκαν (ν=243 ασθενείς) εκδήλωσε νευροδιεισδυτική νόσο, ενώ ένα ποσοστό που αγγίζει το 16% συνολικού αριθμού των καταγεγραμένων κρουσμάτων κατέληξε σε θάνατο. Την ίδια χρονιά καταχωρήθηκαν 15 κρούσματα λοίμωξης σε ιπποειδή. Τα κρούσματα καταγράφηκαν στις Περιφέρειες Αττικής, Κεντρικής Μακεδονίας, Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, Θεσσαλίας, Στερεάς Ελλάδας, Κρήτης, Πελοποννήσου, Έβρου και Φθιώτιδας, με βασικά επίκεντρα τις Περιφέρειες Αττικής και Κεντρικής Μακεδονίας (Εικόνα 4). Σε όλες τις προηγούμενες Περιφέρειες που αναφέρθηκαν, εκτός του Έβρου και της Φθιώτιδος, είχαν καταγραφεί και στο παρελθόν ανθρώπινα κρούσματα της λοίμωξης από WNV (3).

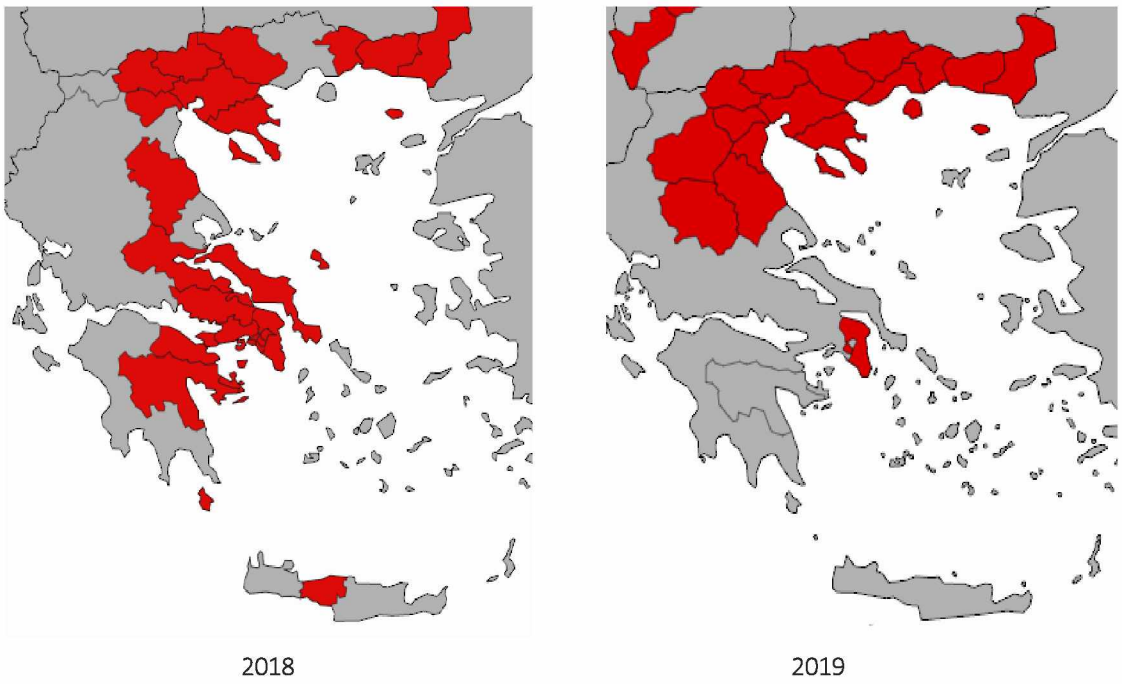
Κρούσματα λοίμωξης από τον ιό του ΔΝ	Έτος								
	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Σύνολο κρουσμάτων	**262**	**100**	**161**	**86**	**15**	**0**	**0**	**48**	**316**
Με προσβολή του ΚΝΣ*	197	75	109	51	14	0	0	28	243
Χωρίς προσβολή του ΚΝΣ	65	25	52	35	1	0	0	20	73
Θάνατοι κρουσμάτων	35	9	18	11	6	0	0	5	50

*εγκεφαλίτιδα ή/και μηνιγγίτιδα ή/και οξεία χαλαρή παράλυση

Πίνακας 1. Πίνακας κρουσμάτων λοίμωξης από WNV στην χώρα μας την τελευταία δεκαετία (3).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Για ακόμη μια χρονιά, το 2019 τα ανθρώπινα περιστατικά στην χώρα μας ήταν και πάλι αυξημένα. Σύμφωνα με την ετήσια έκθεση επιδημιολογικής επιτήρησης του ΚΕΕΛΠΝΟ, η Ελλάδα κατέχει την πρωτιά συγκριτικά με τις υπόλοιπες Ευρωπαϊκές χώρες, καθώς κατεγράφησαν συνολικά 227 κρούσματα του ιού, με την πλειονότητα των κρουσμάτων να εντοπίζεται στην Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα, περίπου το 62% των δηλωθέντων περιστατικών (ν=140 ασθενείς) εκδήλωσαν νευροδιεισδυτική νόσο, ενώ κατέληξαν σε θάνατο 35 ασθενείς. Το ποσοστό των θανόντων για την περίοδο μετάδοσης 2019 άγγιξε και πάλι το 16% των δηλωθέντων κρουσμάτων, όπως σημειώθηκε και στην περίοδο του 2018. Σε αυτό το σημείο πρέπει να υπενθυμιστεί ότι η πιθανότητα προσβολής του ΚΝΣ από τον ιό είναι μικρότερη του 1%. Ο λόγος που τα ποσοστά νευροδιεισδυτικής νόσου που παρατηρήθηκαν τα τελευταία έτη στην χώρα μας είναι κατά πολύ υψηλότερα, καθώς αναφέρονται στον συνολικό αριθμό των κρουσμάτων που καταγράφηκαν. Πρόκειται για περιστατικά τα οποία εμφάνισαν συμπτωματολογία και συνεπώς προχώρησαν σε διαδικασία διάγνωσης. Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μολυνθέντων ατόμων παραμένουν ασυμπτωματικοί συνεπάγεται και την μη-καταγραφή των συγκεκριμένων περιστατικών μόλυνσης, καθώς δεν υπάρχει ερέθισμα για διαδικασία διάγνωσης. Επιπλέον, δηλώθηκαν συνολικά 23 περιστατικά λοίμωξης σε ιπποειδή (3).



Εικόνα 4: Κατανομή των ανθρώπινων κρουσμάτων WNV στον Ελλαδικό χώρο κατά το έτος 2018 (αριστερά) και το 2019 (δεξιά) (3).

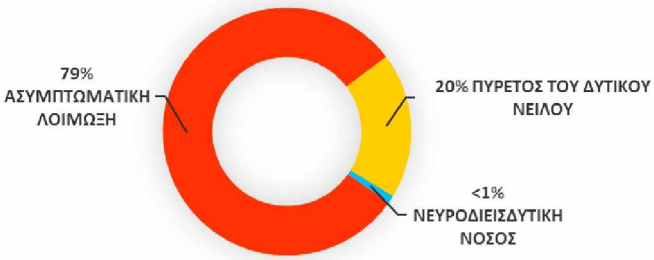
1.4 ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ WNV

Ο χρόνος επώασης της νόσου από την στιγμή της μόλυνσης κυμαίνεται σε 2 με 14 ημέρες, διάστημα το οποίο μπορεί να επεκταθεί έως και κάποιες εβδομάδες στην περίπτωση των ανοσοκατεσταλμένων ατόμων (2). Το μεγαλύτερο ποσοστό των ανθρώπινων λοιμώξεων με WNV, που αγγίζει το 80%, είναι ασυμπτωματικές (2).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Περίπου 20% των μολυνθέντων ατόμων εκδηλώνουν την ήπια μορφή της νόσου, γνωστή ως «πυρετός του Δυτικού Νείλου», με τα άτομα αυτά να εκδηλώνουν συμπτώματα όμοια της γριπώδους συνδρομής:

- Πυρετός
- Κεφαλαλγία
- Μυαλγίες, αρθραλγίες
- Εξάνθημα
- Κακουχία, γενικευμένη αδυναμία
- Ναυτία, Έμετος, Διάρροια



Εικόνα 13. Εκδηλώσεις της λοίμωξης από WNV.

Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν χαρακτηριστικά συμπτώματα με τα οποία εκδηλώνεται η νόσος, καθιστά πολλές φορές αδύνατη την διάκρισή της από άλλες μολυσματικές νόσους, μέσω κλινικής εξέτασης. Τα συμπτώματα της νόσου διαρκούν συνήθως 2-5 ημέρες, ενώ το αίσθημα αδυναμίας μπορεί να παραμείνει μέχρι και για έναν μήνα (2,4,16).

Σε ένα ποσοστό μικρότερο του 1% των ατόμων που μολύνονται, ο ιός καταφέρνει να διεισδύσει στο ΚΝΣ αναπτύσσοντας νευροδιεισδυτική νόσο, η οποία περιλαμβάνει εκδηλώσεις εγκεφαλίτιδας, μηνιγγο-εγκεφαλίτιδας ή άσηπτης μηνιγγίτιδας. Σπανιότερα, μπορεί να εκδηλωθεί οξεία χαλαρή παράλυση ή ακόμη και συνδυασμός των ανωτέρω. Τα κύρια συμπτώματα της νευροδιεισδυτικής νόσου περιλαμβάνουν:

- Πυρετό
- Κεφαλαλγία
- Διαταραχές συνείδησης
- Σπασμούς, επιληπτικές κρίσεις
- Διαταραχές κινητικότητας
- Σοβαρή μυϊκή αδυναμία
- Μυαλγίες, αρθραλγίες
- Οπτικές διαταραχές

Η θνητότητα της νευροδιεισδυτικής νόσου κυμαίνεται κατά μέσο όρο περίπου στο 10%, με το ποσοστό να αυξάνεται σε ασθενείς ηλικίας μεγαλύτερης των 70 ετών (2,4,16).

Δεν υπάρχει ακόμη ειδική θεραπεία για την λοίμωξη από τον ιό, ούτε κάποιο διαθέσιμο προφυλακτικό εμβόλιο. Στις ήπιες περιπτώσεις τα συμπτώματα υποχωρούν μόνα τους, ενώ στα σοβαρότερα περιστατικά χορηγείται υποστηρικτική θεραπεία, όπως ενδοφλέβια χορήγηση υγρών, εισαγωγή σε μονάδα εντατικής θεραπείας κλπ. Έως τώρα, έχουν γίνει αρκετές μελέτες που αφορούν πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Οι κυριότεροι παράγοντες που έχουν περιγραφεί και έχουν χρησιμοποιηθεί εμπειρικά για την καταπολέμηση της νόσου είναι η χορήγηση Ιντερφερόνης-α και ενδοφλέβια χορήγηση ειδικής έναντι του ιού ανοσοσφαιρίνης. Κανένας όμως από αυτούς δεν απεδείχθη ικανοποιητικά αποτελεσματικός στην θεραπεία της νόσου (17,18).

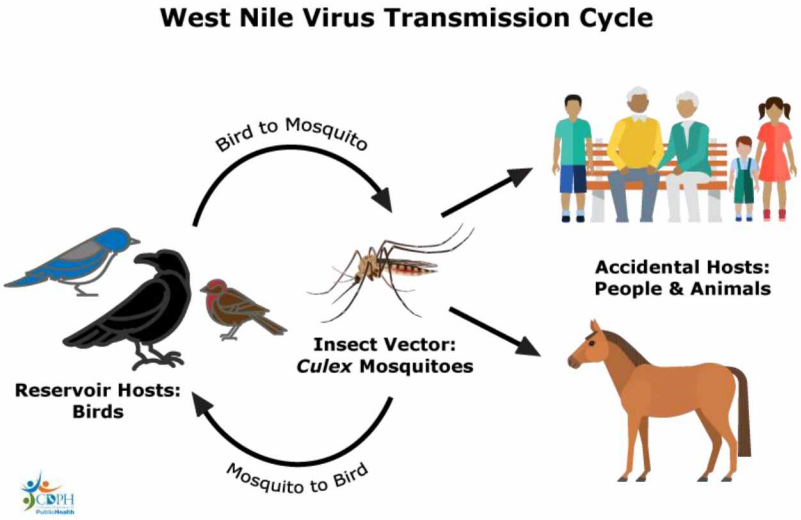
Η πρόληψη από τον ιό έγκειται στην ατομική προστασία των πολιτών από τα κουνούπια και στην έγκαιρη και αποτελεσματική καταπολέμησή τους από την μεριά της πολιτείας. Αναφορικά με την αποφυγή μετάγγισης μολυσμένου αίματος, κρίνεται αναγκαία η λήψη μέτρων αποκλεισμού αιμοδοτών και έλεγχος του αιμοδοτούμενου αίματος στις περιοχές που έχουν εμφανιστεί κρούσματα του ιού (2,4).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

1.5. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΟΥ WNV

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανακυκλώνεται στην φύση σε έναν ενζωοτικό κύκλο ανάμεσα στα ορνιθοφιλικά κουνούπια και τα πτηνά (Εικόνα 6). Κατά κύριο λόγο, ο ιός προσβάλει τα πτηνά της τάξης των Στρουθιόμορφων (Passeriformes), ιδιαίτερα την οικογένεια των Κορακίδων (*Corvidae).* Επιπρόσθετα, ο WNV προσβάλλει πτηνά της τάξης των Γλαυκόμορφων (όπως κουκουβάγιες, μπούφοι), των Χαραδριόμορφων (μπεκάτσες, γλάροι) και των Ιερακόμορφων (γεράκια) (19,20). Μάλιστα, σε ορισμένα είδη πτηνών όπως τα *Corvus brachyrhynchos, Cyanocitta cristata* και *Passer domesticus,* ο ιός αναπτύσσει γρήγορα πολύ υψηλό τίτλο (έως και 10^{12} pfu/ml) με αποτέλεσμα τα αυξημένα ποσοστά θανάτου των πτηνών, σε σύντομο χρονικό διάστημα από την μόλυνση. Οι ακριβείς λεπτομέρειες για την έναρξη της παθογένεσης στα πτηνά δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστές. Παρ' όλα αυτά, πειραματικά δεδομένα έχουν αναδείξει ότι μετά το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, ο ιός ανιχνεύεται στο αίμα των πτηνών ήδη από τα πρώτα 30-45 λεπτά. Μέσω της κυκλοφορίας, ο ιός μολύνει και αντιγράφεται σε όλα τα βασικά συστήματα του οργανισμού των πτηνών, πλήττοντας όργανα όπως το συκώτι, τον

Ιαιμία: Ο όρος που περιγράφει την είσοδο του ιού στην κυκλοφορία του αίματος.



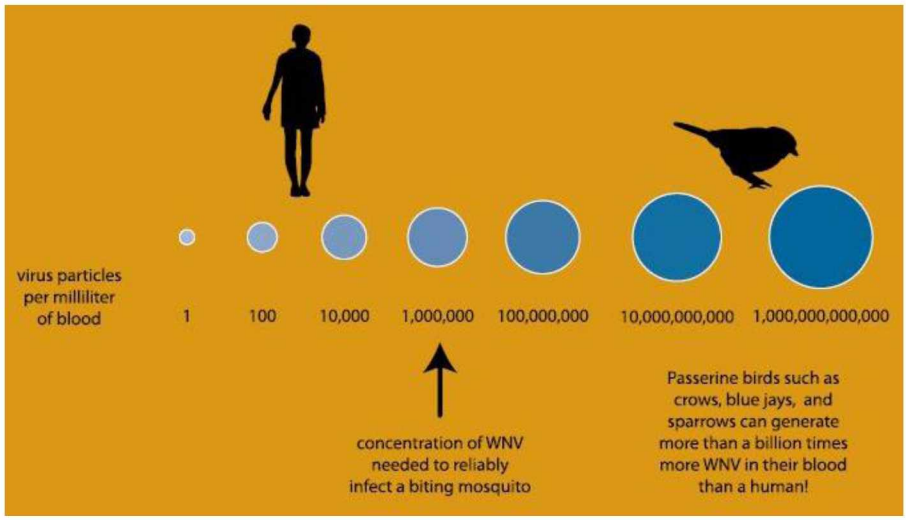
Εικόνα 6: Ο κύκλος μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Φυσικό ξενιστή του ιού αποτελούν τα πτηνά, όπου και στα οποία αναπτύσσεται υψηλός ιικός τίτλος στο αίμα. Με το τσίμπημα ενός ιαιμικού πουλιού, το κουνούπι μολύνεται και πλέον μπορεί να μεταδώσει τον ιό σε άλλα πουλιά αλλά και σε θηλαστικά, όπως ο άνθρωπος και τα ιπποειδή. Τα θηλαστικά θεωρούνται ευκαιριακοί ή αδιέξοδοι ξενιστές του ιού διότι δεν είναι ικανοί να μεταδώσουν περεταίρω τον ιό (21).

σπλήνα, τους νεφρούς, την καρδιά, τους οφθαλμούς και τον εγκέφαλο. Ο ιός προκαλεί έντονη φλεγμονώδη αντίδραση στο μεγαλύτερο μέρος του οργανισμού των πτηνών, μέσω κυτταρικού εκφυλισμού και νέκρωσης, λεμφοπλασματοκυτταρικής και ιστιοκυτταρικής διήθησης καθώς και συστημικών αιμορραγικών επεισοδίων, οδηγώντας τελικά σε θάνατο (22).

Πέρα των πτηνών, ξενιστές του ιού αποτελούν και ορισμένα θηλαστικά όπως ο άνθρωπος και τα ιπποειδή, αμφίβια και ερπετοειδή. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι και πολλά άλλα ζώα, οικόσιτα και άγρια θηλαστικά, επιτρέπουν την μόλυνση από WNV, όπως οι σκύλοι, γάτες, γουρούνια, αγελάδες, λύκοι και άλλα, χωρίς όμως σαφή ένδειξη νόσου. Παρ' όλα αυτά δεν είναι ικανοί όλοι οι μολυσμένοι ξενιστές να μεταδώσουν τον ιό (23).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Η μετάδοση των αρμποϊών μέσω των κουνουπιών απαιτεί την ανάπτυξη υψηλών επιπέδων ιαιμίας στους ξενιστές, παρατεταμένης διάρκειας. Για τον λόγο αυτό, τα πτηνά αποτελούν την κύρια φυσική δεξαμενή ('reservoir'), διότι ευνοούν την αυξημένη αντιγραφή του ιού και κατ' επέκταση αναπτύσσουν επαρκή ιαιμία προκειμένου να μολύνουν τα κουνούπια που τρέφονται από το αίμα αυτών. Τα μολυσμένα κουνούπια είναι ικανά να διαβιβάσουν με το τσίμπημά τους τον ιό και σε άλλα είδη, όπως ο άνθρωπος. Σε αντίθεση με τα πτηνά, οι άνθρωποι και τα ιπποειδή συνιστούν ευκαιριακούς, αδιέξοδους ('dead-end') ξενιστές, καθώς αναπτύσσουν χαμηλή ιαιμία (περίπου 10^3-10^5 pfu/ml στον άνθρωπο και περίπου 10^3 pfu/ml στα άλογα) και μικρής διάρκειας, η οποία δεν είναι επαρκής για την περεταίρω μόλυνση των κουνουπιών και κατ' επέκταση την μετάδοση του ιού (Εικόνα 7) (24,25). Στην περίπτωση των θηλαστικών, μετά το τσίμπημα μολυσμένου κουνουπιού ο ιός πολλαπλασιάζεται τοπικά στο δέρμα στα δενδριτικά κύτταρα Langerhans, έπειτα μέσω της κυκλοφορίας φτάνει στους λεμφικούς ιστούς κι από εκεί στο σπλήνα και στους νεφρούς, όπου αποτελούν τα πρωταρχικά σημεία της ιικής αντιγραφής. Σε αντίθεση με τα πτηνά, στα θηλαστικά ο ιός εξαλείφεται από τον οργανισμό τους αρκετά σύντομα, ήδη πριν από το το τέλος της πρώτης εβδομάδας μετά την μόλυνση (22).



Εικόνα 7: Επίπεδα WNV ιαιμίας στον άνθρωπο και στα πτηνά.

Ο ιός, πέραν του ενζωοτικού κύκλου, διατηρείται και στους πληθυσμούς των κουνουπιών μέσω κάθετης μετάδοσης, από τα ενήλικα κουνούπια στα αυγά τους. Τα κουνούπια του γένους *Culex,* ή αλλιώς τα «κοινά» κουνούπια της πόλης, θεωρούνται οι κύριοι διαβιβαστές του ιού. Επιπλέον, ορισμένα είδη εκτός των κουνουπιών *Culex* αποτελούν εξίσου φορείς του WNV, όπως συμβαίνει και με το *Aedes albopictus.* Ωστόσο, ο ρόλος τους στην διαβίβαση του ιού παραμένει ακόμη άγνωστος (26). Κυριότεροι διαβιβαστές του ιού αποτελούν τα κουνούπια του είδους *Culex pipiens, Culex tarsalis* και *Culex quinquefasciatus.* Στην Ελλάδα, έχουν καταγραφεί πάνω από 60 είδη κουνουπιών στα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα γένη *Aedes* και *Culex.* Τα κυρίαρχα είδη που ευδοκιμούν κατά τους θερινούς μήνες στην Ελλάδα είναι μεταξύ άλλων τα *Culex pipiens* και *Culex modestus,* με το δεύτερο να αποτελεί εξίσου φορέα μετάδοσης του ιού (27).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

[2]**Vector competence:** Η ικανότητα ενός αρθρόποδου να αποκτήσει, να διατηρήσει και να μεταδώσει έναν μικροβιακό παράγοντα.

Τα θηλυκά κουνούπια των διαφόρων ειδών του γένους *Culex*, όπως ήδη προαναφέρθηκε, αποκτούν τον ιό κατά την τροφή τους με αίμα ιαιμικών πτηνών. Έχει προταθεί ότι η ελάχιστη δόση ιού που χρειάζεται για την επαρκή μόλυνση ενός κουνουπιού κυμαίνεται περίπου στα 10^6-10^7 pfu/ml (30). Όταν ο ιός εισέλθει στον εσωτερικό των κουνουπιών, αντιγράφεται στα επιθηλιακά κύτταρα του μεσεντέρου και μέσω της αιμολέμφου φτάνει στα υπόλοιπα όργανα και κυρίως στους σιελογόνους αδένες. Καθοριστικό στην αποδοτικότητα του κουνουπιού ως φορέα ("vector competence[2]") είναι το ίδιο το μεσέντερο, το οποίο δρα ως δομικός φραγμός λόγω της περιτροφικής του μεμβράνης, όσο και ως ανοσιακός φραγμός για την διαφυγή του ιού στην αιμολέμφο. Η περιτροφική μεμβράνη του μεσεντέρου αποτελείται από χιτίνη, γλυκοπρωτεΐνες και πρωτεογλυκάνες, ενώ σε συνδυασμό με την απελευθέρωση αντιμικροβιακών πεπτιδίων περιορίζουν την αντιγραφή του ιού και την διασπορά του μέσα στον οργανισμό του κουνουπιού. Μόλις ο ιός φτάσει στους σιελογόνους αδένες πολλαπλασιάζεται περαιτέρω και συσσωρεύεται έως ότου φτάσει επίπεδα πλατό. Τότε, μπορεί να μεταδοθεί εκ νέου σε άλλα πτηνά και θηλαστικά (1,21).

Τόσο αβιοτικοί (τοποθεσία, κλίμα) όσο και βιοτικοί παράγοντες (διανομή των ειδών των πτηνών, είδη των κουνουπιών, ενδο-ειδικές αλληλεπιδράσεις) επηρεάζουν τελικώς την κυκλοφορία του WNV και την δυναμική της ιικής μόλυνσης από αυτόν. Η πολύπλοκη σχέση των διαφόρων φορέων, των ικανών διαβιβαστών και των ποικίλλων ξενιστών, στα εκάστοτε αποκλίνοντα περιβάλλοντα, έχει συνεισφέρει στην ευρεία γεωγραφική κατανομή του ιού, κυρίως τα τελευταία χρόνια (28).

Επιπρόσθετα, έχουν περιγραφεί και ορισμένοι λιγότερο συχνοί τρόποι μετάδοσης του ιού. Συγκεκριμένα, υπάρχουν αναφορές μετάδοσης μέσω μετάγγισης μολυσμένου αίματος και μέσω μεταμόσχευσης οργάνων (29,30). Ακόμη πιο σπάνια, έχουν καταγραφεί περιπτώσεις μετάδοσης του ιού από την εγκυμονούσα μητέρα στο έμβρυο μέσω του πλακούντα και μετάδοση μέσω του θηλασμού (31). Τέλος, έχουν υπάρξει κάποια μεμονωμένα περιστατικά μετάδοσης μέσω επαγγελματικής έκθεσης σε εργαζομένους εργαστηρίων (32).

1.5.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΟΥ WNV ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Οι γνώσεις για την παθογένεση του WNV στον άνθρωπο παραμένουν ακόμη ανεπαρκείς. Παρ' όλα αυτά, οι μελέτες σε μοντέλα τρωκτικών έχουν ρίξει φως στους βασικούς μηχανισμούς της παθογένεσης του ιού. Με το τσίμπημα του κουνουπιού, αναλόγως του είδους αυτού, απελευθερώνονται μέχρι και 10^6 pfu μολυσματικών ιικών σωματιδίων στην κυκλοφορία του αίματος του ξενιστή. Έχει βρεθεί ότι ο σίελος του κουνουπιού περιέχει μόρια τα οποία ενισχύουν την κινητική και την μολυσματικότητα του ιού, καθώς αντισταθμίζουν την αιμόσταση, μειώνουν την φλεγμονή και τροποποιούν την ανοσιακή απόκκριση του ξενιστή (33,34). Σε πρώτη φάση μετά την είσοδο του στον οργανισμό, ο ιός πολλαπλασιάζεται στα κερατινοκύτταρα, στα κυτταρικά δερματικά δενδριτικά κύτταρα και στα κύτταρα Langerhans (35,36). Στην συνέχεια ο ιός εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στα λεμφογάγγλια, και μέσω αυτών εισβάλλει στην κυκλοφορία του αίματος και διαδίδεται σε περιφερειακούς ιστούς και όργανα , με τον σπλήνα να αποτελεί το βασικό σημείο πολλαπλασιασμού του. Όμως, δεν είναι ακόμη γνωστά τα κύτταρα-στόχοι του ιού. Πιθανολογείται ότι πρόκειται για είδη δενδριτικών κυττάρων, μακροφάγα και ουδετερόφιλα (37, 38). Επιπλέον, μερικά στελέχη του ιού παρουσιάζουν νευροδιεισδυτικότητα. Η νευροδιεισδυτικότητα ενός

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

στελέχους καθορίζεται κατά κύριο λόγο από συγκεκριμένους καθοριστές στις δομικές του πρωτεΐνες, αλλά ο ακριβής τους ρόλος ακόμη παραμένει αδιευκρίνιστος. Ακόμη, υπάρχει η υποψία ότι ο ιός εισέρχεται στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μέσω διαταραχής της διαπερατότητας των ενδοθηλιακών κυττάρων του αιματοεγκεφαλικού φραγμού (blood-brain barrier, BBB), που επάγεται από την δράση κυτταροκινών (όπως ο TNF) και μεταλλοπρωτεασών (39,40,41). Τέλος, υπάρχει και η εκδοχή ότι ο ιός καταφέρνει να διεισδύσει στο ΚΝΣ εφαρμόζοντας μία στρατηγική «Δούρειου Ίππου», «κρυμμένος» σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (38). Στο ΚΝΣ, ο WNV μολύνει τους νευρώνες του στελέχους, του ιπποκάμπου, του φλοιού, της παρεγκεφαλίδας και του νωτιαίου μυελού, προκαλώντας φλεγμονή (21).

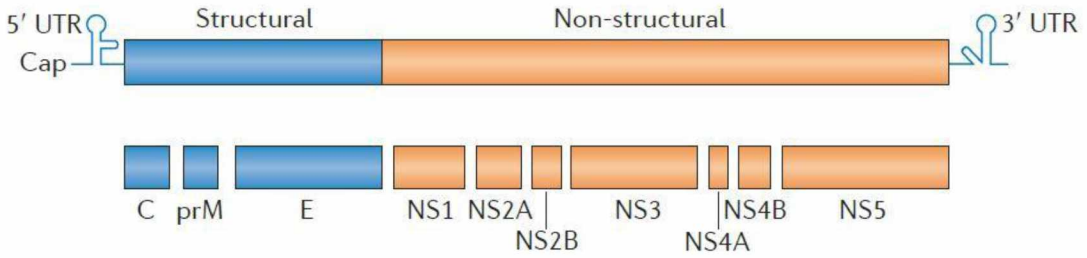
1.6 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ WNV

Το γενετικό υλικό του WNV είναι ένα θετικής πολικότητας, μονόκλωνο και μη-τεμαχισμένο μόριο RNA, μήκους περίπου 11.000 νουκλεοτιδίων και διαθέτει 5’ τύπου I καλύπτρα m-7GpppAmN. Συνοπτικά, το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από μία 5’ αμετάφραστη περιοχή (5’-untranslated region 5’UTR), μόνο ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (Open Reading Frame, ORF) και μία 3’UTR (Εικόνα 5) (16). Οι περιοχές UTR γενικότερα χαρακτηρίζονται από υψηλή ποικιλομορφία μεταξύ των ιών Flavi, όμως διαθέτουν κάποιες εξαιρετικά συντηρημένες περιοχές με συγκεκριμένες δευτεροταγείς δομές. Οι λειτουργίες αυτών των περιοχών δεν έχουν χαρακτηρισθεί ακόμη πλήρως, όμως φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη της ιικής αντιγραφής, της ιικής μετάφρασης και στο πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος (17). Από το 5’ άκρο του ιικού RNA, στο οποίο εντοπίζεται και η 5΄καλύπτρα, ξεκινά η μετάφραση του ιικού γονιδιώματος από παράγοντες του κυττάρου ξενιστή. Αντιθέτως, από το 3’ άκρο, το οποίο δεν διαθέτει πολύ(A)-ουρά, ξεκινά ο σχηματισμός υπογονιδιωματικών RNAs (subgenomic flavivirus RNAs, sfRNAs) όπου φαίνεται πως είναι υπεύθυνα για την παθογένεια του ιού και πιθανώς τροποποιούν την ανοσοαπόκκριση του ξενιστή (18).

Το μοναδικό ιικό ORF κωδικοποιεί μία πολυπρωτεΐνη, η οποία αφού μεταφραστεί πρωτεολύεται από πρωτεάσες του ιού και του ξενιστή ώστε να αποδώσει τελικώς 10 ώριμες ιικές πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, στο αμινοτελικό άκρο της πολυπρωτεΐνης εντοπίζονται οι 3 δομικές πρωτεΐνες του ιού, οι οποίες είναι υπεύθυνες κατά κύριο λόγο για την αναγνώριση και την είσοδο του ιού στο εσωτερικό του ξενιστή. Αυτές είναι: η πρωτεΐνη του καψιδίου (Capsid, C), η πρόδρομη μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη (pre-Membrane, prM) και η πρωτεΐνη του φακέλου (Envelope, E). Από την άλλη, το καρβοξυτελικό άκρο περιέχει τις 7 μη δομικές (nonstructural, NS) ιικές πρωτεΐνες: τις NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5. Η δραστηριότητα των μη δομικών πρωτεϊνών εκτείνεται σε ένα ευρύ φάσμα, αποσκοπώντας κυρίως στην ρύθμιση του ιικού αντιγραφικού κύκλου, της ιικής μεταγραφής και μετάφρασης. Επιπλέον, οι μη δομικές πρωτεΐνες συμβάλλουν στον σχηματισμό των νέων ιικών σωματιδίων καθώς και στην διαφυγή του ιού από την ανοσοαπόκριση του ξενιστή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

(19,20). Οι περισσότερο μελετημένες και επαρκώς χαρακτηρισμένες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού είναι κυρίως η NS3 και η NS5, οι οποίες είναι και οι μόνες με ενζυματική δράση (16).



Εικόνα 5. Οργάνωση του γονιδιώματος του WNV. Στο μέσο του γονιδιώματος υποδεικνύονται οι εκάστοτε κωδικές περιοχές της πολυπρωτεΐνης που προκύπτει από το μοναδικό ORF του ιού. Εκατέρωθεν, στις 5′- και 3′-UTR απεικονίζονται οι δευτεροταγείς διαμορφώσεις του γονιδιώματος οι οποίες πιθανώς συμμετέχουν στην ρύθμιση της ιικής αντιγραφής, μετάφρασης και το πακετάρισμα του ιικού γονιδιώματος (21).

Συμπερασματικά, οι λειτουργίες των μη δομικών πρωτεϊνών του ιού καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα, όμως οι λεπτομέρειες του μοριακού μηχανισμού των δράσεών τους δεν έχουν διαλευκανθεί ακόμη πλήρως. Περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις λειτουργίες των δομικών και μη δομικών πρωτεϊνών του ιού του Δυτικού Νείλου παρατίθενται στην ενότητα 'Παράρτημα'.

1.6.1 ΕΙΣΟΔΟΣ ΤΟΥ WNV ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Το πρώτο βήμα για την είσοδο του ιού στο εσωτερικό του κυττάρου ξενιστή περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση της ιικής γλυκοπρωτεΐνης E του ιικού φακέλου με κυτταρικούς υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Στον άνθρωπο, όπως και στα ποντίκια, ο ιός συγκεντρώνεται κυρίως στα μονοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα δενδριτικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στους νευρώνες (15). Εργαστηριακά, ο ιός του Δυτικού Νείλου διαθέτει την ικανότητα αντιγραφής σε πολλές κυτταρικές σειρές, προερχόμενες από διαφορετικά είδη, συμπεριλαμβανομένων πτηνών, θηλαστικών, εντόμων και αμφιβίων. Αυτό υποδεικνύει πως ο ιός είτε εισέρχεται στο κύτταρο μέσω υψηλά συντηρημένων υποδοχέων, είτε αξιοποιεί διαφορετικές κυτταρικές πρωτεΐνες για την είσοδό του στις διάφορες κυτταρικές σειρές και είδη των ξενιστών (16). Αρκετές μελέτες έχουν υποδείξει ότι στην αρχική επαφή με το ξενιστικό κύτταρο ο ιός προσδένεται σε γλυκοζαμινογλυκάνες (glycosaminoglycans, GAGs), όπως τις heparan-sulfate πρωτεογλυκάνες και τις συνδεκάνες. Οι GAGs βρίσκονται συνδεδεμένες σε πρωτεΐνες της επιφάνειας των κυτταρικών μεμβρανών όλων των κυτταρικών τύπων, υποβοηθώντας κυρίως την πρόσδεση και την συνάθροιση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια, προτού αλληλεπιδράσουν με τον βασικό υποδοχέα τους (10). Παρά την εκτεταμένη έρευνα, δεν έχουν ακόμη ταυτοποιηθεί οι κυτταρικοί υποδοχείς που συμμετέχουν στην είσοδο του ιού στο ξενιστικό κύτταρο. Έως τώρα, έχουν προταθεί αρκετά υποψήφια μόρια και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους, όμως ο ακριβής τους ρόλος στην ενδοκυττάρωση του ιού παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος. Ένα ενδιαφέρον υποψήφιο μόριο είναι η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$, καθώς είναι πιθανό στα θηλαστικά να λειτουργεί ως βασικός υποδοχέας για τους WNV του 2^{ου} εξελικτικού κλάδου (lineage II) (36). Αντιθέτως, έχει αποδειχθεί ότι οι WNV του 1^{ου} εξελικτικού κλάδου (lineage I) είναι ικανοί να μολύνουν κύτταρα που στερούνται τον διαμεμβρανικό υποδοχέα ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$. Αυτό προτείνει ότι η ιντεγκρίνη $\alpha_v\beta_3$ είναι ένα μόριο το οποίο

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

χρησιμοποιείται ως πρωταρχικός υποδοχέας από συγκεκριμένα στελέχη WNV και/ή σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους (37). Επιπλέον, ιδιαίτερο ενδιαφέρον υπάρχει γύρω από ασβέστιο-εξαρτώμενους C υποδοχείς λεκτίνης (C-type lectin receptors, CLRs), συγκεκριμένα τους DC-SIGN και L-SIGN, καθώς και τους TIM και TAM υποδοχείς φωσφατιδυλοσερίνης, στους οποίους έχει αποδειχθεί ότι προσδένεται ο WNV κι ενισχύουν την ιική μόλυνση (38,39).

Μετά την αλληλεπίδραση του ιού με τους κυτταρικούς υποδοχείς, ακολουθεί η ενδοκυττάρωσή του η οποία μεσολαβείται από κυστίδια κλαθρίνης (40). Το μικροπεριβάλλον των ενδοσωμάτων χαρακτηρίζεται από όξινο pH (6.3-6.4), γεγονός που τροφοδοτεί μία σειρά αλλαγών της διαμόρφωσης της E λιπορπωτεΐνης του ιικού φακέλου. Η ενέργεια που απελευθερώνεται από αυτές τις δομικές αναδιαμορφώσεις της E αποτελεί την κινητήριο δύναμη για την σύντηξη του ιικού φακέλου με την κυτταρική μεμβράνη (41). Τελικώς, δημιουργείται ένας πόρος ο οποίος επιτρέπει την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου στον ξενιστικό κύτταρο. Εν συνεχεία, το ιικό RNA απελευθερώνεται από το νουκλεοκαψίδιο, με μηχανισμό ο οποίος παραμένει ακόμη άγνωστος (4,42).

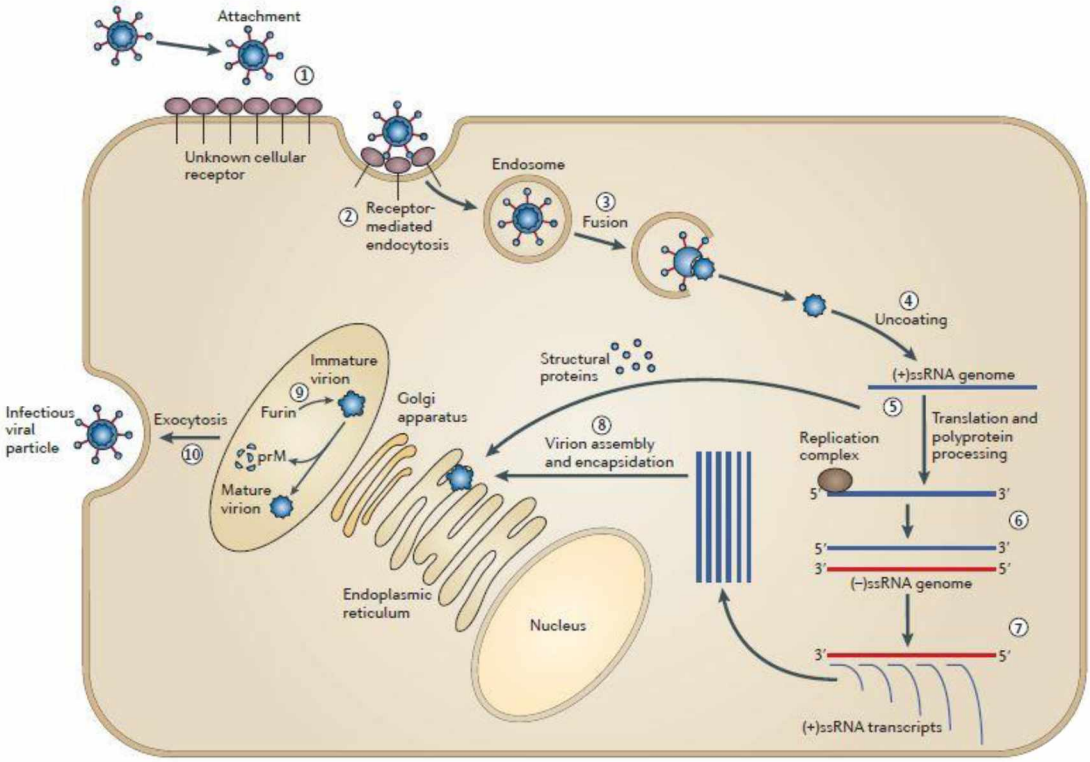
1.6.2 ΑΝΤΙΓΡΑΦΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ ΤΟΥ WNV

Ο αντιγραφικός κύκλος του WNV περιλαμβάνει έναν αριθμό αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών-πρωτεϊνών αλλά και μεταξύ πρωτεϊνών-μεμβρανών (Εικόνα 8). Αμέσως μετά την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, λαμβάνει χώρα η μετάφρασή του, μέσω αναγνώρισης της ιικής 5'-καλύπτρας από κυτταρικούς παράγοντες, όπως ο eIF4E (16). Από την μετάφραση του ιικού RNA προκύπτει μία πολυπρωτεΐνη η οποία υφίσταται τροποποίηση από κυτταρικές πρωτεάσες και από το ιικό σύμπλοκο πρωτεάσης σερίνης NS3-NS2B, ώστε να προκύψουν οι εκάστοτε δομικές και μη-δομικές πρωτεΐνες του WNV. Στην συνέχεια, αυτές θα χρησιμοποιηθούν για την ιική αντιγραφή και τον σχηματισμό των νέων ιοσωματίων. Περίπου τρεις ώρες μετά την μόλυνση πραγματοποιείται αντιγραφή του ιού με σύνθεση του αρνητικού (-) RNA κλώνου από την ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (NS5), το οποίο στην συνέχεια θα αποτελέσει την μήτρα για την σύνθεση νέων θετικών RNA κλώνων. Κατά την πρώιμη φάση της μόλυνσης (6-8 ώρες), τα επίπεδα σύνθεσης του ιικού RNA είναι χαμηλά, μέχρι να φτάσουν οι (-) κλώνοι στο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου και σχηματίζονται τα αντιγραφικά σύμπλοκα, και ξεκινά η εκθετική φάση της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος. Μελέτες έχουν δείξει ότι από έναν (+) κλώνο RNA, μόνο ένας (-) κλώνος μπορεί να προκύψει, ενώ αντιθέτως από έναν (-) κλώνο μπορούν να προκύψουν πολλαπλοί (+) κλώνοι. Κατά την εκθετική φάση της σύνθεσης του ιικού γονιδιώματος, τα νεοσυντιθέμενα ιικά γονιδιώματα εξέρχονται από τα αντιγραφικά σύμπλοκα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκ νέου στην αντιγραφή, στην μετάφραση είτε να πακεταριστούν στα νεοσχηματισμένα ιοσωμάτια (4,16).

Η συναρμολόγηση του ιοσωματίου ξεκινά στο ενδοπλασματικό δίκτυο εφόσον έχει πραγματοποιηθεί επαρκής σύνθεση των ιικών πρωτεϊνών. Πιστεύεται ότι ξεκινά μέσω αλληλεπίδρασης του ιικού RNA με τα συνδεδεμένα στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου διμερή της ιικής καψιδιακής πρωτεΐνης C. Πιθανώς, σε αυτή την διαδικασία εμπλέκεται και η δράση της NS2A, όπως και ήδη προαναφέρθηκε. Στις ίδιες περιοχές εντοπίζονται και οι άλλες δύο δομικές πρωτεΐνες του ιού, οι E και prM, οι οποίες σχηματίζουν ακανθώδη τριμερή στο ανώριμο ακόμη ιοσωμάτιο. Κάθε σχηματισμένο ιοσωμάτιο περιέχει 180 αντίγραφα της εκάστοτε πρωτεΐνης E και prM κι ένα αντίγραφου του RNA γονιδιώματος. Μετά την συναρμολόγησή τους και την συγκέντρωσή τους στο ενδοπλασματικό δίκτυο, τα ανώριμα ιοσωμάτια μεταφέρονται στην συσκευή Golgi μέσω

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

του εκκριτικού μονοπατιού, όπου και τροποποιούνται οι γλυκάνες των E και prM. Η ωρίμανση του ιού επάγεται από το όξινο περιβάλλον των εκκριτικών κυστιδίων, η οποία και προκαλεί την αναδιαμόρφωση των τριμερών ετεροδιμερών prM-E, προς σχηματισμό 90 αντιπαράλληλων ομοδιμερών (15,43). Επιπλέον, στο trans-Golgi πραγματοποιείται, από μία κυτταρική furin-like πρωτεάση, η πρωτεόλυση του αμινοτελικού άκρου της prM. Παράλληλα, τα ακανθώδη τριμερή της E γλυκοπρωτεΐνης αναδιατάσσονται προκειμένου να σχηματίσουν αντιπαράλληλα διμερή, με αποτέλεσμα την «λείανση» του ιοσωματίου, γεγονός που σηματοδοτεί και την ωρίμανση αυτού (44,45).



Εικόνα 8. Ο αντιγραφικός κύκλος του WNV (16). 1. Ο ιός προσκολλάται στο κύτταρο μέσω αλληλεπίδρασης της E πρωτεΐνης με τον υπεύθυνο κυτταρικό υποδοχέα, 2 .Ο ιός διεισδύει μέσω ενδοκυττάρωσης, 3,4. Το όξινο pH των ενδοσωμάτων επάγει την απελευθέρωση του ιικού RNA από το ενδόσωμα και στην συνέχεια από το ιικό νουκλεοκαψίδιο, 5.Το ιικό RNA θετικής πολικότητας μεταφράζεται ούτως ώστε να προκύψουν οι αρνητικοί κλώνοι, 6. Σχηματίζονται τα αντιγραφικά σύμπλοκα και ξεκινά η σύνθεση των θετικών κλώνων RNA, αρχικά σε χαμηλά επίπεδα, 7. Περίπου 6-8 ώρες από την μόλυνση, ξεκινά η εκθετική φάση αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος, 8. Οι νεοσυντιθέμενοι θετικοί κλώνοι είτε χρησιμοποιούνται εκ νέου για την σύνθεση περεταίρω αρνητικών κλώνων, είτε χρησιμοποιούνται για την συναρμολόγηση των νέων ιοσωματίων στο ΕΔ, 9. Τα νεοσχηματισμένα ιοσωμάτια μεταφέρονται στην συσκευή Golgi, όπου ωριμάζουν μέσω πρωτεόλυσης του αμινοτελικού άκρου της prM, 10. Περίπου 8-10 ώρες μετά την μόλυνση, τα νέα μολυσματικά ιικά σωματίδια εξωκυτταρώνονται.

Τα ώριμα μολυσματικά ιοσωμάτια μεταφέρονται στην πλασματική μεμβράνη του μολυσμένου κυττάρου και απελευθερώνονται με εξοκυττάρωση, περίπου 8-10 ώρες μετά την μόλυνση. Τα μέγιστα επίπεδα ιικού φορτίου στο αίμα παρατηρούνται περίπου 24 ώρες μετά την μόλυνση (46).

Παράλληλα με την αντιγραφή του συνολικού μήκους του ιικού RNA, προκύπτουν και άλλα μικρότερα τμήματα υπογονιδιωματικού RNA (subgenomic flavivirus RNA, sfRNA), μήκους 0,2-0,6 kb. Τα sfRNAs παράγονται λόγω της μερικής αποικοδόμησης του ιικού γονιδιώματος από κυτταρικές 5’-

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

3’ εξωριβονουκλεάσες, όπως η Xrnl. Η αποικοδόμηση μεσουλαβούμενη από την Xrnl εξωριβονουκλεάση δεν είναι ολική διότι παρεμποδίζεται πιθανών λόγω της ύπαρξης δευτεροταγών δομών, τόσο στο 5’ όσο και στο 3’ άκρο του ιικού RNA. Παρ’ όλο που δεν έχει ταυτοποιηθεί ακόμη ο ρόλος τους στην ιική αντιγραφή, μεταλλάγματα του WNV που δεν παράγουν sfRNAs επιδεικνύουν μικρότερο βαθμό κυτταροπαθογένειας σε κυτταρικές σειρές και, αντίστοιχα, παθογένειας σε ποντίκια (47). Έχει προταθεί ότι πιθανώς τα sfRNAs του WNV αλληλεπιδρούν απευθείας με γονίδια που ρυθμίζονται από ιντερφερόνες (Interferon-Stimulated Genes, ISGs), τα οποία έχουν την ιδιότητα πρόσδεσης RNA. Δύο από αυτά τα ISGs που προσδένουν RNA είναι τα γονίδια PKR και RNAse L, τα οποία έχει δειχθεί ότι επιδεικνύουν αντιική δράση έναντι πολλών ιών, συμπεριλαμβανομένου και του ιού του Δυτικού Νείλου. Συγκεκριμένα η RNAse L ενεργοποιεί το μονοπάτι RIG-I/MDA5 για την παραγωγή ιντερφερονών και πολλοί ιοί όπως οι εντεροϊοί C, έχουν αναπτύξει στρατηγικές στόχευσης ISGs, αναστέλλοντας έτσι την παραγωγή ιντερφερονών. Έτσι, πιθανολογείται πως και ο ιός του Δυτικού Νείλου μέσω των sfRNAs αλληπιδρά με τα ISGs, καθώς και με άλλα (μη)-εξαρτώμενα από ιντερφερόνη μονοπάτια, όμως απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την λεπτομερή περιγραφή των μοριακών μηχανισμών (48).

1.7 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΟΥ WNV

1.7.1 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Η διάγνωση της λοίμωξης από τον ιό του Δυτικού Νείλου βασίζεται στην κλινική εικόνα του ασθενούς και στα εργαστηριακά ευρήματα. Προς το παρόν, η εργαστηριακή ανίχνευση του ιού βασίζεται κατά κύριο λόγο σε δύο προσεγγίσεις: σε μοριακές και ορολογικές μεθόδους.

Α. Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης

Τα τελευταία χρόνια, η ανίχνευση της οξείας μόλυνσης από ιό του Δυτικού Νείλου βασίζεται στην ανίχνευση του ιικού RNA στα υγρά του ασθενούς μέσω ποσοτικής Real-Time RT-PCR (qRT-PCR), η οποία αποτελεί την διαγνωστική μέθοδο ρουτίνας για τις περισσότερες ιικές μολύνσεις. Το γονιδίωμα του ιού εντοπίζεται στο αίμα από την $2^{η}$-$3^{η}$ ημέρα έως και 14-18 ημέρες μετά την μόλυνση, ωστόσο τα επίπεδά του είναι ανιχνεύσιμα για σύντομο χρονικό διάστημα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων, λόγω του χαμηλού βαθμού ιαιμίας. Αντιθέτως, τα επίπεδα του ιού και κατ’ επέκταση του ιικού RNA ανέρχονται σε υψηλότερους τίτλους στα ούρα, καθώς και για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, κυρίως στους ασθενείς με πυρετό το Δυτικού Νείλου και νευροδιεισδυτική νόσο. Σε αρκετά εργαστήρια, προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα του χαμηλού ιικού τίτλου, εφαρμόζεται nested RT-PCR, αυξάνοντας έτσι το κατώφλι ανίχνευσης του ιικού RNA έως και 10 φορές. Όμως, αυτή η προσέγγιση πέραν του ότι αυξάνει το κόστος και τον χρόνο της ανίχνευσης, είναι και περισσότερο επιρρεπής σε επιμολύνσεις και συνεπώς στην έκβαση ψευδώς θετικού αποτελέσματος (49).
Επειδή η πλειονότητα των μολυσμένων ατόμων είναι ασυμπτωματικοί, ο έλεγχος του αιμοδοτούμενου αίματος αλλά και των μοσχευμάτων είναι αναγκαίος σε περιοχές που ενδημεί ο ιός του Δυτικού Νείλου. Επί του παρόντος, για τον έλεγχο του αίματος, των ιστών και των οργάνων που προορίζονται για μεταμόσχευση, εφαρμόζονται κατά κύριο λόγο δύο εμπορικά κιτ NAT (Nucleic Acid Testing), που έχουν αναπτυχθεί από την Roche (Cobas® TaqScreen WNV Test) και την Grifols Diagnostic Solutions Incorporated (Procleix WNV Assay), αντίστοιχα, τα οποία υπόσχονται ανίχνευση των χαμηλών επιπέδων του ιού. Το πρώτο βασίζεται στην RT-PCR ενώ το δεύτερο στην μεσολαβούμενη από μεταγραφή ενίσχυση του ιικού γονιδιώματος (Transcription-Mediated

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Amplification, TMA). Και οι δύο τεχνικές είναι κατοχυρωμένες με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και έτσι δεν είναι γνωστή η αλληλουχία που στοχεύουν. Ανάλογα με τον τοπικό επιδημιολογικό επιπολασμό του ιού, ο έλεγχος του αιμοδοτούμενου αίματος πραγματοποιείται σε minipools πολλαπλών δειγμάτων ή σε ατομικό επίπεδο (49).

Β. Ορολογικές μέθοδοι ανίχνευσης

Η ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου στο αίμα και στο εγκεφαλονυτιαίο υγρό (ΕΝΥ) είναι μία από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες μεθόδους για την διάγνωση της μόλυνσης από ιό του Δυτικού Νείλου. Συγκεκριμένα, η διάγνωση περιλαμβάνει την ανίχνευση υψηλού τίτλου IgM ή IgG αντισωμάτων ειδικών για τον ιό μέσω τεχνικών όπως είναι η ELISA, τεχνικές ανοσοφθορισμού (π.χ. ανοσοϊστοχημεία σε μονιμοποιημένο ιστό) και τεχνικές οροεξουδετέρωσης. Τα IgM και IgG αντισώματα είναι ανιχνεύσιμα στο αίμα του ασθενούς κατά μέσο όρο 4 και 8 ημέρες, αντίστοιχα, μετά την μόλυνση. Η ανίχνευση των IgM αντισωμάτων ειδικών για τον ιό είναι γενικά σημάδι πιθανής μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου αλλά η οριστική επιβεβαίωση επέρχεται μέσω δεύτερης δειγματοληψίας σε επόμενο χρόνο και διαπίστωση της αύξησης του τίτλου τους. Ιδιαίτερη προσοχή συνίσταται κατά τη πρώιμη δειγματοληψία σύντομα μετά την έναρξη των συμπτωμάτων διότι ενέχει η πιθανότητα μη ανιχνεύσιμων ποσοτήτων ειδικών για τον ιό IgM αντισωμάτων και κατ' επέκταση ανάπτυξη ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος. Και σε αυτή την περίπτωση η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί ξανά σε επόμενο χρονικό στάδιο. Η μεγαλύτερη όμως αδυναμία των ορολογικών εξετάσεων έγκειται στην πιθανότητα ευρείας διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλους ιούς του γένους Flavi. Ο ιός του Δυτικού Νείλου διαθέτει συγγενικούς αντιγονικούς επιτόπους κυρίως με τον Δάγκειο ιό (Dengue virus, DENV), τον ιό Zika (Zika Virus, ZIKV), τον ιό του κίτρινου πυρετού (Yellow Fever Virus, YFV), και τον ιό της Ιαπωνικής Εγκεφαλίτιδας (Japanese Encephalitis virus, JEV). Έτσι, σε περίπτωση που ο ασθενής έχει μολυνθεί με κάποιον άλλο ιό Flavi, ή ακόμη και αν έχει εμβολιαστεί προσφάτως με εμβόλιο κατά άλλου ιού Flavi (π.χ. για τον ιό του κίτρινου πυρετού), υπάρχει η πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος, λόγω διασταυρούμενης ανοσολογικής απάντησης. Για την οριστική επιβεβαίωση ενός αληθώς θετικού αποτελέσματος, πριν την επίσημη αναφορά της διάγνωσης, χρειάζεται η πραγματοποίηση επιπλέον αναλύσεων (όπως η Plaque Reduction Neutralization Test, PRNT), γεγονός που αυξάνει το κόστος, τον χρόνο του αποτελέσματος, ενώ πολλές φορές είναι απαραίτητη η δεύτερη δειγματοληψία από τον ασθενή (50). Η ανάγκη για την βελτίωση των ορολογικών διαγνωστικών μεθόδων είναι επιτακτική.

1.7.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΠΙΤΗΡΗΣΗ ΣΕ ΠΤΗΝΑ, ΙΠΠΟΕΙΔΗ, ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

Όπως προαναφέρθηκε, η δυναμική της κυκλοφορίας και της μετάδοσης του ιού είναι περίπλοκη καθώς εξαρτάται από πολλαπλούς περιβαλλοντικούς και κλιματικούς παράγοντες. Ο ιός συχνά συσχετίζεται με τα δέλτα των ποταμών και άλλους υγροτόπους, καθώς αυτά αποτελούν σημεία ανάπαυσης και αναπαραγωγής πολλών πτηνών αλλά και ορνιθοφιλικών κουνουπιών. Εκτός όμως από τα φυσικά περιβάλλοντα, υπάρχουν και αρκετά τεχνητά συστήματα, τόσο σε αγροτικά όσο και σε αστικά εδάφη που ευνοούν την συνάθροιση δυνητικά μολυσμένων κουνουπιών, συμβάλλοντας έτσι στην περεταίρω μετάδοση του ιού. Παράλληλα, κλιματικοί παράγοντες όπως ο ρυθμός των βροχοπτώσεων και η θερμοκρασία επίσης είναι καθοριστικοί για την κυκλοφορία του ιού. Έτσι, η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

πολυπαραγοντικά εξαρτώμενη δυναμική της μετάδοσής του απαιτεί αποτελεσματικές δράσεις επιδημιολογικής επιτήρησης του ιού, για την αναγνώριση, την παρακολούθηση αλλά και την πρόβλεψη των περιοχών και της εποχής κυκλοφορίας του ιού, ούτως ώστε να εφαρμοστούν τα κατάλληλα μέτρα προστασίας και απαλλαγής από τα κουνούπια. Συγκεκριμένα, στις χώρες που ενδημεί ο ιός του Δυτικού Νείλου, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας από το 2010 κι έπειτα, διενεργούνται ετησίως ολοκληρωμένα προγράμματα επιδημιολογικής επιτήρησής του τόσο στους ανθρώπους καθώς και σε πληθυσμούς κουνουπιών, πτηνών και ζώων, κυρίως στις περιοχές που θεωρείτο ότι η μετάδοση του ιού στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι εύκολο να συμβεί (3).

ΠΤΗΝΑ ΚΑΙ ΙΠΠΟΕΙΔΗ

Για την ανίχνευση του ιού σε πτηνά και ιπποειδή εφαρμόζονται εξίσου μοριακές και ορολογικές μέθοδοι, όπως RT-PCR, ELISA, ακόμη και άμεση ανίχνευση των αντιγονικών επιτόπων του ιού (κυρίως της πρωτεΐνης NS1) σε δείγματα ορού και σιέλου. Επιπλέον, εκτός από τις προηγούμενες προσεγγίσεις που αναφέρθηκαν, σε δείγματα ιστών (εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός) από νεκρά ζώα δύναται η απομόνωση του ιού σε κυτταροκαλλιέργεια, η οποία ευνοείται λόγω του ψηλού ιικού φορτίου (49).

ΚΟΥΝΟΥΠΙΑ

Ο έλεγχος του πληθυσμού των ορνιθοφιλικών κουνουπιών περιλαμβάνει την ανίχνευση του ιού μέσω άμεσης ανίχνευσης των ιικών αντιγονικών επιτόπων και του ιικού RNA μέσω RT-PCR (49).

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης που περιεγράφηκαν παραπάνω και βασίζονται στην ενίσχυση του ιικού RNA συχνά απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό και καταρτισμένο εργαστηριακό προσωπικό, ενώ παράλληλα αυξάνουν πολύ το κόστος της αντίδρασης, ειδικά στην περίπτωση της επιδημιολογικής επιτήρησης του ιού η οποία βασίζεται στην λήψη πολλαπλών δειγμάτων. Από την άλλη, η μεγάλη αδυναμία των ορολογικών μεθόδων που οφείλεται στην έλλειψη ειδικότητας λόγω διασταυρούμενης αντίδρασης με άλλους ιούς του γένους *Flavi,* ελλοχεύει την ανάπτυξη λανθασμένου αποτελέσματος. Το τελευταίο, συνδυαστικά με το μεγάλο κόστος των υπαρχόντων μοριακών εργαλείων ανίχνευσης παρακωλύει και δυσχεραίνει την ολοκληρωμένη επιδημιολογική επιτήρηση του ιού στον γενικό ανθρώπινο πληθυσμό, στην ορνιθολογική δεξαμενή, τα κουνούπια και τα υπόλοιπα ζώα. Συνεπώς, η ανάπτυξη ενός νέου οικονομικά προσιτού και παράλληλα αξιόπιστου διαγνωστικού εργαλείου αποτελεί τεράστια ανάγκη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

2.1 ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

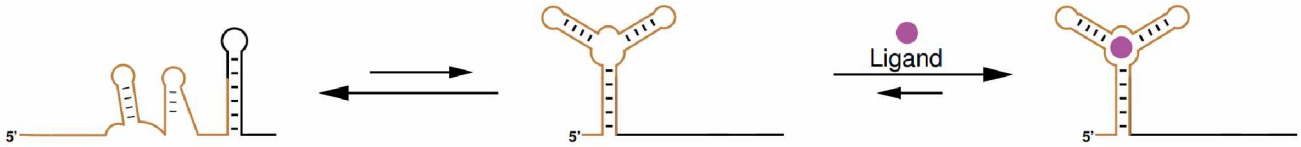
2.1.1 ΡΙΒΟΔΙΑΚΟΠΤΕΣ

Η ανάπτυξη νέων τεχνικών και μεθόδων με υψηλή διαγνωστική αξία αποτελούσε ανέκαθεν μεγάλη πρόκληση. Τις τελευταίες δεκαετίες, η πρόοδος της Συνθετικής Βιολογίας έχει επιτρέψει μεταξύ άλλων την ανάπτυξη τεχνητών βιολογικών κυκλωμάτων και συνθετικών γονιδίων. Η αξιοποίηση των εργαλείων Συνθετικής Βιολογίας καθιστά δυνατή την μελέτη των βιολογικών συστημάτων, την κατανόηση και την πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους ακόμη και την τροποποίηση της λειτουργίας τους *in vivo* και *in vitro* (51). Ειδικότερα, το αναδυόμενο πεδίο της RNA νανοτεχνολογίας έχει συμβάλλει μεταξύ άλλων και στην δημιουργία βιοαισθητήρων, των οποίων η λειτουργία βασίζεται στις αλληλεπιδράσεις RNA-RNA και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση (52) Τέτοια RNA μόρια με υψηλό διαγνωστικό δυναμικό είναι και οι λεγόμενοι ριβοδιακόπτες (riboswitches). Στη φύση, οι ριβοδιακόπτες είναι ρυθμιστικά στοιχεία που εντοπίζονται συχνά στην 5' αμετάφραστη περιοχή των βακτηριακών mRNAs. Σχηματίζουν πολύπλοκες διαμορφώσεις κι έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν άμεσα με μεταβολίτες του βακτηρίου, ρυθμίζοντας έτσι, σαν μοριακοί διακόπτες, την μετάφραση του μεταγράφου (53). Συγκεκριμένα, οι ριβοδιακόπτες μπορούν να ανιχνεύσουν μικρούς προσδέτες όπως συμπαράγοντες ενζύμων (για παράδειγμα S-αδενοσυλμεθειονίνη, SAM και πυροφωσφορική θειαμίνη, TPP), πρόδρομα νουκλεοτιδίων, αμινοξέα και μεταλλικά ιόντα. Επιπλέον, αντιλαμβάνονται αλλαγές στην θερμοκρασία και στο pH. Το γεγονός ότι οι ριβοδιακόπτες είναι ρυθμιστικά στοιχεία ήδη κωδικοποιημένα επάνω στα μετάγραφα, εξασφαλίζει την ρύθμιση της πρωτεϊνικής έκφρασης σε αρχικό στάδιο και σε πιο άμεσο χρόνο, ενώ παράλληλα συμβάλλει στην οικονομία του κυττάρου, σε σύγκριση με την ρύθμιση της έκφρασης από μεταγραφικούς παράγοντες. Οι ριβοδιακόπτες αποτελούνται από δύο βασικές επικράτειες: την επικράτεια του απταμερούς[3] (aptamer domain), μέσω της οποίας αναγνωρίζουν τα σήματα και την ρυθμιστική επικράτεια (expression platform), η οποία ανταποκρίνεται στις δομικές αλλαγές του απταμερούς και είναι υπεύθυνη για την επαγωγή ή αναστολή της έκφρασης του μεταγράφου. Η αποδοτική έναρξη της μετάφρασης στα βακτήρια εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την προσβασιμότητα των μεταφραστικών παραγόντων σε δύο βασικές αλληλουχίες: στην θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (Ribosomal Binding Site, RBS) και στο κωδικόνιο έναρξης (που συνήθως είναι το AUG), με την διαμόρφωση του RNA να είναι καθοριστική για την προσβασιμότητά τους. Έτσι, οι ριβοδιακόπτες αλλάζουν διαμόρφωση μέσω αλληλεπίδρασης με τους αντίστοιχους προσδέτες τους και κατ' επέκταση ευνοούν ή αποτρέπουν την προσβασιμότητα, συμβάλλοντας στην επαγωγή ή αναστολή, αντίστοιχα, της μετάφρασης του μεταγράφου. Στην απλούστερη μορφή τους, οι ριβοδιακόπτες συνίστανται από μια δομή στελέχους-θηλιάς (hairpin structure), η οποία ακολουθείται από μία σειρά νουκλεοτιδίων ουρακίλης ανοδικά

[3]**Απταμερές:** Μικρό τμήμα DNA, RNA ή ολιγοπεπτίδιο που αναγνωρίζει και προσδένεται σε συγκεκριμένο μοριακό στόχο. Χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευελιξία, ενώ δεσμεύουν τον στόχο τους με εξαιρετική επιλεκτικότητα και ειδικότητα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

της κωδικής αλληλουχίας του μεταγράφου. Στη δομή στελέχους-θηλιάς εντοπίζεται η θέση αλληλεπίδρασης με τον προσδέτη (Εικόνα 9) (63).



Εικόνα 9. Απλοποιημένη απεικόνιση του μηχανισμού των ριβοδιακοπτών. Οι ριβοδιακόπτες σχηματίζουν εναλλακτικές δομές (αριστερά και μέση). Παρουσία του προσδέτη, το απταμερές σταθεροποιείται στην σωστή διαμόρφωση (δεξιά), συμβάλλοντας τελικώς στην επαγωγή ή αναστολή της έκφρασης του μεταγράφου (54).

Πλέον, η συμμετοχή του RNA στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι δεδομένη και συνεπώς όλο και πληθύνονται οι προσπάθειες εκμετάλλευσης αυτής του της ιδιότητας για διαγνωστικούς, και όχι μόνο, σκοπούς. Ο σχεδιασμός συνθετικών ριβοδιακοπτών επιτρέπει την απόκρισή τους σχεδόν σε οποιονδήποτε προσδέτη, και κατ' επέκταση αποτελούν πολύ χρήσιμο εργαλείο για την συνθετική βιολογία (55). Παρέχουν την ευκαιρία σε κύτταρα αλλά και σε μη κυτταρικά συστήματα να «αισθάνονται» εξωγενή ερεθίσματα και να αποκρίνονται σε αυτά, δρώντας ως βιοαισθητήρες (biosensors) (56). Για την οπτικοποίηση και ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας των συνθετικών ριβοδιακοπτών αξιοποιούνται ποικίλα συστήματα αναφοράς (reporter systems). Χρησιμοποιείται μία πληθώρα συστημάτων αναφοράς με το GFP και το βακτηριακό γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ) να είναι από τα πιο συνήθη (54). Το ευρύ φάσμα επιλογών στα συστήματα αναφοράς σε συνδυασμό με την ευελιξία στην ευαισθησία για διάφορους προσδέτες είναι δύο στοιχεία που καθιστούν τους ριβοδιακόπτες εξαιρετικά εργαλεία, όχι μόνο για το ευρύτερο πεδίο της συνθετικής βιολογίας αλλά και για διαγνωστικούς σκοπούς. Έτσι, μέχρι σήμερα έχει σχεδιαστεί μία μεγάλη ποικιλία διαφορετικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούν κατά βάση RNA μόρια ως ερέθισμα (trigger) και κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την αρχική RNA-RNA αλληλεπίδραση μεταξύ του trigger RNA και του βιοαισθητήρα (54,57).

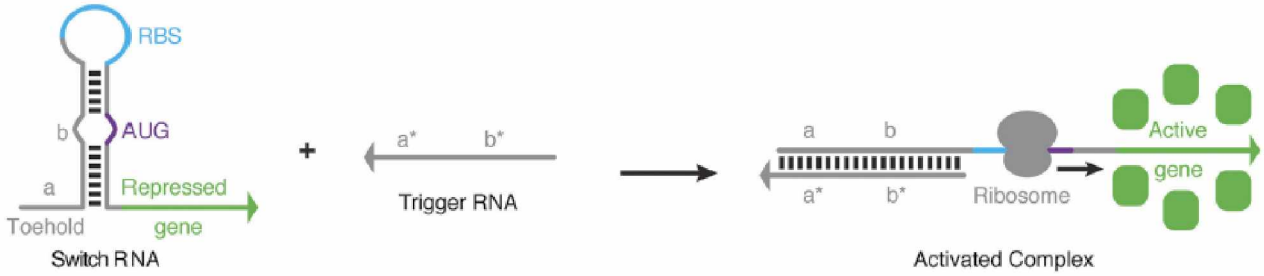
2.1.2 TOEHOLD SWITCHES

Όπως μόλις προαναφέρθηκε, το γεγονός ότι οι ριβοδιακόπτες αποτελούν πολλά υποσχόμενα μόρια έδωσε το έναυσμα για τον σχεδιασμό ποικίλλων συνθετικών ριβοδιακοπτών. Στην πλειονότητά τους, οι συνθετικοί ριβοδιακόπτες αποτελούνται από 2 μόρια RNA: ένα RNA μόριο υπεύθυνο για την ρύθμιση της μεταγραφής ή μετάφρασης κι ένα δεύτερο RNA μόριο που αλληλεπιδρά με το πρώτο ρυθμίζοντας την βιολογική του δραστηριότητα. Όμως, η θεωρητική αξιοσημείωτη πλαστικότητα των ριβοδιακοπτών έρχεται σε αντίθεση με τον πρακτικό περιορισμό σχεδιασμού σταθερών και παράλληλα λειτουργικών ριβοδιακοπτών, ο οποίος κατ' επέκταση περιορίζει και την ευελιξία των ριβονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (58). Το 2014, ο Green A. και οι συνεργάτες του σχεδίασαν μία νέα κατηγορία συνθετικών ριβοδιακοπτών, αυτή των Toehold Switches. Σε αντίθεση με τους συμβατικούς ριβοδιακόπτες τα Toehold Switches επιτρέπουν την μετα-μεταγραφική ενεργοποίηση της πρωτεϊνοσύνθεσης μέσω γραμμικών αλληλεπιδράσεων που επάγουν την μετατόπιση των αλληλεπιδρώντων RNA μορίων, καταρρίπτοντας έτσι το αυξημένο συστημικό cross-talk που παρατηρείτο στην ρύθμιση από τους κλασικούς ριβοδιακόπτες. Παράλληλα, οι Toehold Switch RNA ριβοδιακόπτες είναι ικανοί να προσφέρουν στην ενεργή τους μορφή ενίσχυση της

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

πρωτεϊνοσύνθεσης έως και 400 φορές σε σχέση με την ανενεργή τους, σε αντίθεση με τους συμβατικούς ριβοδιακόπτες που δεν ξεπερνούν τις (55,57)

Το σύστημα Toehold Switch αποτελείται από δύο μόρια RNA: 1. το cis-δραστικό Switch RNA και 2. το trans-δραστικό Trigger RNA. Το Switch RNA διαθέτει καθοδικά την κωδική αλληλουχία ενός γονιδίου αναφοράς. Η μετάφραση, όμως, της κωδικής αλληλουχίας καταστέλλεται εξαιτίας της ύπαρξης μίας δομής στελέχους-θηλιάς (hairpin structure) που βρίσκεται ανοδικά αυτής. Σε αυτή τη δομή στελέχους θηλιάς υπάρχει η θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος (Ribosomal Binding Site-RBS) και η θέση έναρξης της μετάφρασης (κωδικόνιο AUG), οι οποίες εντοπίζονται στην θηλιά και στο στέλεχος, αντίστοιχα. Η θηλιά που σχηματίζεται και στην οποία εντοπίζεται η RBS έχει μήκος 11 nt. Η θέση έναρξης της μετάφρασης παραμένει ασύζευκτη και κατ΄ επέκταση προκύπτει κύρτωμα στο στέλεχος της θηλιάς. Το τελευταίο, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι και η RBS τοποθετείται κατά μήκος της μονόκλωνης θηλιάς, προσδίδει την ευελιξία στο σύστημα να στοχεύσει οποιαδήποτε τυχαία αλληλουχία RNA, καταρρίπτοντας την προϋπόθεση το Trigger RNA να περιέχει τις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες. Στο 5’ άκρο της δομής στελέχους-θηλιάς εντοπίζεται η μονόκλωνη αλληλουχία του Toehold, η οποία είναι συμπληρωματική του Trigger RNA. Παρουσία του Trigger RNA, πραγματοποιείται υβριδισμός λόγω συμπληρωματικότητας και κατ’ επέκταση επάγεται αλλαγή της διαμόρφωσης του Switch RNA. Η δομή στελέχους θηλιάς ανοίγει και η θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος καθίσταται πλέον προσβάσιμη από το ριβόσωμα, το οποίο προσδένεται σε αυτή και ξεκινά την μετάφραση της καθοδικής κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου αναφοράς παράγοντας σήμα (Εικόνα 10) (57).



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της έκφρασης από τα Toehold Switches. Το σύστημα Toehold Switch αποτελείται από το Switch RNA και το Trigger RNA. Το Switch RNA συνίσταται από μία δομή στελέχους-θηλιάς ανοδικά της κωδικής αλληλουχίας ενός γονιδίου αναφοράς. Η αλληλουχία του 5’ άκρου του Toehold είναι συμπληρωματική του RNA στόχου ή Trigger RNA. Παρουσία του Trigger RNA, το σύστημα ενεργοποιείται καθώς οι συμπληρωματικές αλληλουχίες υβριδοποιούνται και το Switch RNA αλλάζει διαμόρφωση, επιτρέποντας το ριβόσωμα να προσδεθεί στην RBS και να επιτελέσει μετάφραση του καθοδικού γονιδίου αναφοράς (59).

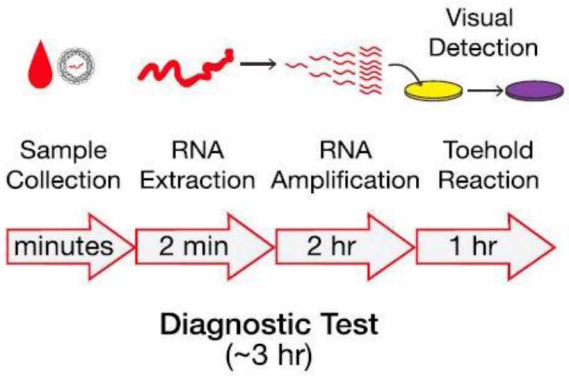
2.1.3 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ZIKV ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ TOEHOLD SWITCHES

Το 2015 σημειώθηκε η πρώτη μεγάλη επιδημία από τον ιό Zika (ZIKV) στην Βραζιλία καθώς και σε χώρες της Κεντρικής και Νότιας Αμερικής. Το 2016, ο ιός ανακηρύχθηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως επείγον πρόβλημα δημόσιας υγείας και υπήρξε έκκληση για την ανάπτυξη μιας γρήγορης και ακριβούς διαγνωστικής μεθόδου. Την ίδια χρονιά, λίγους μήνες αργότερα, ο Pardee και οι συνεργάτες του γνωστοποίησαν την ανάπτυξη μίας διαγνωστικής μεθόδου βασισμένη στην συνθετική βιολογία, για την γρήγορη, ειδική και χαμηλού κόστους ανίχνευση του ιού Zika (60). Αξιοποιώντας την τεχνολογία των Toehold Switches που δημοσιεύθηκε από τους Green *et al.* το 2014, δημιούργησαν βιοαισθητήρες-ριβοδιακόπτες που ρυθμίζουν την μετάφραση του ενζύμου

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

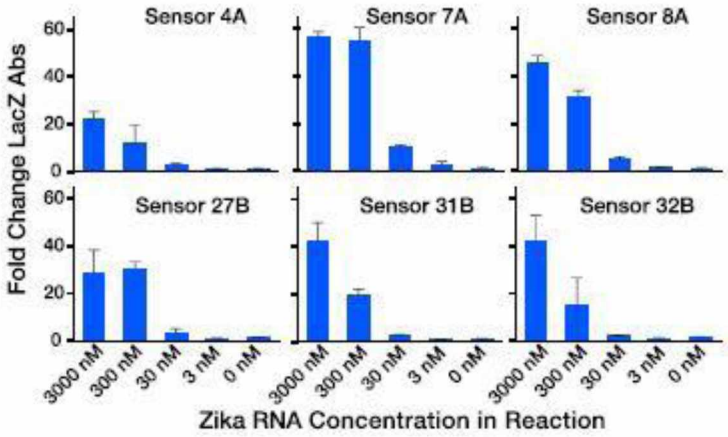
LacZ (57, 59). Παρουσία του ιικού ZIKV RNA και με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος (chlorophenol red-b-D-galactopyranoside), το LacZ καταλύει την μετατροπή του από κίτρινο σε μωβ χρώμα (chlorophenol red), επιτρέποντας έτσι την οπτικοποίηση του θετικού αποτελέσματος με γυμνό μάτι (60).

Για την αύξηση τη διαγνωστικής ευαισθησίας της μεθόδου, ενσωματώθηκε στην διαδικασία προ-ενίσχυση του ιικού RNA μέσω ισοθερμικής ενίσχυσης NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), για την ανίχνευση του ιού σε κλινικά δείγματα ορού, που συχνά η συγκέντρωσή του ανήκει στην κλίμακα των femtomole. Όπως προτείνεται από τους ίδιους, για την απελευθέρωση του ιικού RNA αρκεί η θέρμανση του ορού για ελάχιστα λεπτά (2 λεπτά, 95˚C). Τελικώς, προκύπτει μία διαγνωστική προσέγγιση που επιτρέπει την ανίχνευση του ιού ZIKV, στο σύντομο χρονικό διάστημα των περίπου τριών ωρών (Εικόνα 11) (60).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση της πορείας του διαγνωστικού τεστ για την ανίχνευση του ιικού ZIKV RNA (60). Μετά την συλλογή του αίματος, ο ορός θερμαίνεται στους 95˚C για 2 λεπτά για την απελευθέρωση του ιικού RNA. Στην συνέχεια, μέσω ισοθερμικής ενίσχυσης NASBA, το ιικό RNA πολλαπλασιάζεται και τέλος χρησιμοποιείται για την οπτική ανίχνευσή του. Στα θετικά δείγματα, το RNA του ιού αλληλεπιδρά με Toehold και κατ΄ επέκταση επάγει την έκφραση του γονιδίου του ενζύμου lacZ, το οποίο παρουσία του κατάλληλου υποστρώματος μετατρέπει το χρώμα του από κίτρινο σε μωβ.

Για την μεταφορά της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας και εκτός εργαστηριακών συνθηκών, γεγονός που ενισχύει την πρακτικότητα της μεθόδου σε μη ειδικές εγκαταστάσεις, το σύστημα *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης εναποτέθηκε σε λυόφιλη μορφή επάνω σε χαρτί, μέσω



Εικόνα 12. Ευαισθησία των βιοαισθητήρων στην ανίχνευση του ιικού ZIKV RNA, χωρίς προενίσχυση του RNA (60). Η εκάστοτε μέτρηση προκύπτει από την μέτρηση της απορρόφησης (570 nm), μετά από 30 λεπτά επώασης του Trigger RNA με το in vitro σύστημα επάνω στο χαρτί, στους 37˚C.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ψυχρής ξήρανσης. Η λυοφιλίωση του συστήματος επιτρέπει την διατήρησή του ακόμη και σε θερμοκρασία δωματίου, καθώς επίσης και την εύκολη διανομή του οπουδήποτε. Οι πιο ευαίσθητοι από τους βιοαισθητήρες που σχεδιάστηκαν κατάφεραν να ανιχνεύσουν ελάχιστες συγκεντρώσεις του ιικού RNA, της τάξης των 30nM, χωρίς προενίσχυση του ιικού γονιδιώματος (Εικόνα 12) (59, 60).

Η συγκεκριμένη προσέγγιση ανίχνευσης του ZIKV RNA που περιγράφηκε από τον Pardee και τους συνεργάτες του, δύναται να αποτελέσει μία γενικευμένη μέθοδο ανίχνευσης οποιουδήποτε αναδυόμενου μολυσματικού παράγοντα.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}

3.1 ΣΚΟΠΟΣ

Κρούσματα του ιού του Δυτικού Νείλου καταγράφονται στην χώρα μας ετησίως από το 2010 κι έκτοτε (εκτός των περιόδων μετάδοσης 2015-2016), σχεδόν σε όλες τις Περιφέρειες. Αυτό υποδεικνύει ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εγκατασταθεί στην Ελλάδα. Κατ' επέκταση, από τότε και κάθε χρόνο εκτελούνται ολοκληρωμένα προγράμματα επιδημιολογικής επιτήρησης του γενικού ανθρώπινου πληθυσμού, της ορνιθολογικής δεξαμενής, των ορνιθοφιλικών κουνουπιών καθώς και τον υπόλοιπων ζωικών ξενιστών. Κυριότερα, εξαιτίας της πολύπλοκης επιδημιολογίας του ιού είναι αναγκαία η ενδελεχής καταγραφή και παρακολούθηση της δυναμικής του μετάδοσης, για την καλύτερη πρόβλεψη της επιδημιολογίας του και την προστασία του γενικού πληθυσμού. Όμως, όπως ήδη επισημάνθηκε στο παρόν κείμενο, τα υπάρχοντα μοριακά εργαλεία αυξάνουν το κόστος, ενώ οι ορολογικές προσεγγίσεις ελλοχεύουν την ανάπτυξη μη αξιόπιστου αποτελέσματος εξαιτίας της διασταυρούμενης αντίδρασης με συγγενικούς ιούς. Το υψηλό κόστος σε συνδυασμό με την υποδιάγνωση δυσχεραίνουν την διαμόρφωση μίας ευρύτερης εικόνας της επιδημιολογίας του ιού, στην Ελλάδα και όχι μόνο. Συνεπώς, η ανάγκη για την βελτίωση των διαγνωστικών εργαλείων για τον ιό του Δυτικού Νείλου είναι αναπόδραστη.

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η δημιουργία ενός ευαίσθητου, εξειδικευμένου και εξαιρετικά χαμηλού κόστους διαγνωστικού εργαλείου, για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα (πτηνά, ορνιθοφιλικά κουνούπια και θηλαστικά). Η δημιουργία αυτού του διαγνωστικού τεστ βασίστηκε σε μία καινοτόμο μεθοδολογία που πρόσφατα δημοσιεύθηκε για έναν συγγενικό ιό του ιού του Δυτικού Νείλου, τον ιό Zika. Το διαγνωστικό δυναμικό αυτού του εργαλείου βασίζεται στις εφαρμογές της Συνθετικής Βιολογίας και συγκεκριμένα στην ανάπτυξη ευαίσθητων Toehold Switch RNA βιοαισθητήρων, ειδικών για το RNA του ιού του Δυτικού Νείλου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^{Ο}

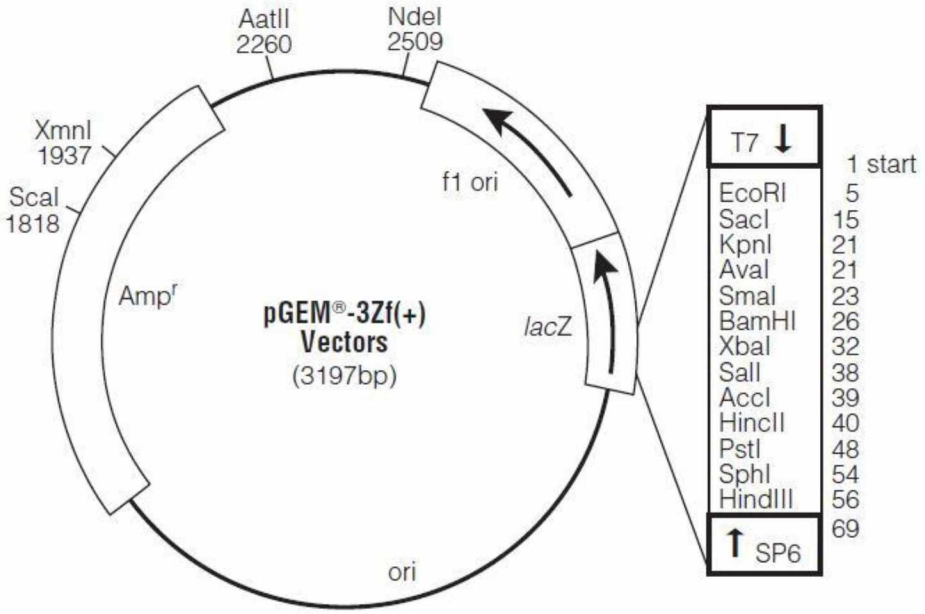
4.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο εργαστήριο είχε ήδη προηγηθεί βιοπληροφορική ανάλυση για την εύρεση των υποψήφιων Toeholds και πιθανών στόχων στο ιικό γονιδίωμα, δηλαδή τα αντίστοιχα υποψήφια Toehold Switch RNAs. Από την *in silico* ανάλυση προέκυψε ένα αρχικό pool 30.000 πιθανών στόχων και επιλέχτηκαν τελικώς μερικές δεκάδες Toehold Switch RNAs, μήκους 35 νουκλεοτιδίων, τα οποία πληρούν τις επιθυμητές παραμέτρους, αναφορικά με την θερμοδυναμική σταθερότητα, την ευαισθησία, την εξειδίκευσή τους και την απουσία ομολογίας με το ανθρώπινο γονιδίωμα ή μεταγράφωμα. Η εξειδίκευση των υποψήφιων Toehold Switch RNAs επιβεβαιώθηκε στα αλληλουχημένα γονιδιώματα 15 στελεχών του ιού του Δυτικού Νείλου, που απομονώθηκαν από τον Ελλαδικό χώρο, ενώ συνεκτιμήθηκαν και αλληλουχίες από συγγενικούς ιούς του WNV, 8 από τον Δάγκειο ιό (DENV) και 2 από τον ιό Zika (ZIKV) για την εύρεση περιοχών του γονιδιώματος που δεν εμφανίζουν ομολογία. Κατ' επέκταση, με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης και ανάπτυξης ψευδώς θετικού αποτελέσματος σε περιπτώσεις μόλυνσης με κάποιον άλλον συγγενικό ιό Flavi, όπως συμβαίνει με τις ορολογικές/ανοσολογικές τεχνικές ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται σήμερα. Έτσι, τελικώς επιλέχτηκαν Toehold Switch RNAs τα οποία 1^{ον} στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές μεταξύ των γονιδιωμάτων του ιού ενώ 2^{ον} δεν εμφανίζουν σημαντική ομολογία με τα γονιδιώματα των συγγενικών ιών DENV και ZIKV. Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, ελέγχθηκε ένα (Switch RNA_41) από το σύνολο των υποψήφιων Toehold Switch RNAs, ως πιλότος για την απόδειξη του σκοπού της εργασίας.

4.1.1 ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ TOEHOLD SWITCHES

Τα ποικίλα πλασμιδιακά constructs κατασκευάστηκαν μέσω κλωνοποίησης με χρήση περιοριστικών ενζύμων, προσέγγιση η οποία εξασφαλίζει την εισαγωγή του εκάστοτε ενθέματος με την επιθυμητή κατεύθυνση (directional cloning). Η ένθεση του κάθε τμήματος DNA με την κατάλληλη κατεύθυνση είναι καίρια διότι πρόκειται για ένα σύστημα έκφρασης. Για την δημιουργία των πλασμιδιακών constructs χρησιμοποιήθηκε ένας τροποποιημένος φορέας pGEM-3zf+ (Promega) (Εικόνα 13), ο οποίος τροποποιήθηκε εκ νέου με σκοπό την βελτιστοποίηση της παραγωγής ριβοδιακοπτών. Αρχικά, εισήχθη στον φορέα η απαραίτητη αλληλουχία λήξης της μεταγραφής (T7 terminator), καθοδικά του T7 υποκινητή που εντοπίζεται πριν την θέση του πολυσυνδέτη του φορέα. Ενδιάμεσα του υποκινητή και της αλληλουχίας λήξης, ενσωματώθηκαν κατά σειρά οι αλληλουχίες των Toehold-Switch RNAs (ξεχωριστά για WNV, ZIKV και DENV) και των εκάστοτε γονιδίων αναφοράς. Στην παρούσα εργασία, αξιοποιήθηκαν ως πιλότοι δύο διαφορετικές προσεγγίσεις σχετικά με τα στοιχεία αναφοράς: i) το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης (Green Fluorescent Protein, GFP), ii) το γονίδιο λουσιφεράσης (Luciferase, LUC).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 13. Χάρτης του τροποποιημένου πλασμιδιακού φορέα pGEM-3zf(+).

Για την ένθεση του κάθε τμήματος DNA, πραγματοποιήθηκε αρχικά γραμμοποίηση του φορέα, με χρήση κάθε φορά διαφορετικών ζευγών περιοριστικών ενζύμων. Με την προσέγγιση αυτή, πέρα από την γραμμοποίηση εξασφαλίστηκε και η δημιουργία μονόκλωνων άκρων στον φορέα. Αναλόγως, τα επιθυμητά ενθέματα υπεβλήθησαν σε πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού, ούτως ώστε να προκύψουν συμπληρωματικά άκρα με τα άκρα του φορέα.

Για την συνένωση ενθεμάτων και πλασμιδιακού φορέα πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης. Για την αντίδραση λιγάσης χρησιμοποιήθηκε η T4 DNA λιγάση (New England Biolabs), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, το μείγμα της αντίδρασης περιείχε 2μl T4 DNA λιγάσης, 2 μl του διαλύματος αλάτων T4 DNA Ligase Reaction Buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM ATP, 10 mM DTT) και συγκέντρωση του εκάστοτε ενθέματος τριπλάσια του πλασμιδιακού φορέα. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 16˚C, με ολονύκτια επώαση (≈16 ώρες).

4.1.2 ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ

Για την παραγωγή των πλασμιδιακών κατασκευών σε μεγαλύτερη κλίμακα ακολούθησε μοριακή κλωνοποίηση αυτών μέσω μετασχηματισμού δεκτικών βακτηριακών κυττάρων *E. coli*, στελέχους DH5α. Για τον μετασχηματισμό, 10 μl από την αντίδραση λιγάσης προστέθηκαν σε 70μl δεκτικών κυττάρων και ακολούθησε επώαση 20 λεπτών στον πάγο. Στην συνέχεια, ο μετασχηματισμός των βακτηρίων πραγματοποιήθηκε με θερμικό σοκ (heat shock transformation), στους 42°C για 50sec και επακόλουθη επώαση στον πάγο για 2 λεπτά. Ακολούθησε προσθήκη 2ml LB Broth και επώαση 1h, στις 180 στροφές/min στους 37°C. Μετά την επώαση, 250μl από την υγρή καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τρυβλίο με LB Agar, εμπλουτισμένο με αμπικιλλίνη 100μg/ml και επωάστηκαν ολονυκτίως στους 37°C. Την επόμενη ημέρα, επιλέχτηκε μεμονωμένη αποικία για υγρή

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

επανακαλλιέργεια σε 2ml υγρού θρεπτικού LB, ολονυκτίως. Επιπλέον, δημιουργήθηκε στοκ γλυκερόλης του συγκεκριμένου βακτηριακού κλώνου, με τελική συγκέντρωση γλυκερόλης 25% και αποθηκεύτηκε στους -80°C για μελλοντική χρήση.

Η εξαγωγή των πλασμιδίων σε μικρή κλίμακα (Mini-preps) έγινε με χρήση του kit NucleoSpin® Plasmid Macherey Nagel. Για τον διαγνωστικό έλεγχο των πλασμιδίων πραγματοποιήθηκε αντίδραση περιοριστικής πέψης με την χρήση των κατάλληλων ενζύμων περιορισμού για το εκάστοτε ένθεμα. Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων των πέψεων έγινε σε γέλη αγαρόζης 1%. Τα δείγματα τα οποία εμφάνισαν το επιθυμητό πρότυπο ζωνών στην γέλη, επιλέχθηκαν και απεστάλησαν για αλληλούχηση ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση του επιθυμητού τμήματος DNA. Τελικώς, τα επιβεβαιωμένα από την αλληλούχηση θετικά δείγματα προχώρησαν πλασμιδιακή εξαγωγή μεγαλύτερης κλίμακας (Midi-preps). Για τον σκοπό αυτό, μικρή ποσότητα από το στοκ γλυκερόλης χρησιμοποιήθηκε σε ολοήμερη καλλιέργεια (6-8 ώρες) σε 2ml θρεπτικού LB, στους 37°C και επακόλουθη ολονύκτια καλλιέργεια σε 100ml θρεπτικού LB. Η εξαγωγή των πλασμιδίων έγινε με το kit NucleoBond® Xtra Midi Macherey Nagel.

4.1.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA

Για την πιλοτική δοκιμή των Toehold Switch RNAs που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε RNA του ιού του Δυτικού Νείλου. Επειδή ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι παθογόνο επιπέδου βιοασφάλειας 3 (Biosafety Level-3, BSL-3) και συνεπώς απαγορεύεται ο χειρισμός, η καλλιέργεια και η απομόνωση του ενεργού μολυσματικού ιού σε εργαστήριο με μικρότερο επίπεδο βιοασφάλειας, λάβαμε ήδη απομονωμένο ιικό RNA από το ΚΕΕΛΠΝΟ.

Για την απομόνωση του ολικού RNA από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού επιθηλίου HFE 145 (βλ. παρακάτω), αρχικά προστέθηκαν στο κυτταρικό δείγμα 1000μl TRI, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιου και ακολούθησε καλό vortex. Τα δείγματα επωάστηκαν για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά, στα 14.000rpm. Ακολούθησε προσεκτική συλλογή του υπερκειμένου σε νέο tube, όπου και προστέθηκε ίση ποσότητα ισοπροπανόλης. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον πάγο για 10 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκαν για 15 λεπτά, στα 14.000rpm, στους 4°C. Ακολούθησε απομάκρυνση του υπερκειμένου, επακόλουθη προσθήκη 500μl κρύας αιθανόλης 70% και vortex για την έκπλυση του ιζήματος. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για άλλα 5 λεπτά, στα 14.000rpm. Το τελευταίο βήμα πραγματοποιήθηκε δύο φορές. Μετά την φυγοκέντρηση, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο και το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει από τα υπολείμματα αιθανόλης, για 10-15 λεπτά. Στο τέλος, προστέθηκαν 25μl RNase free H_2O και έγινε επαναδιάλυση του ιζύματος στους 65°C για 5 λεπτά, ακολούθησε πολύ καλό vortex και τελικώς το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

4.1.4 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ DNase

Προκειμένου να καταστραφούν όλα τα μόρια του γονιδιωματικού DNA που πιθανώς υπάρχουν στο απομονωμένο HFE 145 RNA, πραγματοποιήθηκε αντίδραση DNάσης (DNase treatment). Για την αντίδραση της DNάσης προστέθηκαν στα 25μl του RNA, 5μl DNase, 40μl Sodium Acetate και 330μl H_2O. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 1h, στους 37˚C. Ακολούθησε προσθήκη 400μl

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

χλωροφόρμιου, καλό vortex και φυγκέντρηση των δειγμάτων στα 14.000rpm για 5 λεπτά, στους 4˚C. Στην συνέχεια λήφθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο και μεταφέρθηκε σε νέο tube. Ακολούθησε προσθήκη 1000μl κρύας αιθανόλης, ανακίνηση 4-5 φορές και τοποθέτηση στους -80˚C για 1h. Μετά, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση του δείγματος στα 14.000rpm, για 30 λεπτά, στους 4˚C κι έπειτα αφαιρέθηκε προσεχτικά το υπερκείμενο χωρίς να διαταραχθεί η πελέτα. Ακολούθησε προσθήκη 500μl παγωμένης αιθανόλης 70% και φυγοκέντρησηστα 14.000rpm, για 5 λεπτά, στους 4˚C. Στην συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και το δείγμα αφέθηκε να στεγνώσει από τα τελευταία υπολείμματα αιθανόλης, για 10-15 λεπτά. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση του δείγματος σε 50μl RNase free H_2O, με επώαση στους 65˚C για 5 λεπτά. Ακολούθησε πολύ καλό vortex και τελικώς το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

4.1.5 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΛΩΝΩΝ cDNA

Επιπλέον, στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο ανίχνευσης και απόλυτης ποσοτικοποίησης του ιού με qPCR το οποίο θα αναλυθεί παρακάτω. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δείγματα για κατασκευή πρότυπης καμπύλης, τα οποία συνίστανται από ιικό RNA σε συγκεντρώσεις 100ng, 10ng, 1ng και 0ng, ενώ παραλλήλως καθένα από αυτά είναι εμπλουτισμένο με 1000ng ολικού ανθρώπινου RNA (WNV RNA spiked-in human total RNA), προερχόμενο από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού επιθηλίου HFE 145. Για την σύνθεση των cDNA κλώνων του ιικού RNA αλλά και του ολικού ανθρώπινου RNA, πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής με χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης Superscript III (Invitrogen™). Συγκεκριμένα, το μείγμα της κάθε αντίδρασης αντίστροφης μεταγραφής αποτελείτο από 4μl 5X First-Strand Buffer, 1μl 10μM dNTPs, 1μl 20μM Random Primers, 2μl DTT, 1μl RNase out, 1μl Superscript III, 7μl H_2O, 1000ng HFE 145 RNA και αντιστοίχως 100ng, 10ng, 1ng και 0ng WNV RNA για την εκάστοτε αντίδραση. Η αντίστροφη έλαβε χώρα για 2h, στους 55˚C. Με το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκαν στο εκάστοτε δείγμα 380μl H_2O και αποθηκεύτηκαν στους -20˚C.

4.1.6 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ qPCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, δημιουργήθηκε κι ένα πρωτόκολλο ανίχνευσης και απόλυτης ποσοτικοποίησης του ιού με qPCR. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν δείγματα για κατασκευή πρότυπης καμπύλης, τα οποία συνίστανται από ιικό WNV RNA σε συγκεντρώσεις 100ng, 10ng, 1ng και 0ng, ενώ παραλλήλως είναι εμπλουτισμένα με 1000ng ολικού ανθρώπινου RNA (WNV RNA spiked-in human total RNA), προερχόμενο από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου γαστρικού επιθηλίου HFE 145, προσομοιάζοντας το μικροπεριβάλλον των κλινικών δειγμάτων. Πρακτικά αυτό μεταφράζεται στο ότι με αυτό το πρωτόκολλο είναι δυνατή η ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ιού, τόσο σε κλινικά όσο και σε περιβαλλοντικά δείγματα (όπως πτηνών, κουνουπιών και θηλαστικών).

Το πρωτόκολλο της ποσοτικής PCR (qPCR) που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

1. 95.0˚C, 3:00

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

2. 95.0˚C, 0:10
3. 58.0˚C, 0:20 } x44 κύκλοι
4. 72.0˚C, 0:30
5. Melt Curve Analysis: 55.0˚C to 95˚, increment 0.5˚C for 0:05
6. 12.0 ˚C, ∞

Για την αντίδραση της qPCR χρησιμοποιήθηκαν 10μl SYBR™ Select Master Mix (2x), 1μl του εκάστοτε εκκινητή (Forward & Reverse), 4μl DNA μήτρας, 4μl H_2O. Η qPCR έγινε στο μηχάνημα CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad).

4.1.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΙΙΚΟΥ RNA-MOLES ΙΟΥ

Για την μετατροπή της ποσότητας του ιικού μονόκλωνου RNA (ssRNA) σε moles εκτελέστηκαν οι παρακάτω υπολογισμοί:

- moles ssRNA = μάζα ssRNA (g) / [(μήκος ssRNA (nt) x 321.47 g/mol) + 18.02 g/mol

  όπου το μέσο μοριακό βάρος ενός ριβονουκλεοτιδίου ισούται με 321.47 g/mol (αφαιρουμένου του εκάστοτε μορίου H_2O κατά την δημιουργία του φωσφοδιεστερικού δεσμού), ενώ το 18.02 g/mol συνυπολογίζεται για τα εκάστοτε -OH και -H μόρια των άκρων της RNA αλυσίδας.

Για τον υπολογισμό του αριθμού RNA αντιγράφων πολλαπλασιάζεται ο αριθμός των moles ssRNA επί τη σταθερά Avogadro. Δηλαδή:

- RNA copy number = moles ssRNA x 6.022×10^{23}

4.1.8 IN VITRO TRANSCRIPTION-TRANSLATION

Για την παραγωγή των RNA μορίων από τα πλασμίδια, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση με την χρήση του PURExpress® kit (New England Biolabs), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή.

IN VITRO TRANSCRIPTION-TRANSLATION ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ: GFP

Η αντίδραση *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης του φορέα που περιείχε ως γονίδιο αναφοράς το GFP, πραγματοποιήθηκε αρχικά με 500ng των παρακάτω πλασμιδίων, παρουσία ή απουσία ιικού WNV RNA:

- στον φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, παρουσία έως 100ng ιικού WNV RNA
- στον φορέα pGEM-3zf(+) με το ZIKV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, παρουσία έως 100ng ιικού WNV RNA (βιολογικό αρνητικό κοντρόλ)
- Στον φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, απουσία ιικού WNV RNA (τεχνικό αρνητικό κοντρόλ)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 2 ώρες, στους 37 ˚C. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το σήμα του GFP μετρήθηκε στο μηχάνημα Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Scientific™), με χρήση του λογισμικού SkanIt RE 5.0. Η διέγερση (excitation) της φθορίζουσας πρωτεΐνης έγινε στα 488nm, ενώ η ανίχνευση (emission) του σήματος στα 520nm.

IN VITRO TRANSCRIPTION-TRANSLATION ΦΟΡΕΑ ΜΕ ΓΟΝΙΔΙΟ ΑΝΑΦΟΡΑΣ: ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗ

Η αντίδραση *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης του φορέα που περιείχε ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση, πραγματοποιήθηκε:

- σε 500ng φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση, παρουσία έως 100ng ιικού WNV RNA
- σε 500ng φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση, απουσία ιικού WNV RNA (τεχνικό αρνητικό κοντρόλ)

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε για 4 ώρες, στους 37˚C. Μετά το πέρας της αντίδρασης, προστέθηκε σε αυτήν κατάλληλη ποσότητα λουσιφερίνης (Luciferase Assay Substrate), από το Luciferase Assay System kit (Promega), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Αμέσως, το σήμα της λουσιφεράσης μετρήθηκε στο φωταυγειόμετρο (λουμινόμετρο) Lumat Single Tube Luminometer LB 9508 (Berthold Technologies), με χρήση του λογισμικού ICE.

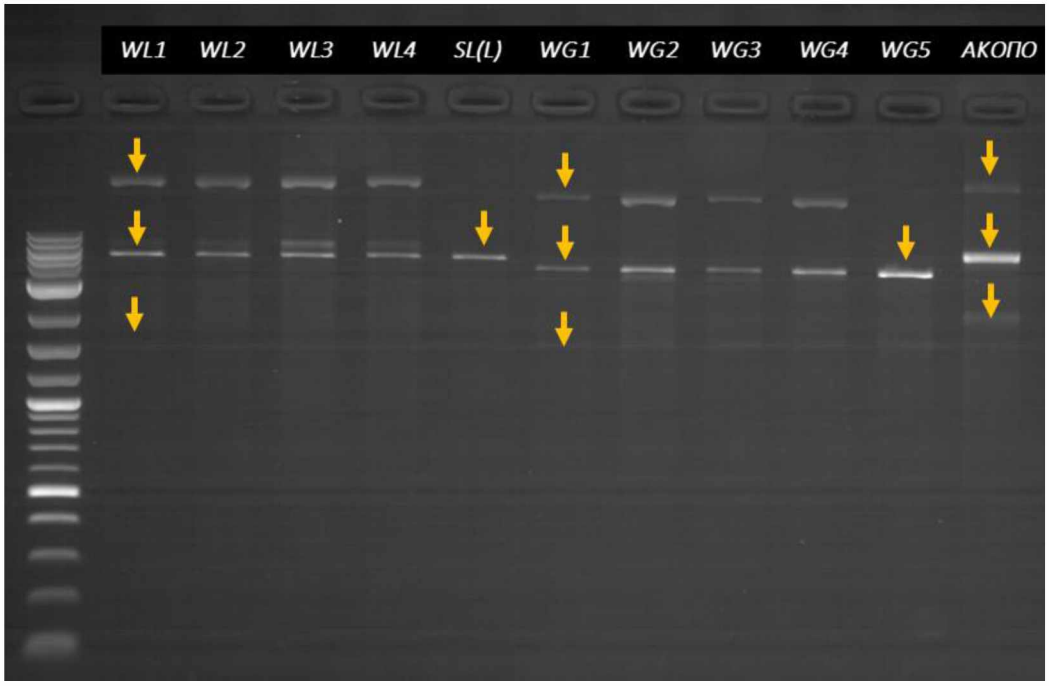
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο

5.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1.1 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΕΣ ΠΕΨΕΙΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΩΝ ΦΟΡΕΩΝ

Με βάση τους χάρτες των πλασμιδιακών κατασκευών, επιλέχθηκαν τα κατάλληλα ένζυμα περιορισμού για το εκάστοτε πλασμίδιο και πραγματοποιήθηκαν διαγνωστικές πέψεις ούτως ώστε να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ένθεση των επιθυμητών ενθεμάτων. Για τις πέψεις χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα περιορισμού από τις εταιρίες New England Biolabs και Minotech, ενώ οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις οδηγίες των κατασκευαστών. Ενδεικτικά, παρακάτω παρατίθεται ενδεικτικά μία εικόνα γέλης ηλεκτροφόρησης 1%, TBE (Εικόνα 14). Στο παρόν παράδειγμα, πραγματοποιήθηκε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο KpnI (New England Biolabs), για τον έλεγχο της ύπαρξης του WNV Toehold Switch RNA 41, στον φορέα pGEM-3zf(+), στον οποίο προηγουμένως έχουν ήδη προστεθεί οι αλληλουχίες λήξης της T7 μεταγραφής, και ξεχωριστά τα γονίδια αναφοράς λουσιφεράσης (WL) και GFP (WG). Ο θετικός φορέας παραμένει άκοπος κατά την πέψη (συνεπώς διακρίνονται στην γέλη οι 3 μπάντες που αντιπροσωπεύουν τις διαμορφώσεις του πλασμιδίου), ενώ ο αρνητικός πέπτεται και γραμμοποιείται (μία μπάντα στην γέλη). Τα δείγματα WL1-WL4 και WG1-WG4 είναι θετικά.

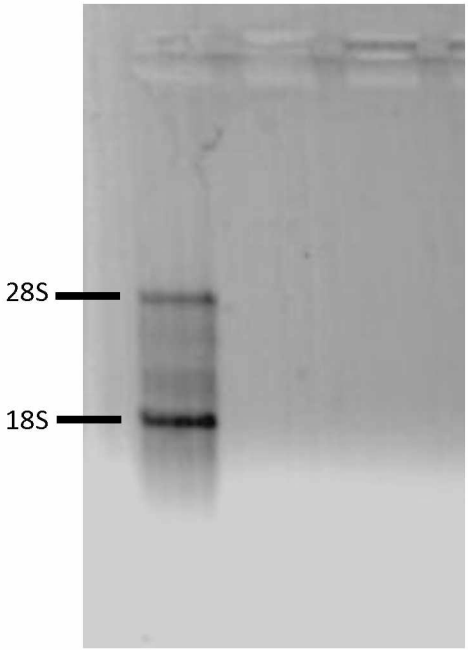


Εικόνα 14. Ενδεικτική εικόνα διαγνωστικών πέψεων για την εξέταση της παρουσίας του επιθυμητού WNV Toehold-Switch RNA. Συντομογραφίες: WL: φορέας pGEM-3zf(+) που περιέχει το WNV Toehold-Switch RNA 41 και το γονίδιο λουσιφεράσης, WG: φορέας pGEM-3zf(+) που περιέχει το WNV Switch RNA και το γονίδιο GFP, SL: φορέας pGEM-3zf(+) χωρίς ένθεμα (αρνητικό κοντρόλ), άκοπο: κοντρόλ από φορέα που δεν έχει υποστεί πέψη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

5.1.2 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ RNA ΣΕ ΓΕΛΗ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, για την δημιουργία του πρωτοκόλλου ανίχνευσης και απόλυτης ποσοτικοποίησης του ιού μέσω qPCR, αξιοποιήθηκε ολικό ανθρώπινο RNA, προερχόμενο από την κυτταρική φυσιολογικού επιθηλίου HFE 145. Για την επιβεβαίωση ότι κατά την απομόνωση του RNA δεν υπήρξε αποικοδόμηση αυτού, 1μg του RNA ηλεκτροφορήθηκε σε γέλη αγαρόζης 1%, TBE (Εικόνα 15).



Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση RNA σε γέλη αγαρόζης 1% για τον έλεγχο της αποικοδόμησής του.

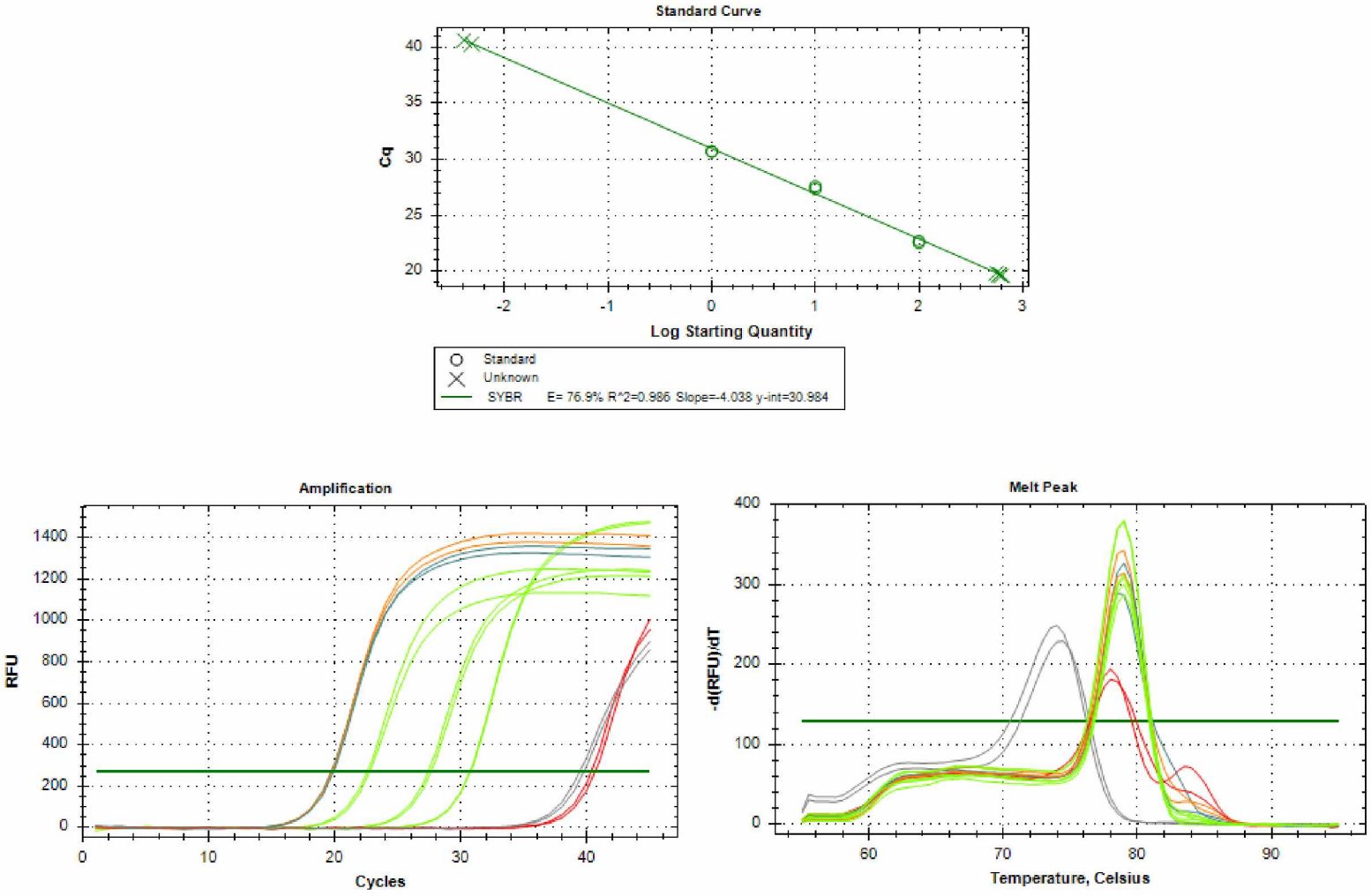
Στην παραπάνω εικόνα φαίνονται δύο διακριτές ζώνες οι οποίες αντιστοιχούν στην μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (28S) και στην μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (18S), γεγονός που αποδεικνύει ότι το RNA που απομονώθηκε δεν είναι αποικοδομημένο και συνεπώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακολούθως στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής για τον σχηματισμό του cDNA.

5.1.3 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΤΗΣ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ ΜΕ qPCR

Το πρωτόκολλο ανίχνευσης και απόλυτης ποσοτικοποίησης που δημιουργήθηκε καθιστά δυνατή την ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ιού από οποιοδήποτε δείγμα. Η κατασκευή της πρότυπης καμπύλης βασίστηκε σε δείγματα (Standards) που συνίσταντο από RNA του ιού του Δυτικού Νείλου, συγκεντρώσεων 100ng, 10ng, 1ng και 0ng, ενώ κάθε ένα από αυτά ήταν εμπλουτισμένο με 1000ng ολικού ανθρώπινου RNA από την κυτταρική σειρά ανθρώπινου επιθηλίου HFE 145. Για την πιλοτική δοκιμή αυτού του πρωτοκόλλου χρησιμοποιήθηκαν 2 διαφορετικές απομονώσεις ιικού RNA (WNV1 και WNV2). Αρχικά, η συγκέντρωση αυτών των RNA δειγμάτων υπολογίστηκε με χρήση του φασματοφωτομέτρου Nanodrop στα 100 και 111,6 ng/μl, αντιστοίχως. Για την qPCR όλα τα δείγματα (συμπεριλαμβανομένων και των standards) χρησιμοποιήθηκαν εις διπλούν. Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο κατάφερε να ποσοτικοποιήσει το ιικό RNA με εξαιρετική ακρίβεια την ποσότητα των δύο δειγμάτων του RNA του ιού και με αξιοθαύμαστη επαναληψιμότητα (Εικόνα 16). Αναφορικά

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

με το δείγμα WNV1, οι δύο διαφορετικές αντιδράσεις έδωσαν ίδιο Ct value (19,86), ενώ για το δείγμα WNV2 τα δύο Ct values διέφεραν μόλις 0.2 μονάδες (19,68 και 19,88).



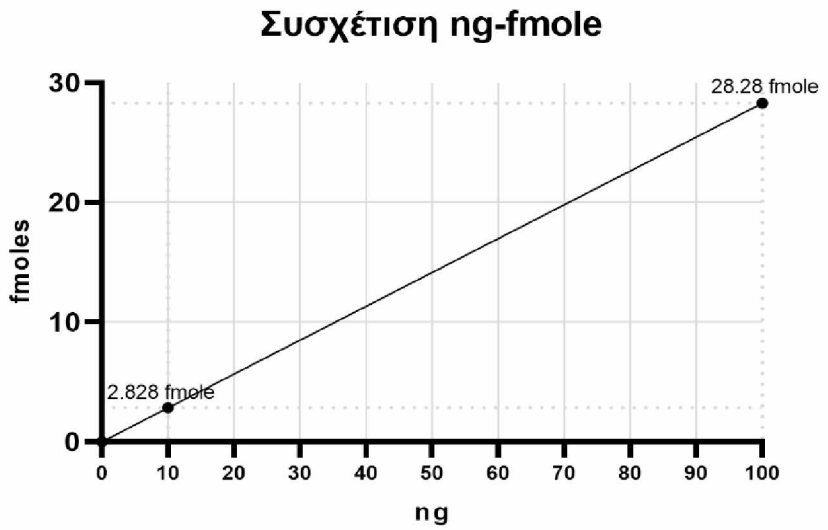
Εικόνα 16. Πρότυπη καμπύλη, Amplification plot και Melting Curve plot της qPCR. Με πορτοκαλί και γαλάζιο χρώμα συμβολίζονται τα δείγματα WNV1 και WNV2 του ιικού RNA, με πράσινο τα standards (100,10 και 1ng), με γκρι και κόκκινο τα αρνητικά κοντρόλ «no RT» και 0ng ιικού RNA, αντιστοίχως.

5.1.4 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΣΟΤΗΤΑΣ ΙΙΚΟΥ RNA-MOLES ΙΟΥ

Με βάση τους υπολογισμούς που αναφέρονται στην ενότητα 4.1.7, έγινε ενδεικτικά η μετατροπή των ποσοτήτων 100ng και 10ng του ιικού RNA σε moles. Από τους υπολογισμούς προέκυψε ότι

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

100ng μονόκλωνου ιικού RNA, αντιστοιχούν σε 28.28 femtomoles. Αναλόγως, 10ng μονόκλωνου ιικού RNA, αντιστοιχούν σε 2.828 femtomoles (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Συσχέτιση ποσότητας ιικού RNA (ng) και moles του ιού. Ενδεικτικά, έχει γίνει η μετατροπή 10ng και 100ng του μονόκλωνου ιικού RNA σε moles (2.828 femtomoles και 28.28 femtomoles, αντίστοιχα).

5.1.5 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ WNV TOEHOLD SWITCH RNA ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΓΟΝΙΔΙΟ GFP

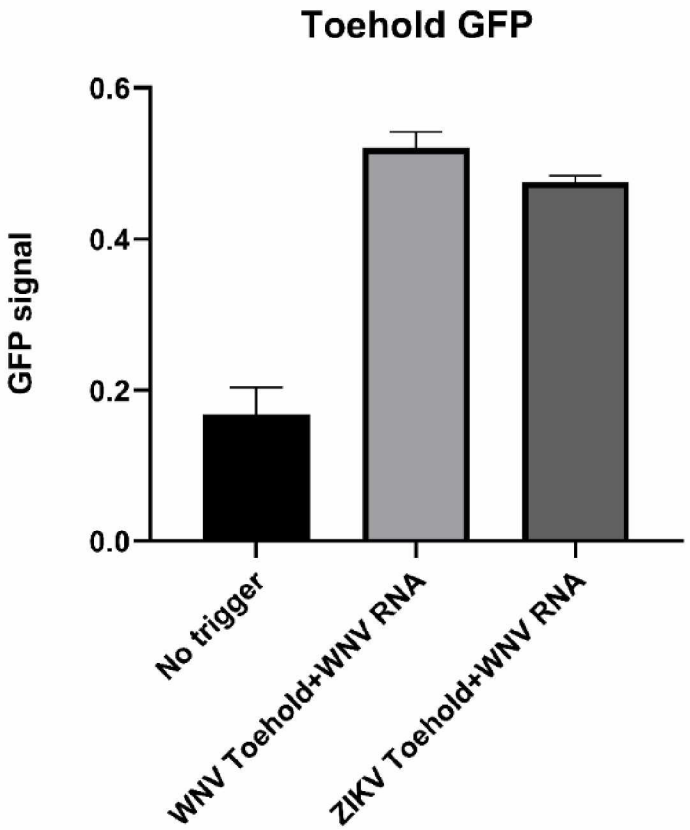
Όπως ήδη προαναφέρθηκε, μετά την ολοκλήρωση της *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης του φορέα που περιείχε ως γονίδιο αναφοράς το GFP, έγινε μέτρηση του παραγόμενου σήματος GFP, στο μηχάνημα Varioskan™ LUX multimode microplate reader (Thermo Scientific™). Η μέτρηση του σήματος GFP έγινε στα εξής δείγματα:

- στον φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, παρουσία ιικού WNV RNA
- στον φορέα pGEM-3zf(+) με το ZIKV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, παρουσία ιικού WNV RNA (βιολογικό αρνητικό κοντρόλ)
- στον φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς GFP, απουσία ιικού WNV RNA (τεχνικό αρνητικό κοντρόλ)

Στις μετρήσεις συμπεριλήφθηκε μέτρηση τυφλού δείγματος (blank) για τον υπολογισμό του μη ειδικού θορύβου, ο οποίος και τελικώς αφαιρέθηκε από τις τιμές που παρατηρήθηκαν.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατέστη φανερή η ικανότητα ανίχνευσης του ιικού RNA από το Toehold RNA με το γονίδιο αναφοράς GFP, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία (Εικόνα 18). Η ένταση του σήματος GFP που ανιχνεύθηκε στην αντίδραση του WNV Toehold Switch RNA παρουσία του ιικού RNA ήταν κατά τρείς φορές μεγαλύτερη από την ένταση του σήματος που ανιχνεύθηκε στο τεχνικό αρνητικό κοντρόλ, δηλαδή στην αντίδραση με τον φορέα WNV Toehold Switch RNA, απουσία ιικού RNA (0,520 και 0,168 RFU, αντίστοιχα). Το γεγονός αυτό

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 18. Ανίχνευση του ιικού WNV RNA από τον Toehold Switch RNA βιοαισθητήρα, με γονίδιο αναφοράς GFP. Κατά την πιλοτική δοκιμή, ο βιοαισθητήρας κατάφερε να ανιχνεύσει το ιικό WNV RNA, παράγοντας σήμα κατά τρεις φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με το τεχνικό αρνητικό κοντρόλ (WNV Toehold, απουσία ιικού RNA). Επιπλέον, παρατηρήθηκε παραγωγή σήματος και στην περίπτωση του βιολογικού αρνητικού κοντρόλ (ZIKV Toehold, παρουσία ιικού RNA).

αποδεικνύει πως πράγματι η παρουσία του ιικού RNA ενίσχυσε την έκφραση του γονιδίου GFP σε ικανοποιητικό βαθμό η οποία θεωρητικά, απουσία του Trigger RNA (δηλαδή του ιικού γονιδιώματος), εμποδίζεται λόγω της ύπαρξης της δομής στελέχους-θηλιάς ('hairpin') του Toehold. Από την άλλη, οι μετρήσεις αποκάλυψαν την παραγωγή σήματος GFP και στο βιολογικό αρνητικό κοντρόλ, δηλαδή στην αντίδραση με το ειδικό για τον ιό Zika Toehold RNA, παρουσία WNV RNA, ίσο με 0,475 RFU. Παρ' όλα αυτά, το παραγόμενο σήμα GFP δεν άγγιξε την ένταση που παρατηρήθηκε στην αντίδραση του WNV Toehold Switch RNA, παρουσία του ιικού RNA.

Take home message:

Κατέστη δυνατή η ανίχνευση του ιού με το Toehold Switch GFP RNA βιοαισθητήρα που εξετάσθηκε στην παρούσα μελέτη.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

5.1.2 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΜΕ ΤΟ WNV TOEHOLD SWITCH RNA ΠΟΥ ΦΕΡΕΙ ΓΟΝΙΔΙΟ ΛΟΥΣΙΦΕΡΑΣΗΣ

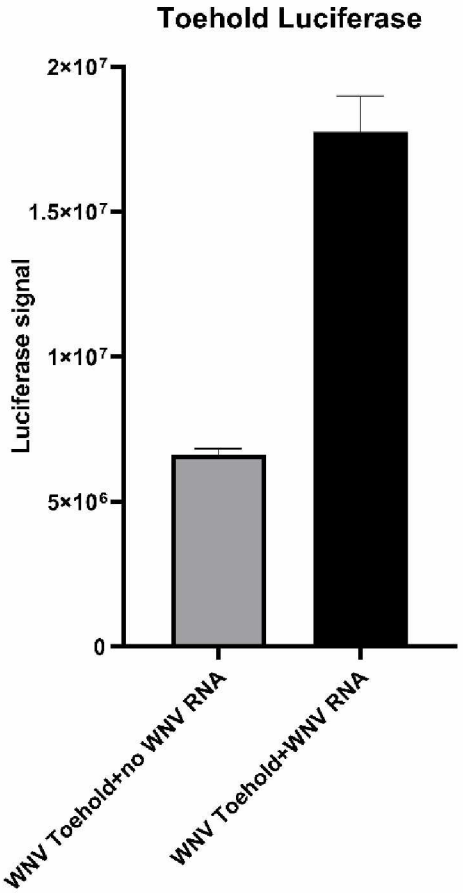
Μετά την αντίδραση *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης του φορέα που περιείχε ως γονίδιο αναφοράς τη λουσιφεράση, η οποία πραγματοποιήθηκε:

- σε 500ng φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση, παρουσία ιικού WNV RNA
- σε 500ng φορέα pGEM-3zf(+) με το WNV Toehold-Switch RNA και το γονίδιο αναφοράς λουσιφεράση, απουσία ιικού WNV RNA (τεχνικό αρνητικό κοντρόλ) ,

προστέθηκε το υπόστρωμα της λουσιφεράσης (λουσιφερίνη) και το σήμα μετρήθηκε σε φωταυγειόμετρο.

Στις μετρήσεις συμπεριλήφθηκε μέτρηση τυφλού δείγματος (blank) για τον υπολογισμό του μη ειδικού θορύβου, ο οποίος και τελικώς αφαιρέθηκε από τις τιμές που παρατηρήθηκαν.

Από τον μέσο όρο των πολλαπλών μετρήσεων προέκυψε ότι και στην περίπτωση της λουσιφεράσης, το Toehold Switch RNA που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν την μελέτη ήταν ικανό να ανιχνεύσει τον ιό (Εικόνα 19).



Εικόνα 19. Ανίχνευση του ιικού WNV RNA από τον Toehold Switch RNA βιοαισθητήρα, με γονίδιο αναφοράς LUC. Ο Toehold Switch LUC RNA βιοαισθητήρας ανίχνευσε επιτυχώς το ιικό RNA. Παρουσία του ιικού RNA παρήχθη υψηλότερο κατά 2,6 φορές σήμα σε σύγκριση με το τεχνικό αρνητικό κοντόλ (Toehold Switch RNA απουσία ιικού RNA).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Παρουσία του ιικού RNA, το σήμα που μετρήθηκε ήταν κατά 2.6 φορές μεγαλύτερο σε σύγκριση με το τεχνικό αρνητικό κοντρόλ (WNV Toehold Switch RNA απουσία ιικού RNA), αφού παρουσία του ιού σημειώθηκαν κατά μέσο όρο σχεδόν $18x10^6$ RLUs, ενώ απουσία του σχεδόν $6,5x10^6$ RLUs.

Take home message:

Κατέστη δυνατή η ανίχνευση του ιού με το Toehold-Switch LUC RNA βιοαισθητήρα που εξετάσθηκε στην παρούσα μελέτη. Σημειώθηκε αισθητά υψηλότερη ένταση σήματος παρουσία του ιού, σε σύγκριση με το αρνητικό κοντρόλ.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^{Ο}

6.1 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην ερώτηση «Ποιο είναι το πιο επικίνδυνο ζώο στο πλανήτη;» πολλοί θα βάλουν πρώτα στην λίστα τους τα φίδια, τους καρχαρίες, ίσως και κάποια δηλητηριώδη ζώα. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότεροι θάνατοι από ζώο ετησίως προκαλούνται από τα κουνούπια (Vector-borne disease, cities, and climate change). Τα κουνούπια ευθύνονται για την μετάδοση παρασίτων όπως το πλασμώδιο, που προκαλεί ελονοσία, αλλά και επικίνδυνων παθογόνων αρμποϊών (**ar**thropod-**bo**rne viruses ή **arbo**viruses) όπως ο Zika, ο Dengue και ο ιός του Δυτικού Νείλου. Κατά μέσο όρο, περίπου 700,000,000 άνθρωποι προσβάλλονται από μολυσματικούς παράγοντες μεταδιδόμενους από κουνούπια, ενώ οι θάνατοι ανέρχονται σε περισσότερους από 1,000,000 ετησίως (61).

Ο αναδυόμενος νευροτρόπος ιός του Δυτικού Νείλου, μέλος της οικογένειας των Flaviviridae, διατηρείται στην φύση σε έναν ενζωοτικό κύκλο μεταξύ πτηνών και ορνιθοφιλικών κουνουπιών, κυρίως του γένους *Culex,* ή αλλιώς τα «κοινά» κουνούπια της πόλης. Ο ιός, με το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, δύναται να μεταδοθεί σε ορισμένα θηλαστικά όπως ο άνθρωπος και τα ιπποειδή. Παρ' όλο που απομονώθηκε για πρώτη φορά ήδη από το 1937, η ανησυχία για την παρουσία του άρχισε να παίρνει μεγάλες διαστάσεις από το 1999 κι έπειτα, όπου ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά στη Νέα Υόρκη, ενώ στα επόμενα έτη εξαπλώθηκε σε όλες τις πολιτείες των ΗΠΑ. Στην Ευρώπη, μέχρι και το 2010, τα περιστατικά μόλυνσης με τον ιό σε ανθρώπους και ζώα ήταν σποραδικά και επικεντρώνονταν κυρίως στο νότιο κομμάτι της ηπείρου και στην Ρωσία. Πλέον, ο ιός θεωρείται ενδημικός σε αρκετές περιοχές της Νότιας Ευρώπης, Αφρικής, Αυστραλίας και Αμερικής. Το 2010 σημειώθηκε η πρώτη σημαντική επιδημία του ιού στην Ελλάδα. Έκτοτε, καταγράφονται σχεδόν ετησίως κρούσματα του ιού στην χώρα μας, τόσο σε ανθρώπους όσο και σε ζώα, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει εγκατασταθεί και στον ελλαδικό χώρο. Ειδικότερα, κατά τις περιόδους μετάδοσης 2018 και 2019, η χώρα μας γνώρισε έναν άνευ προηγουμένου αριθμό περιστατικών.

Όπως κάθε νόσος που μεταδίδεται από φορείς μετάδοσης (π.χ. κουνούπια), η νόσος από τον ιό του Δυτικού Νείλου διαθέτει περίπλοκη επιδημιολογία, η οποία χαρακτηρίζεται από εποχικότητα ενώ εξαρτάται από σύνθετους συντελεστές που αφορούν την παραμονή του ιού στους φυσικούς ξενιστές (πτηνά) και στους φορείς (κουνούπια), τις μεταναστεύσεις πουλιών και κουνουπιών από μέρος σε μέρος, από την εποχή του χρόνου μέχρι και τους κλιματικούς παράγοντες. Τα τελευταία χρόνια, οι κλιματικές συνθήκες στην Ελλάδα ευνοούν την ύπαρξη του ιού. Για την ακρίβεια ευνοούν την ύπαρξη των φορέων του, των κουνουπιών *Culex*, ενθαρρύνοντας την αναπαραγωγή τους, αυξάνοντας τον πληθυσμό τους και κατ' επέκταση την διατήρηση και μετάδοση των παθογόνων που φέρουν (συμπεριλαμβανομένου και του ιού του Δυτικού Νείλου). Η υψηλή υγρασία, οι αυξημένες θερμοκρασίες από νωρίς την άνοιξη, οι έντονοι και εντεταμένοι καύσωνες ενισχύουν την κυκλοφορία των κουνουπιών για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια του χρόνου, επεκτείνοντας αναλόγως την περίοδο μετάδοσης του ιού (62). Αυτό περιπλέκει ακόμα περισσότερο την ήδη σύνθετη και λαβυρινθώδη επιδημιολογία του ιού, καθιστώντας αναγκαία όσο ποτέ την ολοκληρωμένη και αποτελεσματική επιδημιολογική επιτήρηση του ιού στους ανθρώπους, στην ορνιθολογική δεξαμενή, στα κουνούπια και στα υπόλοιπα θηλαστικά και ζώα. Η παρακολούθηση, η

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

αναγνώριση και η πρόβλεψη των περιοχών και της εποχής κυκλοφορίας του ιού ούτως ώστε να εφαρμοστούν εγκαίρως τα κατάλληλα μέτρα προστασίας και απαλλαγής από τα κουνούπια είναι κρίσιμη, ειδικά από την στιγμή που δεν υπάρχει διαθέσιμο προφυλακτικό εμβόλιο ή θεραπεία για τον άνθρωπο.

Πέραν της πολυδιάστατης επιδημιολογίας, οι προσπάθειες για τον έλεγχο και την παρακολούθηση του ιού πλήττονται περεταίρω από την υποδιάγνωση των ορολογικών και το αυξημένο κόστος των μοριακών μεθόδων. Η αυξημένη πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης με αντισώματα για συγγενικούς ιούς του ιού του Δυτικού Νείλου εγκυμονεί την ανάπτυξη ψευδώς θετικού αποτελέσματος, εμποδίζοντας την ορθή μελέτη της κυκλοφορίας του ιού. Από την άλλη, το υψηλό κόστος των τεχνικών ανίχνευσης του RNA του ιού είναι απαγορευτικό σε τόσο μεγάλη κλίμακα, ενώ παράλληλα απαιτεί εργαστηριακό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Λογική απόρροια των παραπάνω είναι ότι υπάρχει άμεση ανάγκη βελτίωσης των διαγνωστικών εργαλείων για τον ιό του Δυτικού Νείλου.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποτελεί την πρώτη πιλοτική δοκιμή μιας νέας και καινοτόμου μεθοδολογίας που πρόσφατα δημοσιεύθηκε για τον ιό Zika, συγγενικό του ιού του Δυτικού Νείλου, από τον Pardee και τους συνεργάτες του, το 2016 (60). Αξιοποιώντας την τεχνολογία των Toehold Switch RNAs που δημοσιεύθηκε από τους Green *et al.* το 2014, δημιούργησαν βιοαισθητήρες-ριβοδιακόπτες που ρυθμίζουν την μετάφραση του ενζύμου LacZ Η έκφραση του ενζύμου επάγεται παρουσία του ιικού ZIKV RNA και με την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος (chlorophenol red-b-D-galactopyranoside), το LacZ καταλύει την μετατροπή του από κίτρινο σε μωβ χρώμα (chlorophenol red), επιτρέποντας έτσι την οπτικοποίηση του θετικού αποτελέσματος με γυμνό μάτι (60).

Η ιδέα των ριβοδιακοπτών αποτελεί εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για πολλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς, από την διάγνωση έως και την έρευνα. Όμως, οι εφαρμογές των συμβατικών φυσικών ριβοδιακοπτών έχουν αρκετούς περιορισμούς. Ο κυριότερος απαντάται στο στενό εύρος δυναμικού, δηλαδή στην χαμηλή αναλογία των επιπέδων των παραγόμενων πρωτεϊνών μεταξύ ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης του ριβοδιακόπτη. Οι τυπικοί ριβοδιακόπτες με επαγωγική επίδραση ενισχύουν την πρωτεϊνοσύνθεση κατά 55 φορές περίπου, ενώ εκείνοι με το ανασταλτικό δυναμικό, μειώνουν τους ρυθμούς της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά 10 φορές, κατά μέσο όρο (57). Επιπλέον, οι τυπικοί ριβοδιακόπτες συχνά χαρακτηρίζονται και από μειωμένη εξειδίκευση, καθώς έχουν σημαντική τάση προς αλληλεπίδραση με περισσότερα από ένα μη ειδικά εναρκτήρια σήματα (inputs). Παράλληλα, η δομή των συμβατικών φυσικών ριβοδιακοπτών υστερεί σε πλαστικότητα στις περισσότερες περιπτώσεις, συνεπώς αυτό είναι περιοριστικό για την ευελιξία που απαιτείται στην χρήση τους για τις διάφορες εφαρμογές της Συνθετικής Βιολογίας (57).

Όλοι οι προηγούμενοι περιορισμοί καταρρίπτονται με την κατασκευή των Toehold Switch RNAs ριβοδιακοπτών, που προτάθηκαν από τους Green *et al.* το 2014 (57). Τα Toehold Switch RNAs δρουν μετα-μεταγραφικά, στο επίπεδο της μετάφρασης και είναι ικανά να προσφέρουν στην ενεργή τους μορφή ενίσχυση της πρωτεϊνοσύνθεσης έως και 400 φορές σε σχέση με την ανενεργή τους, σε αντίθεση με τους συμβατικούς ριβοδιακόπτες που δεν ξεπερνούν τις 60. Ακόμη, τα Toehold Switch RNAs επιτρέπουν την στόχευση μεγαλύτερης ποικιλίας στόχων. Στους συμβατικούς ριβοδιακόπτες, φυσικούς και συνθετικούς, η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος (RBS) εντοπίζεται στην περιοχή ζεύξης λόγω συμπληρωματικότητας μεταξύ ριβοδιακόπτη και trigger RNA, γεγονός που

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

αυτομάτως καταρρίπτει την ευελιξία στόχου. Επιπλέον, στην περίπτωση των Toehold Switch RNAs, η αρχική αποελίκωση και κατ' επέκταση η ενεργοποίηση του ριβοδιακόπτη έγκειται στην γραμμική αλληλεπίδραση και την διαδοχική ολίσθηση λόγω συμπληρωματικότητας μεταξύ των αλληλεπιδρόντων μορίων (trigger RNA + Toehold Switch RNA), ιδιότητα που ελαττώνει την μη ειδικότητα στόχου που παρατηρείται στην περίπτωση των συμβατικών ριβοδιακοπτών. Μεταξύ άλλων, οι παραπάνω ιδιότητες των Toehold Switch RNAs τα καθιστούν ιδανικά για χρήση στις εφαρμογές της Συνθετικής Βιολογίας (94).

Η απόδειξη της εφικτότητας της χρήσης των Toehold Switch RNAs για την ανίχνευση παθογόνων επιβεβαιώθηκε, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, για την ανίχνευση του ιού Zika. Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, πραγματοποιήθηκε η πρώτη πιλοτική δοκιμή για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου με την χρήση των Toehold Switch RNAs. Η μεθοδολογία των Pardee *et al.* προσαρμόστηκε για τον ιό του Δυτικού Νείλου, ενώ τροποποιήθηκε όσον αφορά την επιλογή των γονιδίων αναφοράς αλλά και της αλληλουχίας του ριβοδιακόπτη. Παράλληλα δημιουργήθε έκ του μηδενός ένα μοριακό εργαλείο το οποίο στηρίχθηκε σε έναν εμπορικό πλασμιδιακό φορά, ο οποίος υπέστη κατάλληλες τροποποιήσεις ώστε να δημιουργηθεί μια πλατφόρμα κλωνοποίησης ριβοδιακοπτών έναντι του ιού με δύο διαφορετικά γονίδια αναφοράς. Για την ένδειξη του θετικού αποτελέσματος αξιοποιήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: το γονίδιο της Πράσινης Φθορίζουσας Πρωτεΐνης (GFP) και το γονίδιο της Λουσιφεράσης (LUC). Και οι δύο προσεγγίσεις κατάφεραν στην πιλοτική τους δοκιμή να ανιχνεύσουν το ιικό RNA με εξαιρετική ευαισθησία και ικανοποιητικό δυναμικό εύρος, αποδεικνύοντας την δυνατότητα της εφαρμογής της μεθόδου στην περίπτωση του ιού του Δυτικού Νείλου.

Συγκεκριμένα, η χρήση του Toehold Switch RNA με γονίδιο αναφοράς GFP κατάφερε εμφανώς να ανιχνεύσει το ιικό RNA, ενώ συγκριτικά με το αρνητικό κοντρόλ στο οποίο απουσίαζε το ιικό RNA (συνθήκη η οποία αντιστοιχεί στην ανενεργή κατάσταση του ριβοδιακόπτη), σημειώθηκε υποτριπλάσια παραγωγή σήματος GFP από ένα μόνο ριβοδιακόπτη. Το δυναμικό εύρος αυτής της πρώτης προσπάθειας προσέγγισε τα μέσα επίπεδα που παρατηρήθηκαν στην μελέτη του Pardee, χωρίς την αρχική προενίσχυση του ZIKV RNA. Συγκεκριμένα, στην δημοσίευσή τους για την ανίχνευση του ZIKV αναφέρουν ότι τα μέσα επίπεδα δυναμικού εύρους κυμαίνονται περίπου σε πενταπλάσια και πάνω αλλαγή στην έκφραση, μεταξύ ON/OFF κατάστασης, δηλαδή μεταξύ παρουσίας/απουσίας του ZIKV Trigger RNA. Αυτή η προσπάθεια αποτελεί την πιλοτική δοκιμή της μεθόδου και μένει να ελεγχθούν περεταίρω Toehold Switch RNAs από το τελικό pool των δεκάδων υποψήφιων βιοαισθητήρων που εμφάνισαν τις επιθυμητές θερμοδυναμικές ιδιότητες σε συνδυασμό με την ζητούμενη ειδικότητα και μοναδικότητα στόχου. Επιπρόσθετα, στην δοκιμή του GFP-Toehold Switch RNA χρησιμοποιήθηκε και ως αρνητικό κοντρόλ το ZIKV-ειδικό Toehold Switch RNA, παρουσία WNV RNA. Οι μετρήσεις του παραγόμενου σήματος στην προκειμένη περίπτωση προσέγγισαν την ένταση που παρατηρήθηκε και στην αντίδραση του WNV Toehold-Switch RNA. Αυτό υποδεικνύει μεν την πιθανώς μειωμένη ειδικότητα στόχου του Switch RNA που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία αλλά δεν καταρρίπτει τη δυναμική αυτής της στρατηγικής. Για την ακρίβεια, η ολοκληρωμένη και πιο αξιόπιστη μελέτη της ειδικότητας ίσως θα ήταν καλύτερο και σοφότερο να διερευνηθεί με χρήση RNA συγγενικών ιών του ιού του Δυτικού Νείλου, όπως RNA του Zika και του Dengue, παρουσία του WNV Toehold Switch και όχι το αντίστροφο. Συνεπώς, αναμένεται μελλοντικά η δοκιμή των WNV-ειδικών Toehold RNAs παρουσία RNA συγγενικών ιών του ιού του Δυτικού Νείλου.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Το Toehold Switch RNA με γονίδιο αναφοράς Λουσιφεράση, κατάφερε εξίσου να ανιχνεύσει το RNA του ιού του Δυτικού Νείλου, με δυναμικό εύρος σχεδόν αντίστοιχο αυτού που σημειώθηκε στην περίπτωση του GFP. Για την ακρίβεια, παρουσία του ιικού RNA, σημειώθηκε κατά 2.6 φορές υψηλότερο σήμα σε σύγκριση με το αρνητικό κοντρόλ. Το γεγονός ότι τα δεδομένα των μετρήσεων από τα δύο γονίδια αναφοράς προσεγγίζουν το ένα το άλλο υποδεικνύει ότι γι' αυτό οφείλεται το συγκεκριμένο Toehold Switch RNA που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία. Με άλλα λόγια, ο βαθμός ευαισθησίας του συγκεκριμένου Toehold Switch RNA 41 επιβεβαιώθηκε και στα δύο συστήματα αναφοράς που αξιοποιήθηκαν. Όπως όμως αναφέρθηκε και πριν, εμμένει η δοκιμή νέων βιοαισθητήρων μέχρι να βρεθούν αυτοί οι οποίοι επιδεικνύουν καλύτερες επιδόσεις σήματος Λουσιφεράσης (ή αντιστοίχως GFP) μεταξύ ενεργούς και ανενεργούς κατάστασης.

Μιλώντας για γονίδια αναφοράς, μιας και αυτή η προσπάθεια έχει ως στόχο την δημιουργία ενός φθηνού διαγνωστικού εργαλείου, η τιμή του μπορεί να μειωθεί περεταίρω με την χρήση διαφορετικών γονιδίων αναφοράς που παράγουν αποτέλεσμα το οποίο είναι ορατό με το γυμνό μάτι, όπως το γονίδιο της LacZ που αξιοποιήθηκε από τους Pardee *et al*. που περιεγράφηκε προηγουμένως. Όμως το μέγεθος του γονιδίου της LacZ το οποίο προσεγγίζει τα 3000 νουκλεοτίδια ανεβάζει τον χρόνο της *in vitro* μετάφρασης. Η οπτικοποίηση του GFP και της αντίδρασης Λουσιφεράσης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία χρειάστηκαν την μεσολάβηση φωτομέτρου, γεγονός που σίγουρα ανεβάζει το κόστος συγκριτικά με την δυνατότητα οπτικοποίησης χωρίς μεσολάβηση ειδικού εξοπλισμού. Η τροποποίηση και αλλαγή, τόσο της αλληλουχίας του Toehold Switch όσο και του γονιδίου αναφοράς βασίζεται σε απλές, βασικές αρχές της Μοριακής Βιολογίας, γεγονός που αποδεικνύει την ευελιξία και προσαρμοστικότητα των Toehold Switch RNAs.

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε η πρώτη προσπάθεια για την ανίχνευση του ιικού RNA του ιού του Δυτικού Νείλου με χρήση των Toehold Switch RNAs και η εφικτότητα της ιδέας αποδείχθηκε επιτυχώς. Η μεγάλη ευελιξία και ικανότητα προσαρμογής των Toehold Switches θα μας επιτρέψει την σύνθεση και δοκιμή δεκάδων διαφορετικών βιοαισθητήρων ούτως ώστε να βρεθούν εκείνοι που επιδεικνύουν τις επιθυμητές επιδόσεις για την ανίχνευση του ιού. Η τεχνολογία των Toehold Switch RNAs είναι χωρίς αμφιβολία ικανή να αποδώσει ένα διαγνωστικό εργαλείο εξαιρετικά χαμηλού κόστους, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιοχές όπου ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ενδημικός και είναι απαραίτητη η επιτήρηση, στην Ελλάδα και όχι μόνο, ενώ δύναται να αποτελέσει διαγνωστικό μέσο σε περιοχές με περιορισμένους πόρους ή ακόμη και ως εργαλείο στον χώρο της έρευνας.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΜΗ ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ WNV

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS1

Η πρωτεΐνη NS1 είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη γλυκοπρωτεΐνη 150 αμινοξέων, με μέγεθος που κυμαίνεται μεταξύ 46-55 kDa, αναλόγως την έκταση της γλυκοσυλίωσής της. Η NS1 διαθέτει εξέχοντα ρόλο στην εγκαθίδρυση της ιικής μόλυνσης τροποποιώντας πρώτον την ανοσοαπόκκριση του ξενιστή και δεύτερον το κυτταρικό μηχανοστάσιο του ξενιστή προκειμένου ο ιός να ολοκληρώσει επιτυχώς τον κύκλο ζωής του (63). Ο βασικός μηχανισμός που έχει περιγραφεί για την τροποποίηση της ανοσοαπόκκρισης του ξενιστή προτείνει την ενεργοποίηση των Toll-like υποδοχέων (Toll-like Receptors, TLRs) και την αναστολή του συμπληρώματος (64, 65). Από την άλλη, όσον αφορά την εμπλοκή της στον ιικό κύκλο, δεν είναι ακόμη ξεκάθαρος ο ακριβής ρόλος της (63).

Η NS1 δρα ως βασικός συμπαράγοντας κυρίως κατά την πρώιμη φάση της αντιγραφής του ιικού RNA. Ακόμη δεν έχει διαλευκανθεί ο ακριβής μηχανισμός δράσης της, αλλά οι μεταλλάξεις σε αυτήν και ιδίως στις θέσεις N-γλυκοσυλίωσης μειώνουν δραματικά τα επίπεδα της αντιγραφής του ιικού RNA (66). Η NS1 εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στο Ενδοπλασματικό Δίκτυο (ΕΔ), ενώ συνεντοπίζεται και στα ιικά αντιγραφικά σύμπλοκα (Replication Complexes, RCs) (63). Παράλληλα, 16 με 24 ώρες μετά την μόλυνση, υψηλά επίπεδα αυτής εκκρίνονται από τα κύτταρα στην κυκλοφορία του αίματος (μέχρι και 50μg/ml κατά την οξεία φάση της μόλυνσης) τα οποία έχουν ισχυρό ανοσογόνο δυναμικό, ενώ ανιχνεύεται και σε μικρότερα ποσοστά, συνδεδεμένη στις γλυκοζαμινογλυκάνες της κυτταρικής μεμβράνης του μολυσμένου κυττάρου (4,65). Η πρωτεΐνη NS1 υφίσταται είτε ως διαλυτό, υδρόφιλο μονομερές είτε σχηματίζοντας πολυμερή. Για την ακρίβεια, περίπου 30 λεπτά μετά την σύνθεσή της η NS1 σχηματίζει διμερή, αποκτώντας με αυτόν τον τρόπο συγγένεια για τις μεμβράνες του ξενιστή. Από την άλλη, στην εκκρινόμενη μορφή, τρία διμερή της NS1 τείνουν να συνδέονται μεταξύ τους μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, σχηματίζοντας τελικά ένα εξαμερές περίπου 11nm (16). Τόσο η εκκρινόμενη, όσο και η προσδεδεμένη στις κυτταρικές μεμβράνες NS1 έχει επίπτωση στην προστατευτική δράση του συμπληρώματος στον οργανισμό του ξενιστή. Πιο συγκεκριμένα, η NS1 αλληλεπιδρά με τον ρυθμιστικό παράγοντα Η του συμπληρώματος, καταστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του συμπληρώματος και αποτρέποντας την εξουδετέρωση του ιού (66).

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS2A

Η NS2A είναι μία μικρή πρωτεΐνη, μεγέθους ~ 22 kDa, με υδρόφοβη φύση. Ο ρόλος της NS2A, καθώς και των ιικών πρωτεϊνών NS4A και NS4B, δεν έχει αποσαφηνιστεί ακόμη πλήρως. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν την συμμετοχή της πρωτεΐνης στον σχηματισμό των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων (19). Επιπρόσθετα, η NS2A αλληλεπιδρά με τις ιικές πρωτεΐνες NS3 και NS5, καθώς και με την 3'-NCR περιοχή του ιικού RNA, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο την συμμετοχή της και στην διαδικασία της αντιγραφής του ιικού γονιδιώματος (16). Πέρα από τα παραπάνω, έχει βρεθεί ότι η NS2A αναστέλλει την μεταγραφή του γονιδίου των ιντερφερονών άλφα και βήτα (IFN-α/β),

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ακυρώνοντας έτσι μία από τις σημαντικότερες πρώτες άμυνες του ξενιστή και επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την αντιγραφή του ιικού RNA με μεγαλύτερους ρυθμούς (67).

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS2B

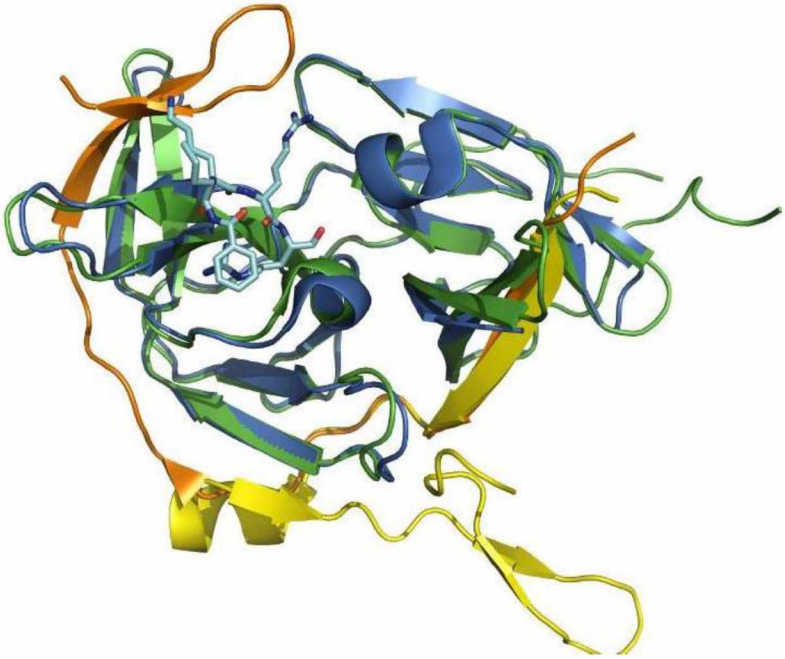
Πρόκειται για μία επίσης μικρή πρωτεΐνη, μεγέθους ~ 14 kDa η οποία βρίσκεται συνδεδεμένη με την μεμβράνη του ξενιστή. Κύριο χαρακτηριστικό της NS2B είναι ότι σχηματίζει ετεροδιμερές με την ιική πρωτεΐνη NS3. Η NS3 είναι μία πρωτεάση σερίνης και ο διμερισμός της με την NS2B είναι καθοριστικός για την αποτελεσματική πρωτεολυτική δράση της. Απόρροια του διμερισμού είναι η αγκυροβόληση του συμπλόκου στις κυτταρικές μεμβράνες. Αναφορικά με την δράση του, το διμερές NS2A-NS3 επιτελεί την πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης προς σχηματισμό των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών του ιού (16). Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποδηλώνουν την αλληλεπίδραση της NS2B με την NS1 που βρίσκεται συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη του ξενιστή και την συμμετοχή τους στην ρύθμιση της αντιγραφής του ιού. Η αλληλεπίδραση αυτών των δύο πρωτεϊνών φαίνεται να ρίχνει φως στο πως τελικά η μεμβρανική NS1 συμβάλλει στην ιική αντιγραφή, δεδομένου ότι δεν εντοπίζεται στα αντιγραφικά σύμπλοκα (68).

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS3

Η ιική πρωτεΐνη NS3 είναι η δεύτερη μεγαλύτερη πρωτεΐνη του ιού μετά την NS5, μεγέθους, ~ 70 kDa. Η NS3 καθώς και η ιική πρωτεΐνη NS5, είναι οι μόνες πρωτεΐνες του ιού που διαθέτουν ενζυματική δράση και η λειτουργία τους είναι η περισσότερο μελετημένη και χαρακτηρισμένη συγκριτικά με τις υπόλοιπες μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Όσον αφορά την NS3, πρόκειται για μία πρωτεΐνη με πολλαπλές ενζυματικές δράσεις που απαιτούνται για την πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης αλλά και για την αντιγραφή του ιικού RNA. Συγκεκριμένα, στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται η επικράτεια πρωτεάσης (protease domain), ενώ στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται μία επικράτεια RNA ελικάσης (RNA helicase domain). Παράλληλα, η NS3 διαθέτει δραστικότητα νουκλεοσιδικής τριφωσφατάσης (NTPase) και RNA 5'- τριφωσφατάσης (RTPase), συμμετέχοντας στην προσθήκη της 5' καλύπτρας στο RNA του ιού (69). Η εύρυθμος και καλά ελεγχόμενος συντονισμός των παραπάνω δραστικοτήτων της πρωτεΐνης είναι καθοριστικός για τον επιτυχή ιικό αντιγραφικό κύκλο και για τον σχηματισμό των ώριμων ιικών πρωτεϊνών.

Η επικράτεια πρωτεάσης προσδίδει στην NS3 δραστικότητα πρωτεάσης σερίνης και δομικά ομοιάζει την πρωτεάση θρυψίνη. Όπως ήδη προαναφέρθηκε, η NS3 σχηματίζει ετεροδιμερές με την ιική πρωτεΐνη NS2A, διμερισμός ο οποίος αρχικά κρίνεται απαραίτητος για την δράση και λειτουργία της πρωτεάσης και δεύτερον σε αυτόν πιθανόν οφείλεται η τοποθέτηση του συμπλόκου στις μεμβράνες του κυττάρου (Εικόνα 20) (16). Αναφορικά με το τελευταίο, έχει βρεθεί ότι τα αμινοξικά κατάλοιπα 31 έως 33 της NS3 μπορούν να αλληλεπιδράσουν με μεμβρανικές δομές, όμως από συμπληρωματικά πειραματικά δεδομένα έχει προκύψει ότι αυτά τα κατάλοιπα δεν είναι επαρκή για την αγκυροβόληση της NS3 στις μεμβράνες και συνεπώς ο διμερισμός της με την NS2B είναι αναγκαίος (70, 71). Επίσης, η NS3 συμμετέχει και στην αναδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης κατά την απελευθέρωση του ώριμου ιικού σωματιδίου, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις που συσχετίζουν την δράση της με την νευροδιεισδυτικότητα των ιών του γένους Flavi (72).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 20: Δομή του ετεροδιμερούς NS2A-NS3 του WNV (73) . Με κίτρινο χρώμα απεικονίζεται ο συμπαράγοντας NS2A, ενώ με πράσινο και μπλε χρώμα απεικονίζεται η NS3. Συγκεκριμένα, με μπλε απεικονίζεται η διαμόρφωση της NS3 παρουσία αναστολέα προσδεδεμένου στο ενεργό κέντρο της πρωτεάσης, ενώ με πράσινο απεικονίζεται η διαμόρφωση της NS3 απουσία του αναστολέα.

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS4A

Η ιική πρωτεΐνη NS4A είναι μία μικρή πρωτεΐνη ~14 kDa, με υδρόφοβο χαρακτήρα. Αποτελεί μία από τις λιγότερο χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες του ιού διότι ο ακριβής της ρόλος δεν έχει ακόμη διαφωτιστεί επαρκώς. Ωστόσο, ο συνεντοπισμός της πρωτεΐνης NS4A με τα αντιγραφικά σύμπλοκα υποδεικνύει την εμπλοκή της πρωτεΐνης στην διαδικασία της ιικής αντιγραφής. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η NS4A αλληλεπιδρά με την ιική πρωτεϊνη NS1, γεγονός που όπως και στην περίπτωση του συμπλόκου NS1-NS2B, στηρίζει ακόμη περισσότερο την συμπλοκή της NS1 στην αντιγραφή του ιού δεδομένου ότι η τελευταία απουσιάζει από τα αντιγραφικά σύμπλοκα (74). Επίσης, η NS4A δρα ως συμπαράγοντας κατά την δράση της NS3 ως ελικάση, βοηθώντας την να διατηρεί σταθερούς τους ρυθμούς αποελίκωσης του ιικού RNA, ακόμη και σε συνθήκες έλλειψης ATP (75). Τέλος, υπάρχουν ενδείξεις ότι η NS4A, μαζί με τις NS2A και NS4B, αναστέλλουν την σηματοδότηση μέσω IFN-α/β (76).

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS4B

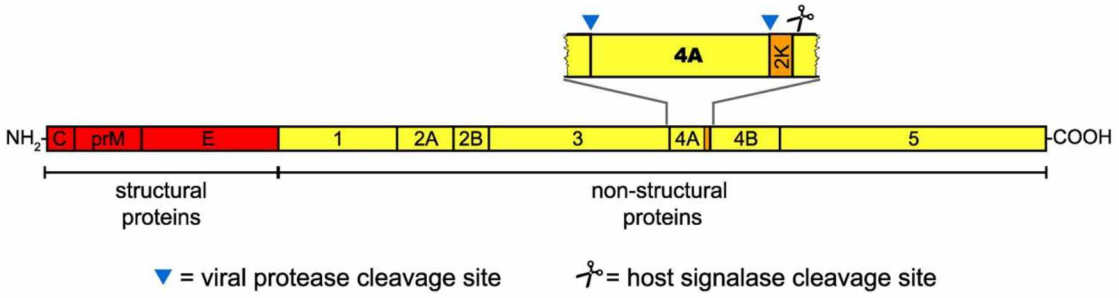
Η ιική πρωτεΐνη NS4B είναι επίσης μία μικρή υδρόφοβη πρωτεΐνη, μεγέθους ~ 27 kDa. Η NS4B συνεντοπίζεται με τα αντιγραφικά σύμπλοκα και έχει αποδειχθεί ότι ενισχύει την δράση ελικάσης της NS3, αποσυνδέοντας την από μονόκλωνα μόρια RNA και επιτρέποντας την με αυτόν τον τρόπο να συνδεθεί σε άλλο μόριο RNA, συμβάλλοντας έτσι στην πρόοδο της ιικής αντιγραφής (16). Επιπρόσθετα, υπάρχουν αναφορές για συσσώρευση της NS4B στην περιπυρηνική περιοχή, ενώ

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

φαίνεται ότι μεταφέρεται και στο εσωτερικό του πυρήνα ξενιστή (76). Όπως συμβαίνει με την NS2A, έτσι και η NS4B έχει δειχθεί ότι αναστέλλει την απόκκριση μέσω ιντερφερονών α και β (IFN-α/β) του ξενιστή, καταστέλλοντας το JAK/STAT σηματοδοτικό μονοπάτι (77, 78).

ΤΟ ΠΕΠΤΙΔΙΟ 2K

Κατά την πρωτεόλυση της ιικής πολυπρωτεΐνης μεταξύ των πρωτεϊνών NS4A και NS4B, προκύπτει ένα επιπλέον μικρό πεπτίδιο, γνωστό ως τμήμα 2K. Ο πλήρης χαρακτηρισμός του ρόλου του και του μοριακού μηχανισμού δράσης του δεν έχουν ακόμη διαλευκανθεί. Παρ' όλα αυτά, τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδεικνύουν πως το πεπτίδιο 2K φαίνεται να έχει σηματοδοτικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού και στην τροποποίηση της ανοσοαπόκκρισης του ξενιστή. Αρχικά, εξυπηρετεί ως σηματοδοτική αλληλουχία για την μετατόπιση της πρωτεΐνης NS4B στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου (86). Για την πλήρη πέψη του τμήματος 2K από το καρβοξυτελικό άκρο της NS4A και το αμινοτελικό άκρο της NS4B, απαιτείται η δράση τόσο της ιικής πρωτεάσης, δηλαδή του συμπλόκου NS2B-NS3, όσο και η δράση μίας κυτταρικής πεπτιδάσης σηματοδοτικών πεπτιδίων (Signal Peptide Peptidase, SPP) (Εικόνα 21). Παράλληλα, υπάρχουν ενδείξεις ότι το πρόδρομο μόριο NS4A-2K πιθανώς είναι ικανό να προκαλέσει αναδιοργάνωση των μεμβρανών, γεγονός που υποστηρίζει και την εμπλοκή του στον σχηματισμό των αντιγραφικών συμπλόκων του ιού αλλά και στην ωρίμανση των ιικών πρωτεϊνών (80).



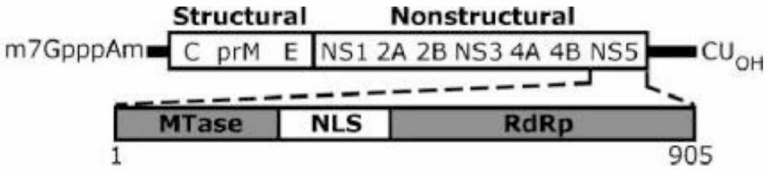
Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση της ιικής πολυπρωτεΐνης στην οποία επισημαίνονται οι θέσεις πρωτεόλυσης της NS4A και του πεπτιδίου 2K. Με κόκκινο χρώμα απεικονίζονται οι δομικές, ενώ με κίτρινο χρώμα οι μη δομικές πρωτεΐνες του ιού. Στην παρούσα αναπαράσταση υποδεικνύονται και οι θέσεις αναγνώρισης από την ιική πρωτεάση (με ▼) και από την κυτταρική πεπτιδάση σηματοδοτικών μορίων (με ✂), από την πέψη των οποίων προκύπτει το μικρό πεπτίδιο 2K.

Η ΙΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ NS5

Η πρωτεΐνη NS5 είναι μία εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ιών Flavi φωσφοπρωτεΐνη ~900 αμινοξέων, μεγέθους ~ 100 kDa, αποτελώντας την μεγαλύτερη πρωτεΐνη του ιού. Οι δράσεις της NS5 είναι πολλαπλές. Διαθέτει 2 βασικές συντηρημένες επικράτειες: στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης εντοπίζεται η επικράτεια 5'-μεθυλοτρανσφεράσης (MTase domain), ενώ στο καρβοξυτελικό της άκρο εντοπίζεται η επικράτεια RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RNA-dependent RNA Polymerase, RdRp) (Εικόνα 22) (81). Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία που υποστηρίζουν την μεταφορά του ιού στο εσωτερικό του πυρήνα, πράγμα που είναι σύμφωνο και με

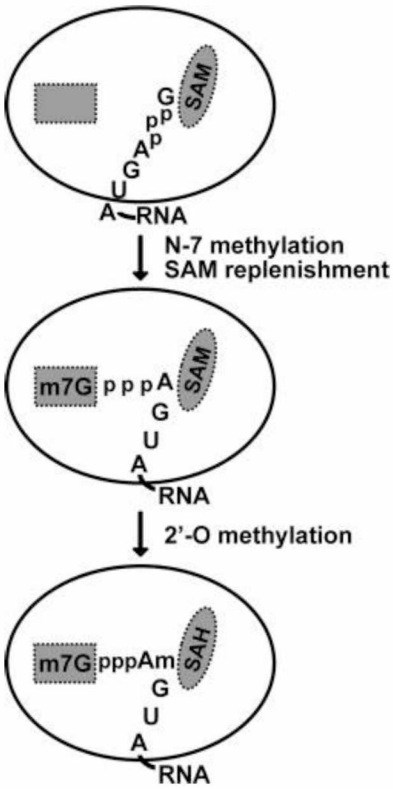
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

το γεγονός ότι στην αλληλουχία της πρωτεΐνης υπάρχει και σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Site, NLS) (81).



Εικόνα 22. Επισήμανση των επικρατειών της ιικής πρωτεΐνης NS5 (81). Στην παρούσα αναπαράσταση του ιικού γονιδιώματος επισημαίνονται οι περιοχές που κωδικοποιούν για τις δύο βασικές επικράτειες της πρωτεΐνης NS5: η επικράτεια 5'-μεθυλοτρανσφεράσης (MTase) και η επικράτεια RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp). Επιπλέον, υποδεικνύεται και η θέση του σήματος πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear Localization Site, NLS).

Όπως ήδη προαναφέρθηκε, το RNA του WNV διαθέτει 5' τύπου I καλύπτρα m-7GpppAm. Οι περισσότεροι ιοί των ζώων που αντιγράφονται στο κυτταρόπλασμα κωδικοποιούν οι ίδιοι το απαραίτητο πρωτεϊνικό μηχανοστάσιο που απαιτείται για την παραγωγή μορίων RNAs με 5' καλύπτρα. Όμως είναι πιθανό ότι οι ιοί εκμεταλλεύονται και ορισμένα κυτταρικά στοιχεία για τον σχηματισμό της 5' καλύπτρας τους. Έτσι, και ο ιός του Δυτικού Νείλου, όπως και οι υπόλοιποι ιοί της οικογένειας Flavi, συνθέτει την 5' καλύπτρα του μέσω της δραστικότητας RNA 5'-τριφωσφατάσης (RTPase) της πρωτεΐνης NS3 και της δραστικότητα 5'-μεθυλοτρανσφεράσης (MTase) της πρωτεΐνης NS5 (82). Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι η 5'-μεθυλοτρανσφεράση του ιού ανήκει στην οικογένεια των S-adenosyl-L-methionine- εξαρτώμενων μεθυλοτρανσφερασών (SAM-dependent MTases) και έχει ταυτοχρόνως δράση N-7 γουανινο- και ριβοζη-2'OH μεθυλοτρανσφεράσης. Με αυτόν τον τρόπο, η μεθυλίωση της ιικής 5΄ καλύπτρας γίνεται σε 2 διαδοχικά βήματα, με την μεθυλίωση της N-7 της γουανίνης να λαμβάνει χώρα πρώτη και αυτή του 2'-OH της ριβόζης να συμβαίνει αμέσως μετά (Εικόνα 23) (82)



Εικόνα 23. Αναπαράσταση της διαδοχικής μεθυλίωσης κατά τον σχηματισμό της 5' καλύπτρας του ιικού RNA (82). Πρώτα, συμβαίνει η μεθυλίωση του N-7 της γουανίνης και έπειτα του 2'-OH της ριβόζης. Η NS5 απεικονίζεται ως SAM, που υποδηλώνει την επικράτειά της με δραστικότητα S-adenosyl-L-methionine- εξαρτώμενων μεθυλοτρανσφερασών (SAM-dependent MTase).

Η αντιγραφή του WNV από την επικράτεια RdRp της NS5 και τα αντιγραφικά σύμπλοκα, πραγματοποιείται σε κυτταροπλασματικές μεμβρανικές δομές, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την απόδοση της ιικής αντιγραφής και προστατεύοντας τον ιό από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή (83). Ωστόσο, πρόσφατα σημειώθηκε ότι ένα ποσοστό της πρωτεΐνης NS5 εντοπίζεται και στον πυρήνα. Έχει αποδειχθεί ότι με χρήση αναστολέων που καταργούν την πυρηνική μετατόπιση της NS5 στον πυρήνα, η αντιγραφή του WNV επηρεάστηκε αρνητικά και σε μεγάλο βαθμό. Έτσι,

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

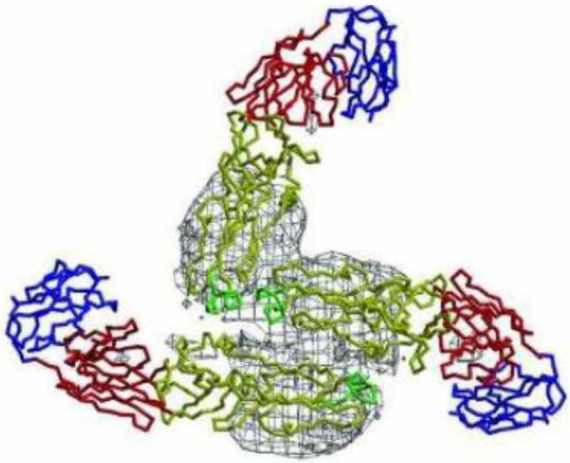
παρ’ όλο που ο ρόλος της NS5 στον πυρήνα είναι ακόμη άγνωστος, είναι ξεκάθαρο ότι η μετατόπισή της σε αυτό το υποκυτταρικό οργανίδιο είναι απαραίτητη για την επιβίωση του ιού (84).

ΔΟΜΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ WNV

ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ένας μικρός σφαιρικός ιός. Διαθέτει καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, με νουκλεοκαψίδιο μεγέθους περίπου 30 nm, το οποίο περιβάλλεται από ένα εξωτερικό περίβλημα λιποπρωτεϊνικής φύσεως, φτάνοντας τελικά σε διάμετρο περίπου τα 50nm (4).

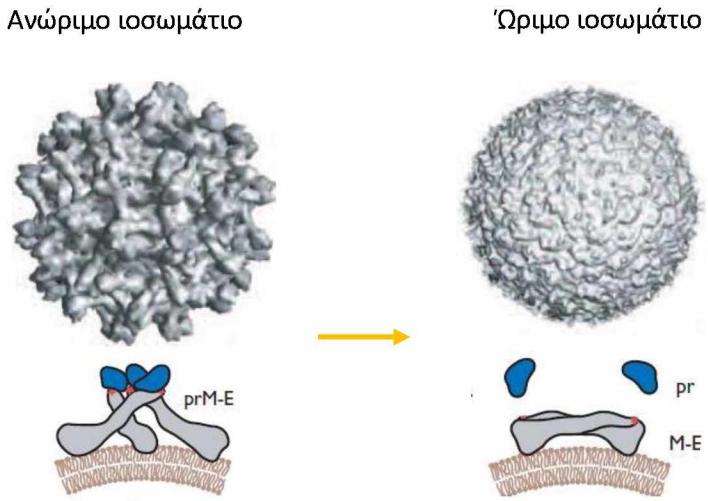
Ο λιποπρωτεϊνικός φάκελος που περιβάλλει το νουκλεοκαψίδιο του ανώριμου ιοσωματίου αποτελείται από 180 μόρια της κάθε πρωτεΐνης E και prM, τα οποία οργανώνονται σε 60 ασύμμετρα «ακανθώδη» τριμερή, που αποτελούνται από ετεροδιμερή prM-E (Εικόνα 24). Στο ώριμο ιοσωμάτιο, η δομή του φακέλου αλλάζει. Κατά την ωρίμανση του ιού, το αμινοτελικό άκρο του προπεπτιδίου prM πρωτεολύεται από furin-like πρωτεάσες, στο δίκτυο trans-Golgi του μολυσμένου κυττάρου. Μετά την ωρίμανση, τα 60 τριμερή M-E του ανώριμου ιοσωματίου σχηματίζουν πλέον 90 αντιπαράλληλα ομοδιμερή, με «ψευδο»-εικοσαεδρική συμμετρία (4).



Εικόνα 24: Απεικόνιση ενός ασύμμετρου ετεροδιμερούς του ανώριμου ιοσωματίου. Στο κέντρο, με χρώμα γκρι, απεικονίζεται το ομοτριμερές της πρωτεΐνης prM. Με κόκκινο, μπλε και πράσινο απεικονίζονται αντίστοιχα οι επικράτειες I, II, III των εκάστοτε E μονομερών του ομοτριμερούς. Μαζί, τα δυό ομοτριμερή των prM και E σχηματίζουν ετεροδιμερές (16).

Εσωτερικά του λιποπρωτεϊνικού φακέλου εντοπίζεται το νουκλεοκαψίδιο του ιού. Αυτό αποτελείται από διμερή της πρωτεΐνης C, στης οποίας τα αμινοτελικά και καρβοξυτελικά άκρα προσδένεται το ιικό RNA. Το ενδιάμεσο τμήμα της C πρωτεΐνης είναι υδρόφοβης φύσεως και συνδέεται με την εσωτερική πλευρά του λιποπρωτεϊνικού φακέλου (16).

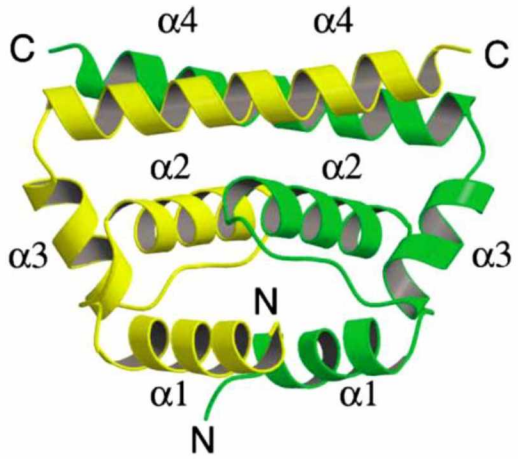
Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53



Εικόνα 25: Ωρίμανση του ιοσωματίου. Αριστερά, φαίνεται το ανώριμο ιοσωμάτιο, στο οποίο είναι εμφανείς οι ακανθώδεις δομές των ετεροδιμερών prM-E. Δεξιά, στο ώριμο ιοσωμάτιο, το αμινοτελικό άκρο των prM πρωτεολύεται από furin-like πρωτεάσες στο δίκτυο trans-Golgi του μολυσμένου κυττάρου, με αποτέλεσμα τις δομικές αλλαγές του ιοσωματίου. Τροποποιήθηκε από: (85).

Η ΔΟΜΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ C

Η δομική πρωτεΐνη C του ιού είναι μία μικρή πρωτεΐνη, μεγέθους ~11 kDa και δομεί το νουκλεοκαψίδιο του ιού. Η ώριμη C πρωτεΐνη σχηματίζει συμπαγή ομοδιμερή που καθένα από αυτά αποτελείται από 4 α-έλικες (Εικόνα 26). Τα ομοδιμερή τελικώς οργανώνονται σε ομοτετραμερή. Τα διμερή της C, διαθέτουν μία υψηλά διατηρημένη υδρόφοβη περιοχή μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με την εσωτερική πλευρά του λιποπρωτεϊνικού φακέλου (16). Από την άλλη, το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης συνίσταται από φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα, μέσω των οποίων πιστεύεται ότι συνδέεται με το ιικό RNA. Από πειράματα που έχουν γίνει, παρατηρήθηκε ότι πρόκειται για μία πρωτεΐνη με υψηλή ανεκτικότητα σε μεταλλάξεις, μέχρι και απαλοιφές ολόκληρων τμημάτων της, χωρίς να επηρεάζεται η λειτουργικότητά της, όπως για παράδειγμα η ικανότητα σύνδεσής της με το ιικό RNA. Ακόμη δεν είναι γνωστό με ποιον τρόπο η πρωτεΐνη σχηματίζει ομοδιμερή, αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι η κινητήριος δύναμη σε αυτό είναι η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το RNA (16).



Εικόνα 26: Απεικόνιση του ομοδιμερούς που σχηματίζει η καψιδιακή πρωτεΐνη C του ιού. Με κίτρινο και πράσινο απεικονίζονται τα εκάστοτε μονομερή της πρωτεΐνης. Η κάθε α-έλικα υποδηλώνεται ως αX, ενώ ως C και N υποδεικνύονται τα καρβοξυτελικά και αμινοτελικά άκρα, αντίστοιχα, των μονομερών (86).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Η Ε ΓΛΥΚΟΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΑΚΕΛΟΥ

Η Ε πρωτεΐνη αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του ιικού λιποπρωτεϊνικού φακέλου, με το υψηλότερο ανοσογόνο δυναμικό και είναι ο στόχος των περισσότερων αντισωμάτων εξουδετέρωσης (87). Δομικά, η Ε γλυκοπρωτεΐνη οργανώνεται σε 3 επικράτειες: τις DI, DII και DIII. Στην επικράτεια D1 εντοπίζεται η θέση γλυκοσυλίωσης: το αμινοξικό κατάλοιπο Asn154. Η συγκεκριμένη θέση γλυκοσυλίωσης είναι παρούσα σχεδόν σε όλους τους ιούς Flavi, όμως ειδικά για τον WNV είναι κρίσιμη για την νευροδιεισδυτικότητά του(88). Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι η γλυκοσυλίωση είναι απαραίτητη για την επαρκή μετάδοση του ιού στα κουνούπια και στα πουλιά, ενώ κατέχει εξέχοντα ρόλο στον ιικό τροπισμό (43). Η DII επικράτεια είναι υπεύθυνη για τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης καθώς και για την pH- εξαρτώμενη σύντηξη του ιοσωματίου με τα ενδοκυτταρικά κυστίδια κατά το ξε-πακετάρισμα του ιού. Τέλος, η DIII εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση του ιού με τον υποδοχέα του, ενώ παράλληλα κατέχει μία πλειάδα αντιγονικών επιτόπων που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα εξουδετέρωσης (42).

Η Μ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΟΥ ΙΙΚΟΥ ΦΑΚΕΛΟΥ

Η πρόδρομη γλυκοπρωτεΐνη της Μ, η prM (~26 kDa), συμβάλλει στην διατήρηση της σωστής αναδίπλωσης της Ε πρωτεΐνης κατά την μετάβαση του ιοσωματίου από το εκκριτικό μονοποτάτι, σχηματίζοντας μαζί της 60 ετεροτριμερείς ακανθώδεις δομές (16). Στα όξινα υποκυτταρικά διαμερίσματα του συστήματος Golgi, η prM παραμένει συνηφασμένη με το ιοσωμάτιο, δημιουργώντας τις εν λόγω ακανθώδεις προεκτάσεις. Λόγω των όξινων συνθηκών και της συγκεκριμένης διαμόρφωσης, η prM προσελκύει furin-like πρωτεάσες σερίνης. Η πρωτεόλυση της prM προς σχηματισμό της Μ κατά το στάδιο της ωρίμανσης, είναι κρίσιμη για την μολυσματικότητα του ιού. Ωστόσο δεν είναι ακόμη γνωστή η έκταση της πρωτεόλυσης που απαιτείται, καθώς πρόσφατα απεδείχθη ότι μερικώς ή και πλήρως ανώριμα ιοσωμάτια που περιέχουν prM ήταν ικανά να προκαλέσουν μόλυνση (89). Μετά την πρωτεόλυση, το πεπτίδιο pr δεν αποσυνδέεται αμέσως από το ιοσωμάτιο. Αντιθέτως, απαιτείται η έκθεση το ιοσωματίου στο ουδέτερο pH του εξωκυττάριου χώρου, όπου εκεί το τελικώς το pr απελευθερώνεται και αποκαλύπτεται το ώριμο πλέον ιοσωμάτιο. Αυτή η καθυστέρηση αποτρέπει την πρώιμη αλληλεπίδραση του ιοσωματίου με τις κυτταρικές μεμβράνες του συστήματος Golgi (16).

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

Σύνοψη των λειτουργιών των πρωτεϊνών του WNV	
NS1	-Συμμετοχή στην ιική αντιγραφή (κυρίως κατά την πρώιμη φάση αντιγραφής), επιστράτευση κυτταρικού μηχανοστάσιου -Τροποποίηση της ενεργοποίησης του συμπληρώματος
NS2A	-Πιθανή εμπλοκή στον σχηματισμό των νέων ιοσωμάτων -Πιθανή εμπλοκή στην ιική αντιγραφή -Αναστολή μεταγραφής IFN-α/β
NS2B	-Συμπαράγοντας για την δραστικότητα πρωτεάσης της NS3 -Πιθανή εμπλοκή στην αντιγραφή του ιού, μέσω αλληλεπίδρασης με την NS1 -Ανταγωνιστής ιντερφερονών
NS3	-Ιική πρωτεάση, τμήση της ιικής πολυπρωτεΐνης -RNA ελικάση -NTPase -RTPase
NS4A	-Πιθανή εμπλοκή στην αντιγραφή - Ενίσχυση της δράσης ελικάσης της NS3 -Αναστολή απόκκρισης IFN-α/β
NS4B	-Πιθανή εμπλοκή στην αντιγραφή -Αναστολή της απόκκρισης IFN-α/β
NS5	-RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση -Μεθυλοτρανσφεράση - συμβολή στον σχηματισμό της 5’ καλύπτρας
C	-Πρωτεϊνη του νουκλεοκαψιδίου -Αλληλεπίδραση με το ιικό RNA και τον λιποπρωτεϊνικό φάκελο
E	-Γλυκοπρωτεΐνη του ιικού λιποπρωτεϊνικού φακέλου
M	-Πρωτεΐνη του ιικού λιποπρωτεϊνικού φακέλου

Πίνακας: Συνοπτική περιγραφή των λειτουργιών των ιικών πρωτεϊνών.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Colpitts TM, Conway MJ, Montgomery RR, Fikrig E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. Clin Microbiol Rev. 2012;25(4):635–648. doi:10.1128/CMR.00045-12
2. Petersen LR, Brault AC, Nasci RS. West Nile virus: review of the literature. JAMA. 2013;310(3):308–315. doi:10.1001/jama.2013.8042
3. https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/
4. Romero-Brey I, Bartenschlager R. Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses. Viruses. 2014;6(7):2826–2857. Published 2014 Jul 22. doi:10.3390/v6072826
5. George Valiakos, Labrini V. Athanasiou, Antonia Touloudi, Vassilis Papatsiros, Vassiliki Spyrou, Liljana Petrovska and Charalambos Billinis. West Nile Virus: Basic Principles, Replication Mechanism, Immune Response and Important Genetic Determinants of Virulence, Viral Replication, IntechOpen, DOI: 10.5772/55198
6. Rizzoli A, Jimenez-Clavero MA, Barzon L, et al. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities. Euro Surveill. 2015;20(20):21135. doi:10.2807/1560-917.es2015.20.20. 21135
7. May FJ, Davis CT, Tesh RB, Barrett AD. Phylogeography of West Nile virus: from the cradle of evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. J Virol. 2011;85(6):2964–2974. doi:10.1128 /JVI.01963-10
8. Erdélyi K, Ursu K, Ferenczi E, et al. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007;7(2):181–188. doi:10.1089/vbz.2006.0586
9. Dimou V, Gerou S, Papa A. The epidemic West Nile virus strain in Greece was a recent introduction. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013;13(10):719–722. doi:10.1089/vbz.2013.1318
10. McMullen AR, Albayrak H, May FJ, Davis CT, Beasley DW, Barrett AD. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. J Gen Virol. 2013;94(Pt 2):318–325. doi:10.1099/vir.0.046888-0
11. Sejvar JJ. West nile virus: an historical overview. Ochsner J. 2003;5(3):6–10.
12. Bernkopf H, Levine S, Nerson R. Isolation of West Nile virus in Israel. J Infect Dis. 1953;93(3):207–218. doi:10.1093/infdis/93.3.207
13. Nash D, Mostashari F, Fine A, et al. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. N Engl J Med. 2001;344(24):1807–1814. doi:10.1056/NEJM200106143442401
14. Hayes EB, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. Emerg Infect Dis. 2005;11(8):1167–1173. doi:10.3201/eid1108.050289a
15. https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-virus-infection
16. Papa A, Bakonyi T, Xanthopoulou K, Vázquez A, Tenorio A, Nowotny N. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. Emerg Infect *Dis*. 2011;17(5):920–922. doi:10.3201/ eid1705.101759
17. Sayao AL, Suchowersky O, Al-Khathaami A, et al. Calgary experience with West Nile virus neurological syndrome during the late summer of 2003. Can J Neurol Sci. 2004;31(2):194–203. doi:10.1017/ s031716710005383x
18. Hart J Jr, Tillman G, Kraut MA, et al. West Nile virus neuroinvasive disease: neurological manifestations and prospective longitudinal outcomes. BMC Infect Dis. 2014;14:248. doi:10.1186/1471-2334-14-248
19. Beasley DW. Recent advances in the molecular biology of west nile virus. Curr Mol Med. 2005;5(8):835–850. doi:10.2174/156652405774962272
20. Bowen RA, Nemeth NM. Experimental infections with West Nile virus. Curr Opin Infect Dis. 2007;20(3):293–297. doi:10.1097/QCO.0b013e32816b5cad
21. http://www.westnile.ca.gov
22. Gamino V, Höfle U. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. Vet Res. 2013;44(1):39. Published 2013 Jun 3. doi:10.1186/1297-9716-44-39
23. Blitvich BJ. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. Anim Health Res Rev. 2008;9(1):71–86. doi:10.1017/S1466252307001430
24. Martín-Acebes MA, Saiz JC. West Nile virus: A re-emerging pathogen revisited. World J Virol. 2012;1(2):51–70. doi:10.5501/wjv.v1.i2.51
25. Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. Emerg Infect Dis. 2002;8(4):380–386. doi:10.3201/eid0804.010239

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

26. Weissenböck H, Hubálek Z, Bakonyi T, Nowotny N. Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. Vet Microbiol. 2010;140(3-4):271–280. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.025
27. Engler O, Savini G, Papa A, et al. European surveillance for West Nile virus in mosquito populations. Int J Environ Res Public Health. 2013;10(10):4869–4895. doi:10.3390/ijerph10104869
28. Deichmeister JM, Telang A. Abundance of West Nile virus mosquito vectors in relation to climate and landscape variables. J Vector Ecol. 2011;36(1):75–85. doi:10.1111/j.1948-7134.2011.00143
29. Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. N Engl J Med. 2003;349(13):1236–1245. doi:10.1056/NEJMoa030969
30. Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, et al. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. N Engl J Med. 2003;348(22):2196–2203. doi:10.1056/NEJMoa022987
31. Paisley JE, Hinckley AF, O'Leary DR, et al. West Nile virus infection among pregnant women in a northern Colorado community, 2003 to 2004. Pediatrics. 2006;117(3):814–820. doi:10.1542/peds.2005-1187
32. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Laboratory-acquired West Nile virus infections--United States, 2002. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2002;51(50):1133–1135.
33. Titus RG, Bishop JV, Mejia JS. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. Parasite Immunol. 2006;28(4):131–141. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00807
34. Styer LM, Lim PY, Louie KL, Albright RG, Kramer LD, Bernard KA. Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. J Virol. 2011;85(4):1517–1527. doi:10.1128/JVI.01112-10
35. Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY, Bernard KA. Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. J Virol. 2011;85(10):5197–5201. doi:10.1128/JVI.02692-10
36. Johnston LJ, Halliday GM, King NJ. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. J Invest Dermatol. 2000;114(3):560–568. doi:10.1046/j.1523-1747.2000.00904
37. Samuel MA, Whitby K, Keller BC, et al. PKR and RNase L contribute to protection against lethal West Nile Virus infection by controlling early viral spread in the periphery and replication in neurons. J Virol. 2006;80(14):7009–7019. doi:10.1128/JVI.00489-06
38. Bai F, Kong KF, Dai J, et al. A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. J Infect Dis. 2010;202(12):1804–1812. doi:10.1086/657416
39. Diamond MS, Shrestha B, Mehlhop E, Sitati E, Engle M. Innate and adaptive immune responses determine protection against disseminated infection by West Nile encephalitis virus. Viral Immunol. 2003;16(3):259–278. doi:10.1089/088282403322396082
40. Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. Nat Med. 2004;10(12):1366–1373. doi:10.1038/nm1140
41. Magid R, Murphy TJ, Galis ZS. Expression of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells is differentially regulated by shear stress. Role of c-Myc. J Biol Chem. 2003;278(35):32994–32999. doi:10.1074/jbc.M304799200
42. Macdonald J, Tonry J, Hall RA, et al. NS1 protein secretion during the acute phase of West Nile virus infection. J Virol. 2005;79(22):13924–13933. doi:10.1128/JVI.79.22.13924-13933.2005
43. Guirakhoo F, Heinz FX, Mandl CW, Holzmann H, Kunz C. Fusion activity of flaviviruses: comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions. J Gen Virol. 1991 Jun;72:1323–9.
44. Mukhopadhyay S, Kim B-S, Chipman PR, et al. Structure of West Nile Virus. Science. 2003;302(5643): 248. doi:10.1126/science.1089316
45. Zhang Y, Kaufmann B, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structure of immature West Nile virus. J Virol.2007 Jun;81(11):6141–5
46. Domin G, Findeiß S, Wachsmuth M, Will S, Stadler PF, Mörl M. Applicability of a computational design approach for synthetic riboswitches. Nucleic Acids Res. 2017;45(7):4108–19
47. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, et al. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. Cell Host Microbe. 2008 Dec 11;4(6):579–91.
48. Schuessler A, Funk A, Lazear HM, et al. West Nile virus noncoding subgenomic RNA contributes to viral evasion of the type I interferon-mediated antiviral response. J Virol. 2012 May;86(10):5708–18.
49. Sambri V, Capobianchi MR, Cavrini F, et al. Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. Viruses. 2013;5(10):2329–2348.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

50. https://www.cdc.gov/westnile/healthcareproviders/healthCareProviders-Diagnostic.html
51. Courbet A, Renard E, Molina F. Bringing next-generation diagnostics to the clinic through synthetic biology. EMBO Mol Med. 2016;8(9):987–991. doi:10.15252/emmm.201606541.
52. Rossetti, M., Del Grosso, E., Ranallo, S. et al. Programmable RNA-based systems for sensing and diagnostic applications. Anal Bioanal Chem. 2019. 411, 4293–4302.
53. Garst AD, Edwards AL, Batey RT. Riboswitches: structures and mechanisms. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011;3(6):a003533. Published 2011 Jun 1. doi:10.1101/cshperspect.a003533
54. Findeiß S, Etzel M, Will S, Mörl M, Stadler PF. Design of Artificial Riboswitches as Biosensors. Sensors (Basel). 2017;17(9):1990.
55. Groher F, Suess B. Synthetic riboswitches - A tool comes of age. Biochim Biophys Acta. 2014/05/17. 2014;1839(10):964–73.
56. Domin G, Findeiß S, Wachsmuth M, Will S, Stadler PF, Mörl M. Applicability of a computational design approach for synthetic riboswitches. Nucleic Acids Res. 2017 45(7):4108–19.
57. Green AA, Silver PA, Collins JJ, Yin P. Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. Cell. 2014;159(4):925–39.
58. Liu CC, Qi L, Lucks JB, Segall-Shapiro TH, Wang D, Mutalik VK, et al. An adaptor from translational to transcriptional control enables predictable assembly of complex regulation. Nat Methods. 2012; 9(11):1088–94.
59. Pardee K, Green AA, Ferrante T, Cameron DE, DaleyKeyser A, Yin P, et al. Paper-based synthetic gene networks. Cell. 2014;159(4):940–54.
60. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Connor DHO, Gehrke L, Collins JJ, et al. Rapid , Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components Resource Rapid. Cell. 2016;1–12.
61. https://www.ebmedicine.net/topics/infectious-disease/mosquito-borne
62. Paz S. Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2015;370(1665):20130561. doi:10.1098/rstb.2013.0561
63. Rastogi M, Sharma N, Singh SK. Flavivirus NS1 : a multifaceted enigmatic viral protein. Virol J. 2016;1–10.
64. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1053–1057.
65. Macdonald J, Tonry J, Hall RA, Williams B, Palacios G, Ashok MS, et al. NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. 2005;79(22):13924–33.
66. Muylaert IR, Chambers TJ, Galler R, Rice CM. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence. Virology. 1996;222(1):159–168. doi:10.1006/viro.1996.0406
67. Liu WJ, Wang XJ, Clark DC, Lobigs M, Hall RA, Khromykh AA. A Single Amino Acid Substitution in the West Nile Virus Nonstructural Protein NS2A Disables Its Ability To Inhibit Alpha / Beta Interferon Induction and Attenuates Virus Virulence in Mice. 2006;80(5):2396–404.
68. Youn S, Li T, Mccune BT, Edeling MA, Fremont DH, Cristea IM, et al. Evidence for a Genetic and Physical Interaction between Nonstructural Proteins NS1 and NS4B That Modulates Replication of. 2012;86(13):7360–71.
69. Westaway EG, Mackenzie JM, Kenney MT, Jones MK, Khromykh AA. Ultrastructure of Kunjin Virus-Infected Cells : Colocalization of NS1 and NS3 with Double-Stranded RNA , and of NS2B with NS3 , in Virus-Induced Membrane Structures. 1997;71(9):6650–61.
70. Gayen S, Chen AS, Huang Q, Kang C. Biochemical and Biophysical Research Communications West Nile Virus (WNV) protease and membrane interactions revealed by NMR spectroscopy. Biochem Biophys Res Commun [Internet]. 2012;423(4):799–804.
71. Yu L, Takeda K, Markoff L. Protein-protein interactions among West Nile non-structural proteins and transmembrane complex formation in mammalian cells. Virology. 2013;446(1-2):365–377. doi:10.1016/j.virol.2013.08.006
72. Růzek D, Gritsun TS, Forrester NL, et al. Mutations in the NS2B and NS3 genes affect mouse neuroinvasiveness of a Western European field strain of tick-borne encephalitis virus. Virology. 2008;374(2):249–255. doi:10.1016/j.virol.2008.01.010
73. Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, et al. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins : Perspectives for drug design. Antiviral Res. 2010;87(2):125–48.
74. Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. J Virol. 1999;73(6):4611–4621.

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53

75. Liu WJ, Wang XJ, Mokhonov V V, Shi P-Y, Randall R, Khromykh AA. Inhibition of interferon signaling by the New York 99 strain and Kunjin subtype of West Nile virus involves blockage of STAT1 and STAT2 activation by nonstructural proteins. J Virol. 2005;79(3):1934–42.
76. Westaway EG, Khromykh AA, Kenney MT, Mackenzie JM, Jones MK. Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. Virology. 1997;234(1):31–41. doi:10.1006/viro.1997.8629
77. Guo JT, Hayashi J, Seeger C. West Nile virus inhibits the signal transduction pathway of alpha interferon. J Virol. 2005;79(3):1343–1350. doi:10.1128/JVI.79.3.1343-1350.2005
78. Roby JA, Keller BC, Ramos HJ, Diamond MS, Gale MJ. The JAK/STAT signaling cascades of multiple cytokines are dysregulated during West Nile virus infection. J Immunol [Internet]. 2016;196:217.38 LP-217.38.
79. Zou G, Puig-Basagoiti F, Zhang B, Qing M, Chen L, Pankiewicz KW, et al. A single-amino acid substitution in West Nile virus 2K peptide between NS4A and NS4B confers resistance to lycorine, a flavivirus inhibitor. Virology. 2009;384(1):242–52.
80. Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Bühler S, Bartenschlager R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. J Biol Chem. 2007;282(12):8873–82.
81. Ray D, Shah A, Tilgner M, et al. West Nile virus 5'-cap structure is formed by sequential guanine N-7 and ribose 2'-O methylations by nonstructural protein 5. J Virol. 2006;80(17):8362–8370. doi:10.1128/JVI.00814-06
82. Zhou Y, Ray D, Zhao Y, et al. Structure and function of flavivirus NS5 methyltransferase. J Virol. 2007;81(8):3891–3903. doi:10.1128/JVI.02704-06
83. Uchil PD, Kumar AV, Satchidanandam V. Nuclear localization of flavivirus RNA synthesis in infected cells. J Virol. 2006;80(11):5451–5464. doi:10.1128/JVI.01982-05
84. Lopez-Denman AJ, Russo A, Wagstaff KM, White PA, Jans DA, Mackenzie JM. Nucleocytoplasmic shuttling of the West Nile virus RNA-dependent RNA polymerase NS5 is critical to infection. Cell Microbiol. 2018;20(8):e12848. doi:10.1111/cmi.12848
85. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. Curr Opin Microbiol. 2008;11(4):369–377. doi:10.1016/j.mib.2008.06.004
86. Dokland T, Walsh M, Mackenzie JM, Khromykh AA, Ee KH, Wang S. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation. Structure. 2004;12(7):1157–1163. doi:10.1016/j.str.2004.04.024
87. Beasley DWC, Barrett ADT. Identification of neutralizing epitopes within structural domain III of the West Nile virus envelope protein. J Virol. 2002;76(24):13097–100.
88. Shirato K, Miyoshi H, Goto A, Ako Y, Ueki T, Kariwa H, et al. Viral envelope protein glycosylation is a molecular determinant of the neuroinvasiveness of the New York strain of West Nile virus. J Gen Virol. 2004;85(Pt 12):3637–45
89. Mukherjee S, Lin T-Y, Dowd KA, Manhart CJ, Pierson TC. The Infectivity of prM-Containing Partially Mature West Nile Virus Does Not Require the Activity of Cellular Furin-Like Proteases. J Virol. 2011;85(22):12067 LP-12072

Institutional Repository - Library & Information Centre - University of Thessaly
20/09/2024 06:05:31 EEST - 3.139.97.53