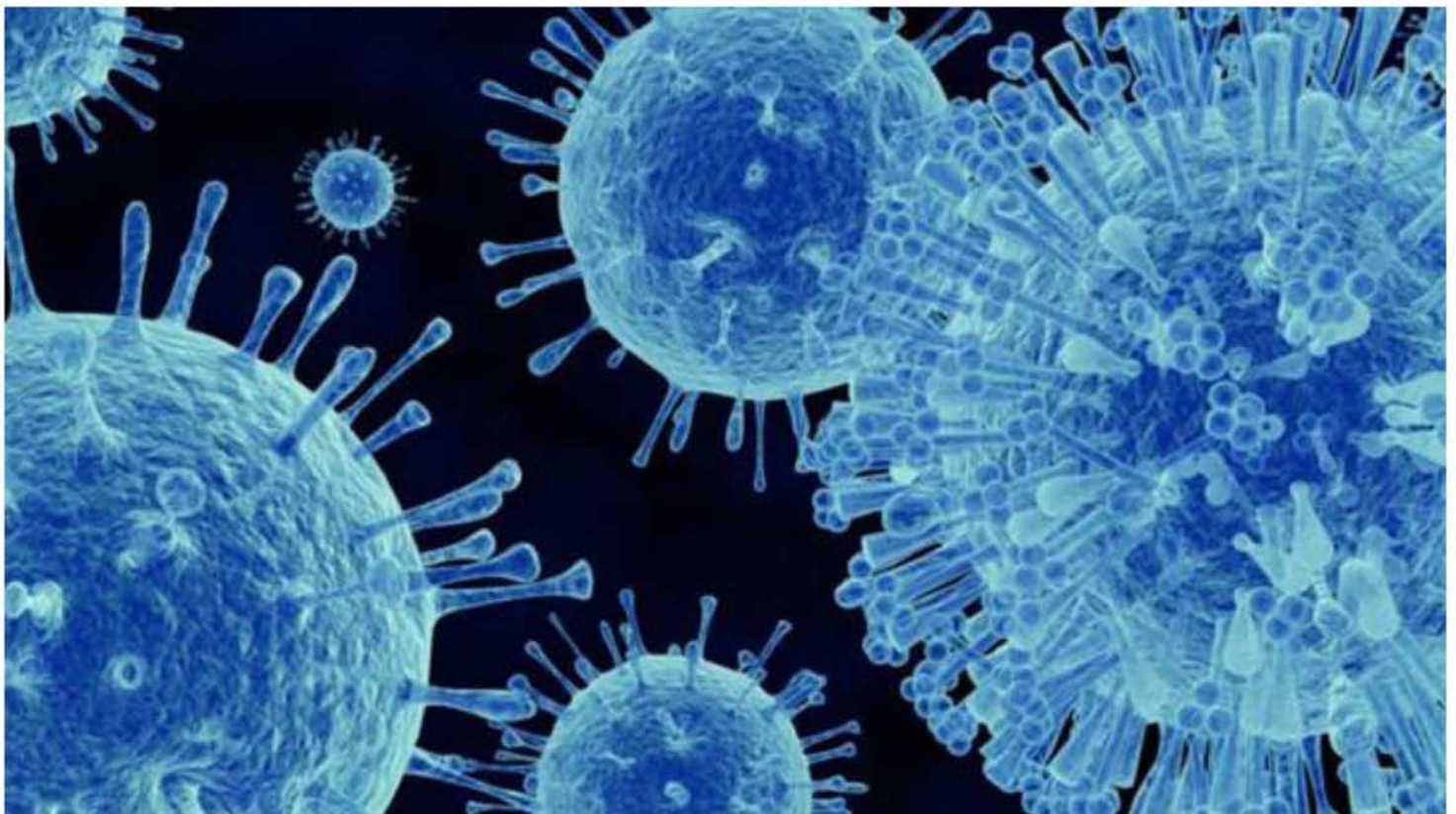


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΔΥΤΙΚΟΥ ΝΕΙΛΟΥ
ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΥΝΘΕΤΙΚΩΝ ΡΙΒΟΔΙΑΚΟΠΤΩΝ

DEVELOPMENT OF MOLECULAR METHODS FOR DIAGNOSIS OF WEST NILE
VIRUS USING SYNTHETIC RIBOSWITCHES



ΖΑΚΑ ΑΝΤΖΕΛΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΙΑΚΟΥΝΤΗΣ ΑΝΤΩΝΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γιακουντής Αντώνης (Επιβλέπων): Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας-Γονιδιωματικής, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαθθίοπουλος Κωνσταντίνος : Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπά-Κονιδάρη Άννα: Διευθύντρια του Α΄ Εργαστηρίου Μικροβιολογίας της Ιατρικής σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής με τη συμβολή ορισμένων ατόμων τα οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά. Αρχικά, λοιπόν, είμαι ευγνώμων στον κύριο Γιακουντή, τον επιβλέποντα καθηγητή, για την πολύτιμη καθοδήγηση του τόσο στο πειραματικό μέρος όσο και στη συγγραφή της πτυχιακής. Ήταν πάντα υπομονετικός, επεξηγηματικός και πρόθυμος να συζητήσει τυχόν προβληματισμούς και απορίες μου. Επίσης, να ευχαριστήσω τον κύριο Μαθιόπουλο που μου επέτρεψε να εργαστώ στο project αυτό και δέχτηκε να είναι συνεπιβλέπων. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Παπά που δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς μου επιτροπής και εξασφάλισε κλινικά δείγματα για το project.

Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα και την βοήθεια τους. Ιδιαίτερα ευγνώμων είμαι στην Ελένη Μπεγκόλλι, διδάκτορα του τμήματος, για την απεριόριστη και πολύτιμη βοήθεια της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Περίληψη

Ο ιός του Δυτικού Νείλου λόγω της ευρείας γεωγραφικής κατανομής του και των σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων που προκαλεί έχει αναδειχθεί σε σημαντικό παθογόνο που απειλεί την δημόσια υγεία. Πιο συγκεκριμένα, συγκαταλέγεται μαζί με τους στενά συγγενικούς του ιούς Zika και Dengue στην οικογένεια Flaviviridae, μια οικογένεια ιών με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας. Διατηρείται στη φύση σε ενδοζωϊκό κύκλο στον οποίο *Culex* κουνούπια δρουν ως φορείς γέφυρα μεταδίδοντας μέσω τσιμπήματος τον ιό από τα πτηνά, τους ξενιστές δεξαμενή, στον άνθρωπο, τον τελικό ξενιστή. Εκτιμάται ότι το 80% των ατόμων που μολύνονται είναι ασυμπτωματικοί, ενώ το 20% εμφανίζει υψηλό πυρετό που συνοδεύεται από συμπτώματα γρίπης. Ωστόσο, στο 1% των ασθενών ο ιός προσβάλλει το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλώντας νευρολογικές διαταραχές (εγκεφαλίτιδα, μηνιγγίτιδα, οξεία χαλαρή παράλυση) που μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε θάνατο.

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ταξινομείται σε 5 γενεαλογίες με την 1 και 2 να είναι γεωγραφικά διευρυμένες και να παρουσιάζουν επιδημιολογική σημασία με την εξέλιξη τους να υποδεικνύει ότι η μολυσματικότητα τους έχει αυξηθεί τα τελευταία 300-400 χρόνια. Στην Αμερική έχει εγκαθιδρυθεί η γενεαλογία 1 από το 1999, χρονιά που καταγράφηκε πρωτοφανής θνητότητα στα πτηνά εξαιτίας του ιού. Στην Ευρώπη έχει επικρατήσει η γενεαλογία 2 η οποία το 2018 προκάλεσε επιδημία με την Ελλάδα να συγκεντρώνει το 20% των αναφερόμενων κρουσμάτων. Συγκεκριμένα, στην Ελλάδα καταγράφηκε κρούσμα για πρώτη φορά το 2010. Την χρονική περίοδο 2010-2014 σημειώθηκαν 694 κρούσματα εκ των οποίων 446 εμφάνισαν σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα και 79 άτομα κατέληξαν. Ο ιός επανεμφανίστηκε το 2017 και έκτοτε σημειώνονται κάθε χρόνο κρούσματα. Μάλιστα το 2018 κόστισε τη ζωή σε 51 ανθρώπους σημειώνοντας ρεκόρ θανάτων.

Η απουσία εμβολίου και αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής εντείνουν την ανάγκη για παρακολούθηση του ιού σε πληθυσμούς πτηνών, κουνουπιών αλλά και ανθρώπων ώστε να εκτιμηθεί ορθά η επιδημιολογική σημασία του ιού και να προληφθούν επικείμενες εξάρσεις. Ωστόσο, οι διαγνωστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται δεν είναι εφικτό να εφαρμοστούν σε μαζική κλίμακα και εκτός εργαστηρίου. Πιο συγκεκριμένα, η κυταροκαλλιέργεια του ιού και η οροξεουδετέρωση απαιτούν επίπεδο βιασφάλειας 3 και είναι χρονοβόρες. Η ανίχνευση με ανοσολογικές μεθόδους εγκυμονεί τον κίνδυνο ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλους φλαβοϊούς, όπως ο Dengue και ο Zika. Οι μοριακές μέθοδοι, παρότι παρέχουν σύντομα αποτελέσματα και διακρίνονται από υψηλή ευαισθησία, απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό.

Η συνθετική βιολογία, όμως, είναι πολλά υποσχόμενη στον τομέα της διάγνωσης δημιουργώντας καινοτόμα εργαλεία όπως οι συνθετικοί toehold ριβοδιακόπτες (Green, 2014). Ως ριβοδιακόπτης ορίζεται μια RNA αλυσίδα μεταγωγέας με

δευτεροταγή δομή που παρεμποδίζει την μεταγραφή ή την μετάφραση της παρακείμενης αλληλουχίας που φέρει (ανενεργή μορφή). Παρουσία, όμως, αλυσίδας συμπληρωματικής με τμήμα του μεταγωγέα, παύει να υφίσταται η δευτεροταγής δομή, επιτρέποντας τη μεταγραφή ή μετάφραση του σήματος που κωδικοποιεί (ενεργή μορφή). Ο Pardee και οι συνεργάτες του το 2016 συγκρότησαν μια διαγνωστική μέθοδο βασισμένη σε συνθετικό Toehold μεταφραστικό ριβοδιακόπτη για την ανίχνευση του ιού Zika, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλό κόστος, ευκολία στη χρήση και ασφάλεια για χρήση στο πεδίο. Η παρούσα πτυχιακή αποσκοπεί, λοιπόν, στην προσαρμογή της μεθόδου αυτής για την διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου. Στο πλαίσιο αυτό κατασκευάστηκαν 5 υποψήφιοι toehold μεταφραστικοί ριβοδιακόπτες οι οποίοι είχαν σχεδιαστεί για να ανιχνεύουν το γονιδίωμα του Δυτικού Νείλου και ελέγχθηκε η απόδοσή τους.

Λέξεις κλειδιά: Ιός Δυτικού Νείλου, Διάγνωση, Συνθετική Βιολογία, Toehold ριβοδιακόπτης

Abstract

The West Nile virus has emerged as a major pathogen that threatens public health due to its wide geographical distribution and the serious clinical symptoms that causes. More specifically, it belongs to the Flaviviridae family, along with its close relatives Zika and Dengue viruses, a family of viruses with positive polarity monoclonal RNA. It is conserved in nature in an endozoic cycle in which *Culex* mosquitoes act as bridge carriers by transmitting the virus from birds, the reservoir hosts, to humans, the final host. It is estimated that 80% of infected people are asymptomatic, while 20% have a high fever accompanied by flu symptoms. However, in 1% of patients the virus infects the central nervous system causing neurological disorders (encephalitis, meningitis, acute flaccid paralysis) that can even lead to death.

West Nile virus is classified into 5 genealogies with 1 and 2 being geographically extended and of epidemiological importance with their evolution indicating that their infectivity has increased over the last 300-400 years. Genealogy 1 has been established in America since 1999, a year in which unprecedented bird mortality was recorded. Genealogy 2 has prevailed in Europe, which in 2018 caused an epidemic with Greece collecting 20% of the reported cases. Specifically, in Greece a case was recorded for the first time in 2010. In the period 2010-2014 there were 694 cases of which 446 suffered severe neurological symptoms and 79 people died. The virus reappeared in 2017, in 2018 it caused 51 deaths setting a record and cases keep occurring every year.

The absence of vaccine and effective treatment intensifies the need to monitor the virus in populations of birds, mosquitoes and humans to properly assess the epidemiological significance of the virus and prevent impending outbreaks. However, the diagnostic methods used cannot be applied on a large scale and outside the laboratory. More specifically, cell culture of the virus and serum neutralization must be performed in a laboratory of level 3 biosafety and are time consuming. Detection by immunological methods carries the risk of a false-positive result due to cross-reactions with other flaviviruses, such as Dengue and Zika. Molecular methods, although provide quickly results and are characterized by highly sensitivity, require expensive equipment and specialized personnel.

Synthetic biology, however, is promising in the field of diagnosis creating innovative tools such as synthetic toehold riboswitches (Green, 2014). A riboswitch is a RNA chain that forms a small secondary structure which prevents the transcription or translation of the adjacent sequence (inactive form). However, in the presence of a chain that is complementary to a part of the switch, the secondary structure ceases to exist, allowing the transcription or translation of the encoding signal (active form). Pardee and his colleagues in 2016 developed a diagnostic method based on a synthetic toehold translational riboswitch to detect Zika. This method is characterized by low cost, ease of use and safety to be applied outside the laboratory. So the present study aims at adapting this method for the diagnosis of West Nile virus. In this context, 5

candidate toehold translational riboswitches, that were designed to detect the West Nile genome, were constructed and their performance was tested.

Keywords: West Nile virus, Diagnosis, Synthetic Biology, Toehold riboswitch

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Ιοί της οικογένειας των αρθροπόδων με μεγάλη ομοιότητα με τον ιό του Δυτικού Νείλου.....	11
1.1 Ιός Dengue.....	11
1.2 Ιός Zika.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ιός του Δυτικού Νείλου.....	14
2.1 Εξέλιξη.....	14
2.2 Κύκλος μετάδοσης.....	15
2.2.1 Φορέας μετάδοσης.....	16
2.2.2 Ξενιστής-δεξαμενή.....	17
2.2.3 Τελικοί ξενιστές.....	17
2.3 Διασπορά.....	18
2.4 Γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου.....	19
2.5 Φυλογένεση του ιού του Δυτικού Νείλου.....	20
2.6 Κλινικές εκδηλώσεις μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου.....	22
2.7 Υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι και μειονεκτήματα.....	23
2.7.1 Μοριακή μέθοδος.....	24
2.7.2 Καλλιέργεια του ιού σε κυτταρικές σειρές.....	24
2.7.3 Ανοσολογική μέθοδος.....	24
2.7.4 Οροεξουδετέρωση.....	25
2.8 Επιλογή κλινικού δείγματος για μοριακή διάγνωση.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Ριβοδιακόπτης Toehold.....	27
3.1 Ριβοδιακόπτες στη φύση και τη συνθετική βιολογία.....	27
3.2 Δομή και λειτουργία συνθετικών ριβοδιακοπών toehold.....	28
3.3 Σύγκριση toehold με προηγούμενους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες.....	29
3.4 Toehold ριβοδιακόπτες στη μοριακή διάγνωση: Εφαρμογή σε Zika..	30

3.5 Σύγκριση ριβοδιακοπών toehold με τις υπάρχουσες διαγνωστικές μεθόδους για τον ιό του Δυτικού Νείλου.....	32
3.6 Γονίδια αναφοράς στους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες.....	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Σκοπός πτυχιακής εργασίας.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Υλικά και μέθοδοι.....	36
5.1 Υλικά.....	36
5.1.1 Δείγματα ιών Δυτικού Νείλου, Zika και Dengue.....	36
5.1.2 Πλασμίδια.....	36
5.1.3 Ένζυμα.....	38
5.2 Κλωνοποίηση β-λακταμάσης	38
5.2.1 Απομόνωση πλασμιδίων 32b b-lact pSB1C3 και Toehold14 (4) pSB1C3 από βακτηριακό στοκ <i>E.coli</i> DH5α.....	38
5.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου β-λακταμάσης από τα πλασμίδια 32b b-lact pSB1C3 και Toehold14 (4) pSB1C3 με PCR	38
5.2.3 Απομόνωση και καθαρισμός β-λακταμάσης από γέλη ηλεκτροφόρησης.....	39
5.2.4 Αντίδραση λιγάσης	39
5.2.5 Κλωνοποίηση πλασμιδίου pGEM με ένθεμα τη β-λακταμάση σε <i>E. coli</i> DH5α.....	40
5.2.6 Απομόνωση πλασμιδίων, προετοιμασία για αλληλούχηση.....	40
5.3 Κλωνοποίηση 5 αλληλουχιών toehold σε φορέα eGFP.....	41
5.3.1 Υβριδοποίηση DNA αλυσίδων toehold.....	41
5.3.2 Αντιδράσεις λιγάσης.....	41
5.3.3 Κλωνοποιήσεις με ένθεμα τις αλληλουχίες των toehold σε <i>E. coli</i> DH5α.....	41
5.3.4 Απομόνωση πλασμιδίων, προετοιμασία για αλληλούχηση.....	42
5.4 Απομόνωση RNA – Επεξεργασία με DNase – Κατακρήμνιση RNA....	42
5.4.1 Απομόνωση RNA	42
5.4.2 Επεξεργασία με DNase.....	42
5.4.3 Κατακρήμνιση RNA.....	43
5.5 Αντίστροφη μεταγραφή.....	43

5.6 Ποσοτική PCR.....	43
5.7 <i>In vitro</i> μεταγραφή και μετάφραση toehold ριβοδιακοπών με γονίδιο αναφοράς την eGFP.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Αποτελέσματα.....	45
6.1 Κλωνοποίηση β-λακταμάσης.....	45
6.1.1 Διαγνωστική πέψη των φορέων 32b b-lact pSB1C3 και Toehold14 pSB1C3.....	45
6.1.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR.....	46
6.1.3 Διαγνωστική πέψη πλασμιδίων μετασηματισμένων αποικιών <i>E. coli</i>	47
6.2 Διαγνωστική πέψη μετασηματισμένων αποικιών με φορέα pGEM-eGFP για τον έλεγχο της ένθεσης των toeholds.....	48
6.3 Ηλεκτροφόρηση RNA.....	49
6.4 Αποτελέσματα ποσοτικής PCR.....	50
6.5 Ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου με τους 5 υποψήφιους ριβοδιακόπτες που φέρουν ως γονίδιο αναφοράς την eGFP	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Συζήτηση και συμπεράσματα.....	54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	58
1.Οργάνωση γονιδιώματος ιού Δυτικού Νείλου.....	58
1.1 Τερματικές αλληλουχίες	58
1.2 Δομικές πρωτεΐνες - ικό σωματίο.....	59
1.3 Μη Δομικές πρωτεΐνες-Σύμπλοκο αντιγραφής.....	60
2. Στάδια προσβολής από τον ιο του Δυτικού Νείλου.....	62
2.1 Αναγνώριση του κυττάρου στόχου από τον ιό του Δυτικού Νείλου	62
2.2 Είσοδος.....	62
2.3 Μετάφραση.....	63
2.4 Αντιγραφή.....	64
2.5 Συναρμολόγηση, ωρίμανση και εκβλάστηση ιοσωματίων.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

Κεφάλαιο 1: Ιοί της οικογένειας των αρθροπόδων με μεγάλη ομοιότητα με τον ιό του Δυτικού Νείλου

Οι ιοί του Δυτικού Νείλου, του Dengue και του Zika ανήκουν στους ιούς που ως φορέα - γέφυρα χρησιμοποιούν τα αρθρόποδα και συγκεκριμένα τα κουνούπια για τη μετάδοσή τους σε ποικίλα είδη οργανισμών συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου. Ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι στενά σχετιζόμενος με τους ιούς Dengue και Zika, καθώς πέρα από τον κοινό τρόπο μετάδοσης, κατατάσσονται στο γένος *Flavivirus* της οικογένειας *Flaviviridae*. Οι φλαβοϊοί λόγω των σοβαρών προβλημάτων υγείας που προκαλούν στον άνθρωπο και της ευρείας γεωγραφικής κατανομής τους αποτελούν απειλή για την δημόσια υγεία σε παγκόσμιο επίπεδο.

1.1 Ιός Dengue

Ιστορικά η προέλευση του Dengue δεν έχει διευκρινιστεί, ενώ έχουν καταγραφεί 4 υπότυποι του ιού. Τον 19^ο αιώνα σημειώνονταν σποραδικά κρούσματα με την κατάσταση όμως να έχει αλλάξει δραματικά έκτοτε. Στην πρώτη επιδημία στη Μαλίνα στις Φιλιππίνες το 1954, ο πυρετός που προκάλούσε η μόλυνση από τον ιό ανακηρύχθηκε παγκόσμιο πρόβλημα υγείας. Ακολούθησαν εξάρσεις τις δεκαετίες του 80 και του 90 με τον ορότυπο 2 να κυριαρχεί. Το 1998 σημειώθηκε πανδημία με 1,2 εκατομμύρια ασθενείς με πυρετό σε 56 χώρες για την οποία ευθυνόταν ο καινούργιος ορότυπος 3 (Malavige et al., 2004). Ο ιός Dengue συναντάται κυρίως σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, ενώ πλέον είναι ενδημικός σε 100 χώρες στην Νοτιοανατολική Ασία, την Αμερική και την νοτιοανατολική Ευρώπη, συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας (Guzman et al., 2015). Εκτιμάται ότι κινδυνεύουν να μολυνθούν 2,5 δισεκατομμύρια άνθρωποι σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές, ενώ 50-100 εκατομμύρια κρούσματα καταγράφονται κάθε χρόνο με 500,000 ανθρώπους να χρήζουν νοσηλείας λόγω σοβαρών συμπτωμάτων που εμφανίζουν, ενώ η θνητότητα ανέρχεται το 5% σε ορισμένες περιοχές (Guzman et al., 2010).

Όσον αφορά στο τρόπο μετάδοσης του ιού, πραγματοποιείται μέσω τσιμπήματος μολυσμένων θηλυκών κουνουπιών του γένους *Aedes* κατά την λήψη γεύματος αίματος. Πιο συγκεκριμένα, το είδος *aegypti* είναι ο πιο σημαντικός φορέας ενώ τα είδη *albopictus* και *polynesiensis* ανάλογα την περιοχή λειτουργούν ως φορείς (Malavige et al., 2004). Ανησυχία για την εξάπλωση του ιού στην Ευρώπη προκαλεί η παρουσία των κουνουπιών *Aedes aegypti* και *Aedes albopictus* (Guzman et al., 2015). Ακόμη, η μετάδοση του ιού φαίνεται να είναι δυνατή μέσω μετάγγισης αίματος.

Όσον αφορά στην κλινική εικόνα των ατόμων που μολύνονται, το 75% είναι ασυμπτωματικοί, ενώ το 25% των ατόμων που είναι συμπτωματικοί μπορεί να εκδηλώσουν πυρετό, αιμοραγικό πυρετό και σύνδρομο κλονισμού του Dengue με την σοβαρότητα των συμπτωμάτων να διαφέρει μεταξύ των υποτύπων. Πιο συγκεκριμένα, ο πυρετός παρατηρείται σε πρωτογενής και δευτερογενής λοίμωξης και πρόκειται για την απότομη ανάπτυξη υψηλού πυρετού που συνοδεύεται από

έντονο πονοκέφαλο, μυαλγία και αρθραλγία. Ο αιμοραγικός πυρετός σημειώνεται σε δευτερογενείς λοιμώξεις, αλλά και σε πρωτογενείς κυρίως σε νεογνά. Χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό, και συχνά ηπατομεγαλία, που ακολουθείται από ταχυκαρδία, υπόταση και αιμοραγία, λόγω της διαροής του πλάσματος με πιο συχνή την αιμοραγία από την γαστρεντερική οδό. Τέλος, έντονη διαροή του πλάσματος προκαλείται στο σύνδρομο κλονισμού του Dengue που συχνά συνοδεύεται από εγκεφαλοπάθεια και εμφανίζει το μεγαλύτερο ποσοστό θνητότητας σε σχέση με τις άλλες νόσους που αναφέρθηκαν. Τέλος, τα τελευταία χρόνια επιπλοκές όπως ηπατική και νεφρική ανεπάρκεια έχουν αυξηθεί σημαντικά (Malavige et al., 2004). Δεδομένου λοιπόν της ευρείας γεωγραφικής κατανομής και της σοβαρότητας των ασθενειών που προκαλεί ο Dengue, έχει χαρακτηριστεί ως η πιο σημαντική απειλή για την ανθρώπινη υγεία μεταξύ των ιών των αρθροπόδων.

1.2 Ιός Zika

Ο ιός του Zika ονομάστηκε έτσι από το δάσος Zika στην περιοχή της Uganda όπου απομονώθηκε για πρώτη φορά από πίθηκο το 1947 και από άνθρωπο το 1952. Έκτοτε σημειώθηκαν σποραδικά κρούσματα σε Αφρική και Ασία έως το 2007 όπου ο ιός ήταν σε έξαρση στα νησιά Yap του Ειρηνικού ωκεανού με το 75% του πληθυσμού να μολύνεται και το 20% να εμφανίζει κλινικά συμπτώματα. Ακολούθησε δεύτερη έξαρση το 2013 στο γαλλικό νησιωτικό σύμπλεγμα του Ειρηνικού με τα άτομα που χρειάστηκαν ιατρική βοήθεια να εκτιμώνται στα 28.000 και τους ασθενείς που νόσησαν από το σύνδρομο Guillain-Barre να αυξάνονται κατά 20 φορές. Το 2015 εμφανίζεται στην Βραζιλία προκαλώντας επιδημία με αυξημένες περιπτώσεις ασθενών με σύνδρομο Guillain-Barre, ενώ για πρώτη φορά συσχετίστηκε με την μικροκεφαλία. Έκτοτε έχει γίνει διασπορά στη Νότια και Βόρεια Αμερική, ενώ κρούσματα έχουν σημειωθεί στην Ευρώπη και την Ωκεανία υποδηλώνοντας την ταχεία εξάπλωση του ιού (Yun et al., 2017, Sharma S. et al., 2017).

Όσον αφορά στο τρόπο μετάδοσης του ιού, πραγματοποιείται κυρίως μέσω τσιμπήματος μολυσμένων θηλυκών κουνουπιών κατά την λήψη γεύματος αίματος με το γένος *Aedes* να είναι ο βασικός φορέας. Το γένος αυτό συναντάται κυρίως σε τοπικές περιοχές της Ασίας, της Αφρικής και της Αμερικής. Όμως, φαίνεται να εξαπλώνεται ραγδαία σε περιοχές συμπεριλαμβανομένης της Ευρώπης. Ακόμη, έχει καταγραφεί η απευθείας μετάδοση του ιού από άνθρωπο σε άνθρωπο μέσω σεξουαλικής επαφής, θηλασμού καθώς και περιγεννητική μετάδοση (Ferraris et al., 2019).

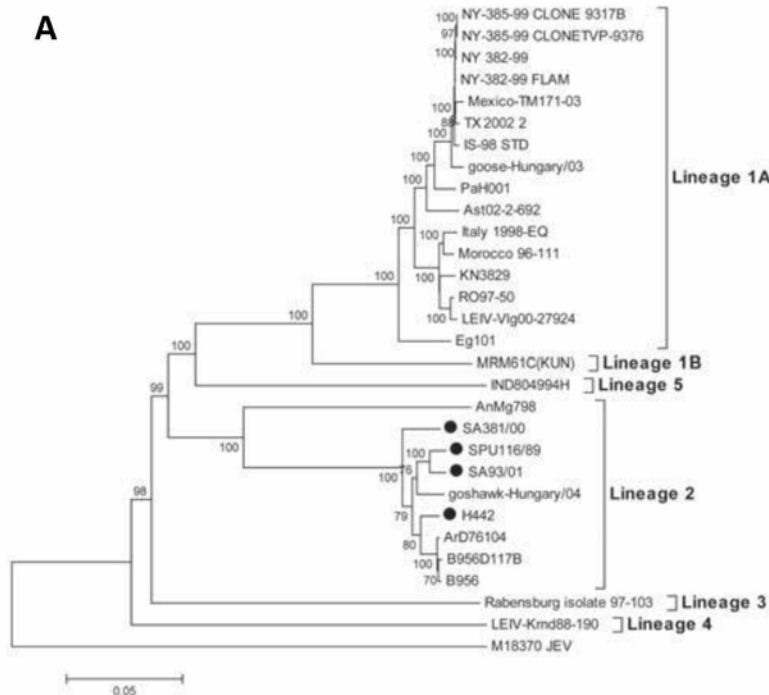
Όσον αφορά στη κλινική εικόνα των μολυσμένων ανθρώπων, συνήθως είναι ασυμπτωματικοί. Ένα μικρό ποσοστό μπορεί να εμφανίσει ήπια συμπτώματα όπως πυρετό, εξανθήματα, αρθραλγία και επιπεφυκίτιδα. Όμως, έχει καταγραφεί ότι η προσβολή από τον ιό πιο σπάνια προκαλεί και νευρολογικές ασθένειες όπως το σύνδρομο Guillain-Barre (αυτοάνοση ασθένεια που χαρακτηρίζεται από φλεγμονή των περιφερικών νεύρων οδηγώντας σε μυϊκή αδυναμία και τελικά παράλυση),

μηνιγγίτιδα και εγκεφαλίτιδα εγείροντας ανησυχία για την παθογένεια του ιού. Ακόμη πιο ανησυχητικό είναι το γεγονός ότι κατά την τελευταία έξαρση στο 42% των προσβεβλημένων εγκύων τα έμβρυα εμφάνισαν κάποια είδους ανωμαλία στον υπέρηχο με τον κλινικό φαινότυπο να διαφέρει συμπεριλαμβανομένης της μικροκεφαλίας, ενώ προκλήθηκαν και αποβολές (Ferraris et al., 2019). Συνεπώς, πρόκειται για έναν ιό που έχει σοβαρές επιπτώσεις στην δημόσια υγεία.

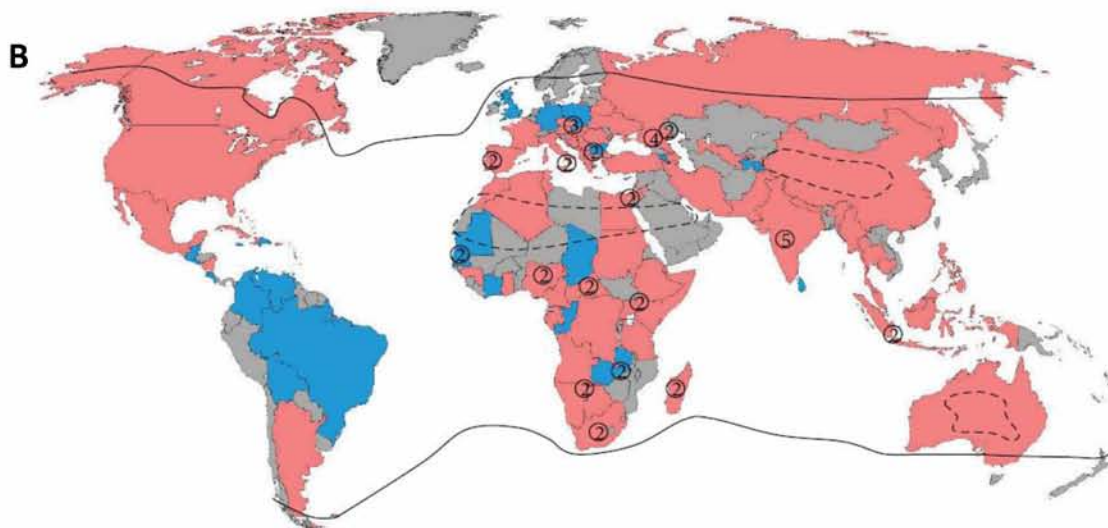
Κεφάλαιο 2: Ιός του Δυτικού Νείλου

2.1 Εξέλιξη

Ο ιός του Δυτικού Νείλου έχει ταξινομηθεί σε 5 γενεαλογίες των οποίων οι γονιδιωματικές αλληλουχίες διαφέρουν 20-25%. Επιπλέον, καινούργιοι γονότυποι απομονώνονται διαρκώς, με τον μέσο ρυθμό υποκατάστασης νουκλεοτιδίων ανά έτος να υπολογίζεται $7,55 \times 10^{-4}$ (Añez et al., 2013), υποδεικνύοντας την ικανότητά του να προσαρμόζεται σε νέες συνθήκες διευρύνοντας έτσι την εξάπλωσή του. Οι γενεαλογίες 1, 2 και 5 έχουν συσχετιστεί με σημαντικές επιδημίες στους ανθρώπους με την 1 και την 2 να έχουν επικρατήσει. Πιο συγκεκριμένα, η γενεαλογία 1 θεωρείται η πιο ευρέως διαδεδομένη, αφού έχει απομονωθεί από Ευρώπη, Μέση Ανατολή, Αφρική, Αμερική και Αυστραλία. Η γενεαλογία 2 αρχικά ήταν περιορισμένη στην Αφρική και είχε συσχετιστεί με ασυμπτωματικές μολύνσεις. Ωστόσο, πλέον, η γεωγραφική της κατανομή είναι ευρύτερη, αφού έχει εγκατασταθεί στην Ευρώπη και τη Ρωσία. Ακόμη, έχει συσχετιστεί με εξάρσεις σε πληθυσμούς ανθρώπων και πτηνών καθώς και με την πρόκληση συμπτωμάτων. Η γενεαλογία 3 έχει απομονωθεί μόνο από κουνούπια στην Τσεχία και την Αυστρία το 1997 και 1999 αντίστοιχα και εμφανίζει 75%-77% και 89%-90% νουκλεοτιδική και αμινοξική ομοιότητα με απομονώσεις των γενεολογιών 1 και 2. Η γενεαλογία 4 συναντάται στην Ρωσία από το 1998. Τέλος, η γενεαλογία 5, που επισήμως κατατάσσεται ως υποκλάδος της γενεαλογίας 1, περιλαμβάνει απομονώσεις στην Ινδία που εντοπίστηκαν από το 1955-1982 με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία να αποκλίνει κατά 74% -78% από τις γενεαλογίες 1-4 (Εικόνα 1). Η επιδημιολογική σημασία των γενεαλογιών 3-5 παραμένει ασαφής (Mann, 2013), (Chancey et al., 2015).



Botha E. M. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging infectious diseases*, 14(2), 222-230.

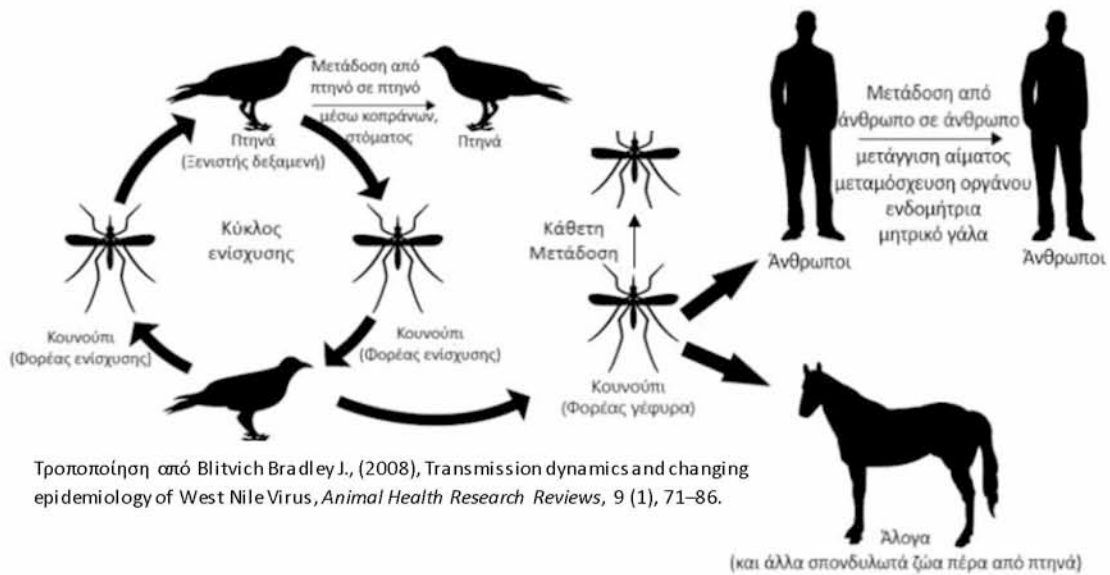


Chancey Caren et al., (2015), The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus, *Biomed Research International*, 2015 (3).

Εικόνα 1: Φυλογένεση και κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου. Α) Φυλογένεση των γενεαλογιών βασιζόμενη σε ολόκληρη την νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος των στελεχών του ιού του Δυτικού Νείλου. Β) Παγκόσμια κατανομή του ιού του Δυτικού Νείλου ανά χώρα το έτος 2015: Το ροζ χρώμα αντιπροσωπεύει περιοχές με περιστατικά ανθρώπων ή οροθετικούς ανθρώπους. Το μπλε χρώμα αντιπροσωπεύει περιοχές που δεν έχει καταγραφεί οροθετικός άνθρωπος ή κουνούπι ή ανθρώπινο περιστατικό. Το γκρι χρώμα αντιπροσωπεύει περιοχές που δεν έχουν αναφερθεί δεδομένα ή θετικά δείγματα. Οι μικροί κύκλοι με τους αριθμούς αναφέρονται στην καταγεγραμμένη παρουσία των σειρών του ιού του Δυτικού Νείλου πέρα της γενεαλογίας 1 στη συγκεκριμένη περιοχή. Οι μαύρες γραμμές αναπαριστούν την παγκόσμια κατανομή κουνουπιών που λειτουργούν ως κύριοι φορείς του ιού του Δυτικού Νείλου, με εξαίρεση περιοχές ακραίου κλίματος που σημειώνονται με διακεκομμένες γραμμές. (Añez et al. 2013, Mann 2013)

2.2 Κύκλος μετάδοσης

Ο ιός του Δυτικού Νείλου διατηρείται στη φύση σε έναν ενδοζωικό κύκλο μετάδοσης στον οποίο εμπλέκονται τα κουνούπια του γένους *Culex*, πτηνά και ορισμένα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου (Εικόνα 2) (Blitvich, 2008). Αρχικά, πραγματοποιείται ο κύκλος ενίσχυσης στον οποίο τα κουνούπια λαμβάνουν γεύμα αίματος από μολυσμένα πτηνά που εμφανίζουν υψηλή ιαμία με αποτέλεσμα να γίνονται φορείς ενίσχυσης μεταδίδοντας τον ιό στο πληθυσμό των πτηνών, τα οποία λειτουργούν ως δεξαμενές του ιού. Να σημειωθεί ότι στα κουνούπια έχει παρατηρηθεί ότι μετά από κάθε γεύμα αίματος παράγεται μια πλούσια δεξαμενή γονοτύπων του ιού, εξαιτίας της εξελικτικής πίεσης που ασκεί ο μηχανισμός σίγησης RNA στον ιό να μεταλλάξει το γονιδίωμα του ώστε να μην αναγνωριστεί και υποστεί θραύση από το σύμπλοκο σίγησης επαγόμενο από RNA, με την δεξαμενή αυτή κατά τη μετάδοση στα πτηνά να υφίσταται επιλογή περιορίζοντας την ποικιλία των γονοτύπων στους οργανισμούς αυτούς (Grubaugh et al. 2017, Grubaugh and Ebel 2017). Εκτός από τα πτηνά, τα μολυσμένα κουνούπια έχοντας τον ρόλο του φορέα γέφυρας μεταδίδουν τον ιό στον άνθρωπο, το άλογο, καθώς και σε άλλα είδη θηλαστικών που θεωρούνται τελικοί ξενιστές.



Εικόνα 2: Επισκόπηση του κύκλου μετάδοσης του ιού του Δυτικού Νείλου. Τα παχιά βέλη υποδηλώνουν τον ενδοζωικό κύκλο μετάδοσης που είναι η κοινή διαδρομή μετάδοσης. Τα λεπτά βέλη υποδηλώνουν άλλες διαδρομές μετάδοσης που εμφανίζονται σπάνια. (Grubaugh et al. 2017, Grubaugh and Ebel 2017)

2.2.1 Φορέας μετάδοσης

Αν και ο ιός έχει απομονωθεί από τουλάχιστον 11 διαφορετικά γένη κουνουπιών (*Aedes*, *Aedemomyia*, *Anopheles*, *Coquilletidia*, *Culiseta*, *Deinocerites*, *Mansonia*, *Mimomyia*, *Ortborodomomyia*, *Psorophora* και *Uranoteania*), κύριος φορέας εξάπλωσης είναι το γένος *Culex* (Blitvich, 2008). Στην Ευρώπη και σε άλλες περιοχές υπεύθυνος φορέας θεωρείται το *Culex ripiens*, καθώς αφενός γεωγραφικά είναι ευρέως διαδεδομένο και εντοπίζεται σε οικιακά περιβάλλοντα και αφετέρου τρέφεται από πτηνά (Koenraadt et al., 2019). Εκτός από *Cx. ripiens*, σε Αφρική, Ασία και Αμερική ως φορέας μετάδοσης λειτουργεί και το είδος *Culex quinquefasciatus*. Επίσης, σε δυτικές περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών εντοπίζεται το *Culex tarsalis* και στη νότια Αφρική το *Culex univittatus*. Στην Αυστραλία κυριαρχούν τα *Cx australicus* και *Cx globcoxitus* και συναντάται και το *Culex annulirostris* (Ciota, 2017). Το *Culex ripiens* ταξινομείται σε 2 βιοτύπους, *ripiens* και *molestus*. Όσον αφορά στο *C. ripiens*, πρόκειται για κουνούπια που προτιμούν να τρέφονται με πτηνά και κατά τον χειμώνα υφίστανται διάπαυση μετά από την οποία συνεχίζουν να είναι ικανά να μεταδώσουν τον ιό (Koenraadt et al., 2019). Αντίθετα, τα κουνούπια του βιοτύπου *molestus* προτιμούν να τρέφονται από θηλαστικά και συνεχίζουν ενεργά να τρέφονται με αίμα και τον χειμώνα. Τα θηλυκά υβρίδια των βιοτύπων *ripiens* και *molestus* δεν έχουν ιδιαίτερη προτίμηση σε πτηνά ή θηλαστικά για τη λήψη αίματος, χαρακτηριστικό που τα καθιστά ιδανικούς φορείς-γέφυρες για την μετάδοση από τα πτηνά στα θηλαστικά (Napp et al., 2018). Τέλος, αξιοσημείωτο είναι ότι παρόλο που στα γαμετικά κύτταρα του θηλυκού μολυσμένου κουνουπιού δεν εισέρχεται ο ιός, μέσω κάθετης μεταφοράς ο ιός μολύνει τους απογόνους του (Εικόνα 2).

2.2.2 Ξενιστής-δεξαμενή

Ως ξενιστές-δεξαμενές λειτουργούν κυρίως τα ενδημικά πτηνά, που συνιστούν παράγοντες διασποράς του ιού και θεωρείται ότι καθορίζουν την εποχή και την σοβαρότητα των εξάρσεων. Πιο συγκεκριμένα, οι οικογένειες των Χηνόμορφων, Περιστερόμορφων και Δρυοκολαπτόμορφων αναπτύσσουν χαμηλή ιαμμία ($< 10^5$ pmf ml⁻¹) με αποτέλεσμα να μην δύνανται να μολύνουν τα κουνούπια *Culex pipiens*. Αντίθετα, πτηνά της οικογένειας Στρουθιόμορφων όπως *Passer domesticus* (σπιτοσπουργίτη) και *Quiscalus quiscla* (κίσκαλος) εμφανίζουν υψηλή ιαμμία με χαμηλά ποσοστά θνητότητας. Από την άλλη, πτηνά που ανήκουν στις κορακίδες όπως το *Corvus brachyrhynchos* (αμερικανικό κοράκι) νοσούν και εμφανίζουν υψηλή θνησιμότητα με αποτέλεσμα την μείωση του πληθυσμού των κορακιών στις ΗΠΑ κατά 45% από το 1999. Για να θεωρηθεί ένα είδος πτηνού σημαντικός ξενιστής-δεξαμενή δεν πρέπει να νοσεί ή να πεθαίνει από τον ιό. Βέβαια αυτό δεν συνεπάγεται ότι τα μολυσμένα νεκρά πτηνά δεν συμβάλλουν στη μετάδοση του ιού. Μάλιστα τα νεκρά μολυσμένα πτηνά αφενός είναι πιο εύκολη πηγή αίματος για τα κουνούπια και αφετέρου μειώνονται οι πιθανότητες τα κουνούπια να τρέφονται από ξενιστές με ανοσία ενισχύοντας έτσι την μετάδοση του ιού. Ακόμη, οι οικογένειες των Χαραδριόμορφων, Ιερακίδων και Κουκουβάγιων είναι ξενιστές του ιού. Ωστόσο, στην Βόρεια Αμερική και την Ευρώπη ο κύριος ξενιστής είναι το *Passer domesticus*, καθώς στις περιοχές αυτές εντοπίζονται σημαντικοί πληθυσμοί, ενώ σε δειγματοληψίες άτομα του πληθυσμού εντοπίζονται συχνά οροθετικά για τον ιό και εμφανίζουν υψηλή ιαμμία για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Blitvich 2008, Chancey et al. 2015).

Εκτός από τα πτηνά που είναι ο κύριος ξενιστής-δεξαμενή, καθώς εμφανίζουν την υψηλότερη ιαμμία, επίπεδα ιαμμίας ικανά για την μόλυνση κουνουπιών *Culex pipiens* έχουν καταγραφεί στα είδη *Lemur fulvus*, *Rana rinibunda*, *Sciurus niger*, *Sciurus carolinensis* και *Tamias striatus* (Chancey et al., 2015). Ακόμη, να σημειωθεί ότι ο ιός του Δυτικού Νείλου μπορεί να μεταδοθεί απευθείας μεταξύ ορισμένων πτηνών με αρκετά υψηλή ιαμμία, όπως το αμερικάνικο κοράκι, μέσω στενής επαφής, έκθεσης σε στοματικά υγρά και κόπρανα (Εικόνα 2) (Komar et al., 2003).

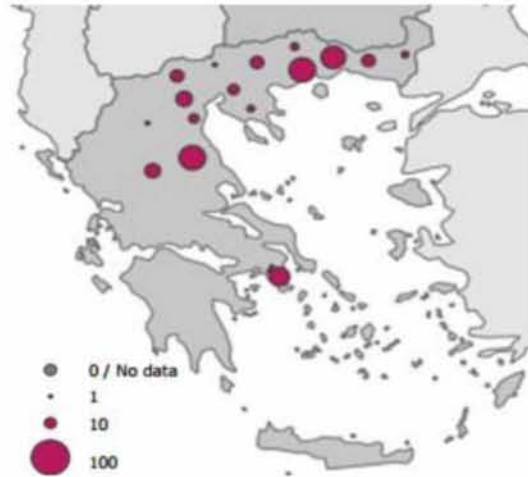
2.2.3 Τελικοί ξενιστές

Τελικοί και ευκαιριακοί ξενιστές είναι τα θηλαστικά όπως οι άνθρωποι και τα άλογα, αφού αναπτύσσουν χαμηλά επίπεδα και μικρής διάρκειας ιαμμία με αποτέλεσμα να μην μεταδίδουν τον ιό στα κουνούπια *Culex pipiens*. Ωστόσο, μπορεί να εμφανίσουν σοβαρά νοσήματα ή ακόμη και να πεθάνουν λόγω του ιού. Χαμηλή ιαμμία, επίσης, συναντάται και σε άλλα ζώα όπως, νυχτερίδες, μαύρες και καφέ αρκούδες, γάτες, αγελάδες, σκύλους, κατσίκες, ποντίκια, αρουραίους και πρόβατα. Τέλος, να σημειωθεί ότι είναι δυνατόν ο ιός να μεταδοθεί απευθείας μεταξύ των ανθρώπων μέσω μετάγγισης αίματος, μεταμόσχευσης οργάνων, μητρικού γάλακτος καθώς και ενδομητρίως από την μητέρα στο έμβρυο (Blitvich 2008, Chancey et al. 2015).

2.3 Διασπορά

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανιχνεύτηκε πρώτη φορά σε μια γυναίκα με υψηλό πυρετό στην Uganda το 1937 και ακολούθησαν σποραδικά κρούσματα και εξάρσεις σε Αφρική, Ασία, Μέση Ανατολή και Αυστραλία. Ωστόσο, η μόλυνση από τον ιό συνδέθηκε με κλινικά συμπτώματα κατά τις επιδημίες στην Αίγυπτο και το Ισραήλ τη δεκαετία του '50. Την δεκαετία του '90 αυξήθηκε η συχνότητα των εξάρσεων ιδιαίτερα στην Μεσόγειο, ενώ αυξήθηκαν τα περιστατικά που εμφάνισαν σοβαρά νοσήματα συμπεριλαμβανομένης της εγκεφαλίτιδας (Chancey et al., 2015). Στο δυτικό ημισφαίριο ο ιός εμφανίστηκε για πρώτη φορά το 1999 και πιο συγκεκριμένα στην Νέα Υόρκη μολύνοντας ανθρώπους, αλλά και πτηνά οδηγώντας σε θάνατο κυρίως τα κοράκια. Εξαπλώθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες και γειτονικές χώρες με αποτέλεσμα την εγκατάσταση του στην Βόρεια Αμερική. Κρούσματα έχουν καταγραφεί σε Κεντρική και Νότια Αμερική εγείροντας ανησυχία για πιθανή μελλοντική έξαρση (Kramer et al., 2007). Έως το 2015 εκτιμάται ότι μόνο τις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής μολύνθηκαν πάνω από 6.000.000 άνθρωποι εκ των οποίων πάνω από 24.000 νόσησαν σοβαρά και απεβίωσαν 2.300 με το ποσοστό θνητότητας να υπολογίζεται 9,5%. Το ποσοστό αυτό βέβαια ίσως δεν είναι αξιόπιστο αφού ο αριθμός των κρουσμάτων και ασθενών ίσως υποτιμήθηκε λόγω ανεπαρκούς καταγραφής (Bai et al., 2019). Σήμερα ο ιός του Δυτικού Νείλου είναι ο πιο διαδεδομένος ιός των αρθροπόδων έχοντας εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους πέρα της Ανταρκτικής (Εικόνα 1B), ενώ θεωρείται η πιο σημαντική αιτία πρόκλησης εγκεφαλίτιδας που οφείλεται σε ιό.

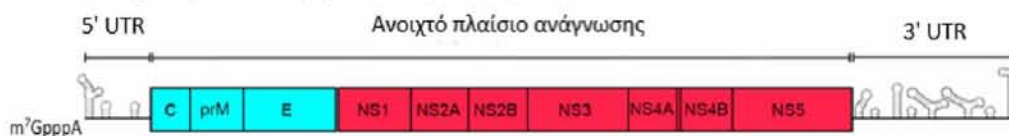
Όσον αφορά στην Ελλάδα, για πρώτη φορά ο ιός ανιχνεύτηκε το 2010. Την χρονική περίοδο 2010-2014 σημειώθηκαν 694 κρούσματα εκ των οποίων 446 εμφάνισαν σοβαρά νευρολογικά συμπτώματα και 79 άτομα κατέληξαν με ποσοστό θνητότητας 17%. Τις χρονιές 2015-2016 δεν αναφέρθηκε κανένα κρούσμα, ενώ το 2017 ο ιός του Δυτικού Νείλου επανεμφανίστηκε με κρούσματα να καταγράφονται ως και το 2019 (52) (Εικόνα 3). Μάλιστα το 2018 ήταν σε έξαρση στην Ευρώπη με τους ανθρώπους που προσβλήθηκαν να ανέρχονται τους 1311. Συγκεκριμένα σε Ιταλία και Ελλάδα ήταν ιδιαίτερα αυξημένος ο αριθμός των κρουσμάτων, καθώς κατείχαν το 39% και 20% του συνολικού αριθμού των αναφερόμενων κρουσμάτων αντίστοιχα (53). Τη χρονιά εκείνη στην Ελλάδα οι θάνατοι ανήλθαν στους 51 σημειώνοντας ρεκόρ. Το παρόν έδωσε ο ιός και φέτος στην Ελλάδα με τα πρώτα κρούσματα να καταγράφονται τον Ιούλιο. Στο σημείο αυτό να διευκρινιστεί ότι η καταγραφή των κρουσμάτων που παρατέθηκε αφορά αποκλειστικά στα προσβεβλημένα άτομα που εμφάνισαν συμπτώματα. Η καταγραφή των ασυμπτωματικών προσβεβλημένων ατόμων δεν είναι εφικτή λόγω της απουσίας κατάλληλης στρατηγικής που θα επέτρεπε την μαζική ανίχνευση του ιού.



Εικόνα 3: Κατανομή καταγεγραμμένων κρουσμάτων του ιού του Δυτικού Νείλου το έτος 2019

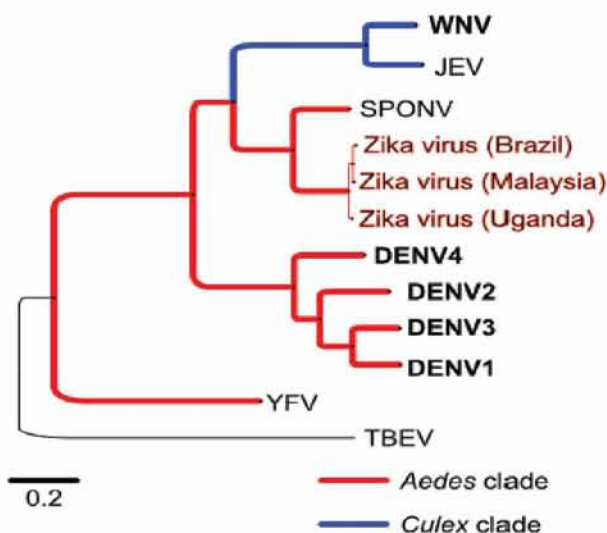
2.4 Γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου ανήκει στην οικογένεια των φλαβοϊών, το γονιδίωμα των οποίων είναι μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας που φέρει 5' καλύπτρα τύπου I ενώ απουσιάζει η πολύ-A ουρά από το 3' άκρο. Το μονόκλωνο RNA του ιού Δυτικού Νείλου ανέρχεται περίπου στα 11,000 νουκλεοτίδια και απαρτίζεται από 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές με πολύπλοκες συντηρημένες δευτεροταγείς δομές, που αποτελούνται από 96 και 337-649 νουκλεοτίδια αντίστοιχα. Κωδικοποιεί για ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, που υπολογίζεται στα 10,301 νουκλεοτίδια στην πλειονότητα των στελεχών του ιού. Από την μετάφραση του RNA προκύπτει μια πολυπρωτεΐνη που κωδικοποιεί για 10 πρωτεΐνες. Οι 3 πρώτες πρωτεΐνες αντιστοιχούν στην καψιδιακή πρωτεΐνη (C), την μεμβρανική πρωτεΐνη (prM) και στην πρωτεΐνη του φακέλου οι οποίες κατατάσσονται στις δομικές, καθώς συναρμολογούνται στα ιικά σωματίδια. Ακολουθούν οι 7 μη δομικές πρωτεΐνες NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5 που διεκπεραιώνουν τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA (Εικόνα 4) (Brinton, 2013). Φυλογενετική ανάλυση της αμινοξικής αλληλουχίας των φλαβοϊών υπέδειξε ότι ιδιαίτερα συντηρημένες είναι οι πρωτεΐνες NS1, NS3 και NS5, ενώ η αμινοξική αλληλουχία του ιού Dengue φέρει 50% ομοιότητα με του Δυτικού Νείλου. Στην εικόνα 5 παρατίθενται οι φυλογενετικές σχέσεις των γένους των φλαβοϊών, μεταξύ των οποίων και οι στενά σχετιζόμενοι με τον ιό του Δυτικού Νείλου Zika και Dengue (Εικόνα 5) (Deubel, 1988).



Τροποποίηση από Barrows Nicholas J. et al., (2018), *Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses, Chemical Review*, 118 (8), 4448-4482.

Εικόνα 4: Οργάνωση γονιδιώματος φλαβοϊών. Το μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας διαθέτει καλύπτρα αλλά όχι πολυΑ ουρά. Φέρει ένα μόνο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που κωδικοποιεί για τρεις δομικές και επτά μη δομικές πρωτεΐνες που αναπαρίστανται με γαλάζιο και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. (Brinton, 2013)



Εικόνα 5: Φυλογενετικό δένδρο αμινοξικής αλληλουχίας για την ανασυγκρότηση των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των φλαβοϊών που μεταδίδονται από τα κουνούπια: ιός Δυτικού Νείλου (WNV), ιός ιαπωνικής εγκεφαλίτιδας (JEV), ιός Spondweni (SPONV), ιός Zika, ορότυποι 1-4 ιού δάγκειου πυρετού (DENV1-4), ιός κίτρινου πυρετού (YFV). Ρίζα τέθηκε ιός της εγκεφαλίτιδας που μεταδίδεται από κρότωνα (Deubel, 1988)

Tan Alvin M. J. et al, (2017), The complex relationship between the emerging flaviviruses: Dengue and Zika, *Biochemist*, 39(3), 18-2.

2.5 Φυλογένεση του ιού του Δυτικού Νείλου

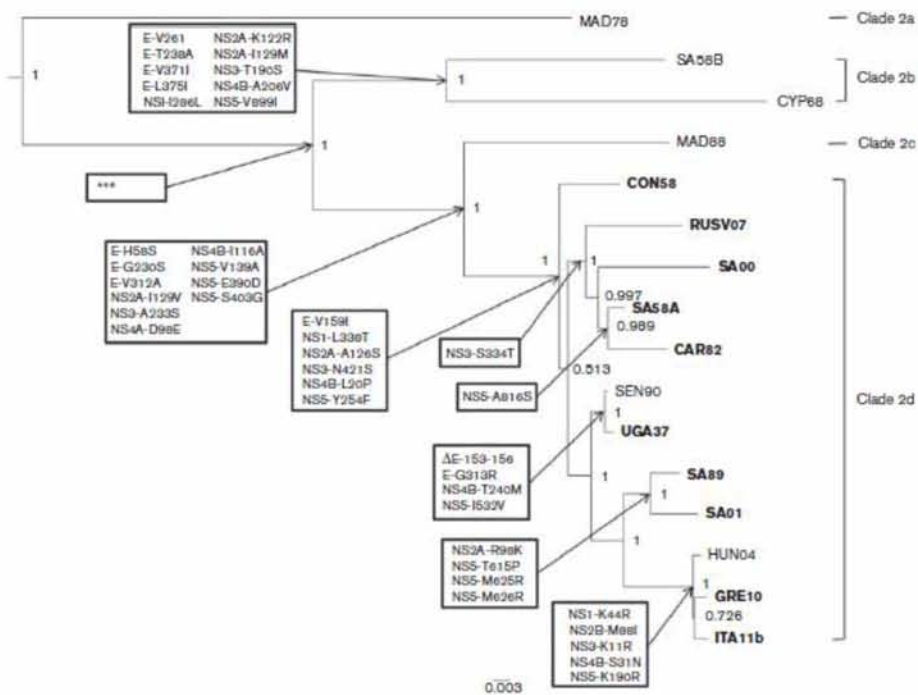
Όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 2.1 της εξέλιξης, οι γενεαλογίες 1 και 2 είναι γεωγραφικά πιο διευρυμένες και οι μόνες που έχουν συσχετιστεί με κλινικά περιστατικά με την εξέλιξη τους να υποδεικνύει ότι αυξάνεται η μολυσματικότητα του ιού. Όσον αφορά στη γενεαλογία 1 ταξινομείται στους κλάδους 1a, ο οποίος υποδιαιρείται σε 6 συστάδες, και 1b με χαρακτηριστικές αμινοξικές υποκαταστάσεις που φέρουν να παρατίθενται στον πίνακα 1. Η συστάδα 1 του κλάδου 1a συγκροτείται από γονιδιώματα του ιού του Δυτικού Νείλου που απομονώθηκαν στη Βόρεια Αφρική (1951-1976), το Ισραήλ (1953), την Ινδία (1968) και την Πορτογαλία (1971). Η συστάδα 2 περιέχει αλληλουχίες που απομονώθηκαν από τη Ρουμανία (1996), το Μαρόκο (1996 και 2003), Κένυα (1998), Ιταλία (1998 και 2008-2011), Ρωσία (1999-2000), Γαλλία (2000), Πορτογαλία (2004) και Ισπανία (2007), οι οποίες υποδιαιρέθηκαν περαιτέρω σε υποτύπους της Ανατολικής Ευρώπης και της Μεσογείου. Η συστάδα 3 περιλαμβάνει απομονώσεις από τη Ρωσία, η συστάδα 5 αποτελείται από απομονώσεις στη Κεντρική Αφρική κατά το διάστημα 1965-1979, ενώ η συστάδα 6 συγκροτείται από απομονώσεις σε Αφρική. Η συστάδα 4 περιλαμβάνει απομονώσεις από την Τυνησία (1997), το Ισραήλ (1998 και 2000), την Ουγγαρία (2003) και την Αμερική της οποίας ο γονότυπος είναι όμοιος με του Ισραήλ (1998) κατά 99,8%. Η ανάγκη για προσαρμογή του ιού στους πληθυσμούς άγριων πτηνών και των κουνουπιών του γένους *Culex* της Αμερικής πυροδότησε την εξέλιξη του γονοτύπου. Μεταξύ των γονοτύπων που προέκυψαν ιδιαίτερο ενδιαφέρον φέρει ο γονότυπος της Βόρειας Αμερικής (2002), που χαρακτηρίζεται από την αμινοξική υποκατάσταση E-V159A. Η υποκατάσταση αυτή στη πρωτεΐνη E έχει συσχετιστεί με τον μειωμένο χρόνο επώασης του ιού στα κουνούπια του γένους *Culex* προσδίδοντας πλεονέκτημα στον γονότυπο για την εδραίωσή του (Mann, 2013).

Όσον αφορά στη γενεαλογία 2, αποτελείται από τέσσερεις κλάδους (2a – 2d) (Εικόνα 6). Ο κλάδος 2a αποτελείται από τον πιο αποκλίνοντα γονότυπο, Μαδαγασκάρη (1978). Ο κλάδος 2b αποτελείται από τους γονότυπους της Νότιας Αφρικής (1958) και της Κύπρου (1968), ενώ ο κλάδος 2c από της Μαδαγασκάρης (1988). Ο κλάδος 2d είναι ο πιο διαδεδομένος και αποτελείται από τον υποκλάδο της ανατολικής Ευρώπης που συγκροτείται από το γονότυπο της Ρωσίας (2007), τον υποκλάδο της κεντρικής Ευρώπης που προέκυψε από την γονότυπο της Ουγγαρίας (2004), καθώς και απομονώσεις σε Αφρική και Κονγκό 58. Στον υποκλάδο της κεντρικής Ευρώπης ταξινομούνται και οι γονότυποι της Ιταλίας (2011) και της Ελλάδας 2010 (GRE10) λόγω της ομοιότητάς τους με της Ουγγαρίας. Σχετικά με την Ελλάδα, παρόλο που ο γονότυπος GRE10 έχει εδραιωθεί, κατά την έξαρση του ιού το 2018 γονότυπος που ανήκει στον υποκλάδο της Ανατολικής Ευρώπης απομονώθηκε από κλινικό περιστατικό στην Ανατολική Ελλάδα. Φυλογενετική ανάλυση απομονώσεων του ιού στην Ευρώπη αποκάλυψε συνολικά 142 πολυμορφικές θέσεις αμινοξέων με τις 32 να είναι συντηρημένες εκ των οποίων οι 19 κατανέμονται στις μη δομικές πρωτεΐνες και τη πρωτεΐνη E (Chaintoutis, 2019). Οι υποκαταστάσεις E-V159I, NS1-L338T, NS2A-A126S, NS3-N421S, NS4B-L20P και NS5-Y254F χαρακτηρίζουν απομονώσεις της γενεαλογίας 2 που εμφανίζουν μολυσματικότητα σύμφωνα με μελέτες σε ποντίκια με προσβεβλημένο νευρικό σύστημα. Επίσης, η προλίνη στη θέση 259 της πρωτεΐνης NS3, που συναντάται στο γονότυπο GRE10 και στη συστάδα 4 του κλάδου 1a, έχει συσχετιστεί με αυξημένη μολυσματικότητα και παθογένεση σε πτηνά (McMullen, 2013). Μάλιστα, μελέτη αποκάλυψε ότι η ιαμμία που επιτυγχάνεται σε κορακοειδή μολυσμένα από το στέλεχος της Ελλάδας είναι υψηλότερη σε σχέση με το στέλεχος της Νέας Υόρκης (1999) (Lim,2015).

Πίνακας 1 : Σύνοψη των αμινοξικών υποκαταστάσεων της γενεαλογίας 1 του ιού του Δυτικού Νείλου σε σχέση με την ακολουθία αναφοράς; E: φάκελος; NS: μη δομικές πρωτεΐνες 4A, NS4A, 4B, NS4B; Οι κουκκίδες δεν δείχνουν καμία διαφορά από την ακολουθία αναφοράς. Αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν την παρουσία της ενδεχόμενης αλλαγής αμινοξέων σε ορισμένες αλλά όχι σε όλες τις απομονώσεις.

Lineage/ Clade Cluster	Genotype	E		NS1		NS2A		NS3		4A	4B	NS5				
		126	159	291	70	99	206	103	224	175	249	85	11	274	314	898
		I	I	K	A	S	L	A	A	I	P	V	S	S	K	I
1a	1	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	N	-	-	-	
	2	Eastern European	-	M	-	S	-	F	V	-	-	-	-	-	-	I
		Mediterranean	-	M	-	S	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	P	-	T	-	-	T	-	-	-	-	
	4	-	I	V	-	*	-	V	-	-	-	A	-	-	-	-
		NY99	I	V	-	*	-	V	-	-	-	A	-	-	-	*
SE Coastal Texas		I	V	-	*	-	V	-	-	-	A	-	-	-	-	
NA/WN02		I	A	R	*	-	V	-	-	-	A	-	-	-	*	
SW/WN03		I	A	R	*	-	V	-	-	-	T	-	-	R	-	
MW/WN06	I	A	R	*	-	V	-	-	-	A/I	-	-	-	*		
5	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	T	-	-	
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	

Mann Brian R. et al.,(2013). Molecular epidemiology and evolution of West Nile virus in North America. International journal of environmental research and public health, 10(10), 5111–5129.



McMullen, A. R., Albayrak, H., May, F. J., Davis, C. T., Beasley, D., & Barrett, A. (2013). Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *The Journal of general virology*, 94(2), 318–325.

Εικόνα 6 : Φυλογενετικό δέντρο Bayesian απομονώσεων της γενεαλογίας 2 με καταγραφή σε κάθε κόμβο υποκαταστάσεων αμινοξέων που χαρακτηρίζουν κάθε κόμβο. (Chaintoutis 2019, Lim 2015)

*** Λόγω της παρουσίας 90 διαφορών στην αμινοξική αλληλουχία της απομόνωσης MAD78 από τις υπόλοιπες, δεν παρατίθενται; Σε έντονη γραφή παρατίθενται οι γονότυποι που είναι μολυσματικοί σε ποντίκια ή απομονώθηκαν από ανθρώπους.

2.6 Κλινικές εκδηλώσεις της μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου

Με το τσίμπημα ενός μολυσμένου κουνουπιού, ο άνθρωπος προσβάλλεται από τον ιό του Δυτικού Νείλου και ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός του σε κερατινοκύτταρα και δενδριτικά κύτταρα που κατοικούν στο δέρμα συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων Langerhans. Στην συνέχεια πολλαπλασιάζεται σε περιφερικούς λεμφοειδείς ιστούς και στον σπλήνα επιτυγχάνοντας αιμία σε 2-3 μέρες. Με την κυκλοφορία του αίματος ο ιός μεταφέρεται στα όργανα στόχους συμπεριλαμβανομένων των νεφρών, του ήπατος και του νευρικού συστήματος. Με την έναρξη της εμφάνισης των κλινικών συμπτωμάτων παρατηρείται μείωση του επιπέδου του ιού στο αίμα (Sejvar 2016, Suthar 2013). Να σημειωθεί ότι σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση η μόλυνση ενός ατόμου από τον ιό, πέρα από τα συμπτώματα που μπορεί να εμφανίζει, πρέπει να επιβεβαιώνεται εργαστηριακά με την απομόνωση του ιού ή ανίχνευση νουκλεϊκού οξέος του ιού είτε στο αίμα είτε στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή ανίχνευση αντισωμάτων εξειδικευμένων για τον ιό (IgM) στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ή υψηλό τίτλο εξειδικευμένων έναντι του ιού IgM,

ανίχνευση του IgG WNV καθώς και επαλήθευση με εξουδετέρωση για να επιβεβαιωθεί ότι δεν πρόκειται για συγγενικό φλαβοϊό ή παλαιότερη λοίμωξη.

Το 80% των προσβεβλημένων ατόμων είναι ασυμπτωματικοί με την ιαμία να διατηρείται για 8-10 μέρες (Barzon et al., 2015). Η ποσότητα του ιού στο αίμα είναι υψηλότερη και μεγαλύτερης διάρκειας σε ασθενείς που εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα, τα οποία μπορεί να είναι ποικίλα με τη σοβαρότητά τους να διαφέρει. Το πιο κοινό σύμπτωμα είναι η ήπια εμπύρετη ασθένεια που διαρκεί μία βδομάδα και χαρακτηρίζεται από πυρετό. Συνοδεύεται από πονοκέφαλο, μυαλγία, εξανθήματα, αρθραλγία, εμετούς και γαστρεντερολογικά προβλήματα. Η πλειονότητα των ασθενών που εμφανίζουν την ασθένεια αυτή αναρρώνουν πλήρως. Σε λιγότερο από το 1% που ο ιός εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα, προκαλεί νευρολογικής φύσεως ασθένειες και για την ακρίβεια μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα και οξεία χαλαρή παράλυση. Η μηνιγγίτιδα, δηλαδή η φλεγμονή που εντοπίζεται στο συνδετικό ιστό που καλύπτει τον νωτιαίο μυελό και τον εγκέφαλο ή αλλιώς μήνιγγες, συναντάται κυρίως σε άτομα νεαρής ηλικίας. Αντίθετα, η εγκεφαλίτιδα, δηλαδή η φλεγμονή στο παρέγχυμα του εγκεφάλου, συναντάται κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένους ή μεγαλύτερης ηλικίας ανθρώπους και σημειώνει ποσοστά θνητότητας 10-30%. Μπορεί να συνοδεύεται από παρεγκεφαλική αταξία και γενικό παρκισονισμό εξαιτίας του νευροτροπισμού του ιού για εξωπυραμιδικές δομές συμπεριλαμβανομένων του στελέχους, των πυρήνων της βαθιάς γκρίζας ύλης και της παρεγκεφαλίδας. Η οξεία χαλαρή παράλυση εμφανίζεται συνήθως τις πρώτες 24 – 48 ώρες και οφείλεται στην προσβολή του χαμηλότερου κινητικού νευρώνα του νωτιαίου μυελού από τον ιό. Ακόμη, σπάνιες εκδηλώσεις αποτελούν φλεγμονή στο χόριο και τον αμφιβληστροειδή χιτώνα καθώς και το υαλώδες σώμα του οφθαλμού (Sejvar 2016, Byas et al. 2020).

Μακροπρόθεσμα έχει αποδειχθεί ότι συμπτώματα της μόλυνσης από τον ιό του Δυτικού Νείλου μπορεί να επιμείνουν σε ορισμένους ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, τα συμπτώματα αυτά αφορούν νευρολογικές δυσλειτουργίες συμπεριλαμβανομένων κινητικών διαταραχών, πονοκεφάλων και γνωστικών προβλημάτων. Τέλος, έχει δείχθει ότι ο ιός μπορεί να παραμένει στα νεφρά για αυξημένο χρονικό διάστημα χωρίς να αποκλείεται να προκαλέσει χρόνια νεφρική ασθένεια (Sejvar, 2016).

2.7 Υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι και μειονεκτήματα

Η εργαστηριακή διάγνωση του ιού του Δυτικού Νείλου σε βιολογικά δείγματα αίματος, εγκεφαλονωτιαίου υγρού και ούρων μπορεί να πραγματοποιηθεί με μοριακές τεχνικές που ανιχνεύουν νουκλεϊκά οξέα, καλλιέργεια του ιού σε κυτταρικές σειρές που υποδεικνύουν την παρουσία ζωντανού ιού και ανοσολογική μέθοδος που ανιχνεύει ιικά αντιγόνα και οροεξουδετέρωση η οποία ανιχνεύει αντισώματα έναντι του ιού. Ωστόσο, κάθε μέθοδος φέρει ορισμένα μειονεκτήματα με αποτέλεσμα να μην πληροί τα κριτήρια διάγνωσης σε μαζική κλίμακα.

2.7.1 Μοριακή μέθοδος

Η ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού στα κλινικά δείγματα πραγματοποιείται με την αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμερισμού σε πραγματικό χρόνο (RT- qPCR). Πρόκειται για την πιο ευαίσθητη και γρήγορη τεχνική ανίχνευσης του ιού σε σχέση με τις άλλες μεθόδους. Ωστόσο, τα χαμηλά επίπεδα ιαμίας, ο μικρός χρόνος διάρκειάς της και το γεγονός ότι η συγκέντρωση RNA του ιού στο αίμα συνήθως είναι μειωμένη σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα πριν την εμφάνιση συμπτωμάτων, μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται για τον έλεγχο αίματος για μετάγγιση σε συνδιασμό, όμως, με τεχνικές ενίσχυσης του γονιδιώματος. Παραλλαγές της PCR που χαρακτηρίζονται από αυξημένη ευαισθησία, όπως η Nested PCR, αυξάνουν το ρίσκο ενίσχυσης μη ειδικού προϊόντος οδηγώντας σε ψευδώς θετικό αποτέλεσμα. Τέλος, το βασικό μειονέκτημα που δεν επιτρέπει τη διεξαγωγή της τεχνικής αυτής εκτός εργαστηρίου αποτελεί το υψηλό της κόστος, ο ειδικός εξοπλισμός και το κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό που απαιτεί (Barzon et al. 2015, Lustig et al. 2018, Shoba et al. 2016, De Filette et al 2012).

2.7.2 Καλλιέργεια του ιού σε κυτταρικές σειρές

Στη μέθοδο αυτή ποσότητα κλινικού δείγματος προστίθεται σε κατάλληλες κυτταρικές σειρές θηλαστικών ή κουνουπιών, πραγματοποιούνται αραιώσεις και ακολουθεί επώαση με την κυτταροπαθογόνο δράση του ιού να εμφανίζεται σε 2-7 μέρες ανάλογα τον τίτλο του. Συνεπώς, πρόκειται για μια χρονοβόρο μέθοδο σε σχέση με άλλες. Ένα ακόμη μειονέκτημα είναι ότι για την καλλιέργεια του ιού απαιτείται εργαστήριο επιπέδου βιοασφάλειας 3 και εξειδικευμένο προσωπικό με αποτέλεσμα να εφαρμόζεται μόνο σε εργαστήρια αναφοράς και ερευνητικά κέντρα (Barzon et al. 2015, Shoba et al. 2016).

2.7.3 Ανοσολογική μέθοδος

Η ανίχνευση αντισωμάτων έναντι του ιού του Δυτικού Νείλου σε ορό και εγκεφαλονωτιαίο υγρό μέσω ανοσοφθορίζουσών καθώς και ανοσοενζυμικών δοκιμασιών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη. Οι ανοσοσφαιρίνες M και G βρίσκονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα 4 και 8 μέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων αντίστοιχα και παραμένουν στον ορό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αυτό συνεπάγεται ότι ανίχνευσή τους στον ορό μπορεί να οφείλεται σε πρόσφατη ή παλαιότερη μόλυνση με την δοκιμασία αφθονίας των IgG να μην διευκρινίζει ποια περίπτωση ισχύει. Το πρόβλημα αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο σε περιοχές που ο ιός ανακυκλώνεται. Αντίθετα, η παρουσία IgM στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό συνιστά διαγνωστικό κριτήριο και υποδηλώνει πρόσφατη μόλυνση, καθώς IgM του αίματος δεν διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής που προκύπτει από τις συντηρημένες μεταξύ των φλαβοϊών δομικές πρωτεΐνες (κυρίως

Ε) είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις των αντισώματων έναντι ενός φλαβοϊού με τις δομικές πρωτεΐνες διαφορετικού φλαβοϊού οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Το πρόβλημα αυτό εντείνεται σε περιοχές που συνεντοπίζονται ο ιός του Δυτικού Νείλου, του Zika και Dengue, καθώς και σε περιπτώσεις ατόμων που έχουν εμβολιαστεί έναντι κάποιου φλαβοϊού λόγω της παρουσίας αντισωμάτων που μπορεί να εμπλακούν σε διασταυρούμενες αντιδράσεις (Barzon et al. 2015, Lustig et al. 2018, Shoba et al. 2016).

2.7.4 Οροεξουδετέρωση

Σε περιπτώσεις που το αποτέλεσμα με τις προαναφερθείσες ανοσοσολογικές μεθόδους είναι θετικό, αναγκαία κρίνεται η διεξαγωγή οροεξουδετέρωσης με την παρατήρηση σχηματισμού πλακών για να ελεγχθεί αν το αποτέλεσμα οφείλεται σε διασταυρούμενες αντιδράσεις αντισωμάτων των φλαβοϊών. Πιο συγκεκριμένα, κατά την δοκιμασία αυτή, προκειμένου να εκτιμηθεί η απόδοση εξουδετέρωσης αντισώματος-ιού, τα αντισώματα που περιέχονται στον ορό του ασθενή αντιδρούν εξειδικευμένα με τα σωματίδια στελεχών του ιού που καλλιεργούνται στο εργαστήριο εξουδετερώνοντας τα με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η μόλυνση των κυττάρων και επομένως να μην επάγεται ο σχηματισμός πλακών. Ωστόσο, ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν σε ασθενείς που η μόλυνση είναι σε τόσο αρχικό στάδιο που τα αντισώματα δεν έχουν παραχθεί ακόμη. Επιπλέον, η δοκιμασία οροεξουδετέρωσης παρέχει απάντηση σε τουλάχιστον 5 μέρες και συνεπώς πρόκειται για χρονοβόρα διαδικασία. Ακόμη ένα μειονέκτημα είναι ότι η χρήση κυτταροκαλιεργιών του ιού απαιτεί επίπεδο βιοασφάλειας 3, εξειδικευμένο προσωπικό και είναι εργαστηριακά έντονη (Barzon et al. 2015, Lustig et al. 2018, Shoba et al. 2016).

2.8 Επιλογή κλινικού δείγματος για μοριακή διάγνωση

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μοριακή μέθοδος διάγνωσης είναι η πλέον κατάλληλη με το κλινικό δείγμα που επιλέγεται να είναι μείζονος σημασίας, καθώς είναι αναγκαίο το RNA γονιδίωμα του ιού να μπορεί να απομονωθεί σε ποσότητα που να ανταποκρίνεται στην ευαισθησία της μεθόδου. Τα κλινικά δείγματα ασθενών προσβεβλημένων από τον ιό του Δυτικού Νείλου στα οποία έχει ανιχνευθεί το γονιδίωμά του είναι ολικό αίμα, ορός, πλάσμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και ούρα (Niedrig et al., 2018). Όσον αφορά στην ιαμμία του ιού, επιτυγχάνεται σε 2-3 μέρες και παραμένει για 8-10 μέρες σε ασυμπτωματικούς ανθρώπους και για περισσότερο σε συμπτωματικούς ασθενείς με όσους νοσήσουν από νευρολογικές ασθένειες να εμφανίζουν υψηλότερο ιικό φορτίο και παρατεταμένη ιαμμία. Για την ακρίβεια, σημαντική ποσότητα του ιού εντοπίζεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια με αποτέλεσμα το ιικό φορτίο να είναι υψηλότερο στο ολικό αίμα σε σχέση με το πλάσμα και να

παραμένει για αρκετούς μήνες (Barzon et al. 2015). Ακόμη, σε μελέτη (Lustig et al., 2016) έχει δειχθεί ότι το ιικό RNA ανιχνεύεται στο ολικό αίμα, το πλάσμα και τον ορό ασθενών με οξεία λοίμωξη σε ποσοστά 86,8%, 20% και 26% αντίστοιχα. Μέση τιμή του ιικού τίτλου σε συμπτωματικούς ασθενείς στο ολικό αίμα υπολογίζεται σε 550 αντίγραφα/ml, ενώ σε πλάσμα και ορό μπορεί και κάτω από 100 αντίγραφα/ml (Sambri, 2013). Σε ασυμπτωματικούς ασθενείς το ιικό φορτίο στο αίμα είναι σημαντικά πιο χαμηλό εκτιμώμενο ακόμη και 100 αντίγραφα/ml. Σχετικά με τα ούρα, η παρουσία του ιού στο κλινικό αυτό δείγμα είναι πιο συχνή σε συμπτωματικούς ασθενείς και ανιχνεύεται σε ποσοστό 58,3% με μέση τιμή ιικού φορτίου 1.100 αντίγραφα/ml. Επίσης, σε ασθενείς με οξεία λοίμωξη το ιικό φορτίο στα ούρα είναι υψηλότερο και μεγαλύτερης διάρκειας σε σύγκριση με το πλάσμα. Τέλος, στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με οξεία λοίμωξη ο ιός ανιχνεύτηκε σε ποσοστό 16,6% με τα αντίγραφα RNA ανά ml να υπολογίζονται κάτω από 100. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω συνάγεται το συμπέρασμα ότι το ολικό δείγμα αίματος είναι πιο κατάλληλο για την ανίχνευση του γονιδιώματος του ιού.

Όσον αφορά στα κλινικά δείγματα κορακοειδών, το ιικό φορτίο είναι σημαντικά υψηλότερο σε σχέση με τους ανθρώπους. Πιο συγκεκριμένα, μελέτη που διεξήχθη σε *Corvus corone*, μέλος της οικογένειας των κορακοειδών διαδεδομένο στην Ευρώπη, υπέδειξε ότι το ιικός τίτλος στο αίμα του πτηνών έπειτα από μόλυνση με το στέλεχος της Ελλάδας (GRE10) του ιού εκτιμάται στα $10^{10.3}$ αντίγραφα/ml. Βιοψία πτηνών που εμφάνισαν συμπτώματα αποκάλυψε ότι υψηλότερο ιικό φορτίο εντοπίζεται σε συκώτι, σπλήνα και μυελό των οστών (περίπου 10^9 - 10^{10} αντίγραφα/g), ακολουθούν νεφρά και καρδιά (περίπου 10^8 αντίγραφα/g), ενώ ο χαμηλότερος τίτλος εντοπίζεται στον εγκέφαλο (περίπου 10^7 αντίγραφα/g). Σε πτηνά που δεν εμφάνισαν συμπτώματα ο ιικός τίτλος είναι λίγο χαμηλότερος στα όργανα που αναφέρθηκαν (Lim et al, 2015). Επιπλέον, μελέτη σε πτώματα κορακοειδών υπέδειξε ότι το γονιδίωμα του ιού είναι ανιχνεύσιμο σε περιπτώματα καθώς και σε φτερά σε ακόμη υψηλότερη ποσότητα (Docherty, 2004).

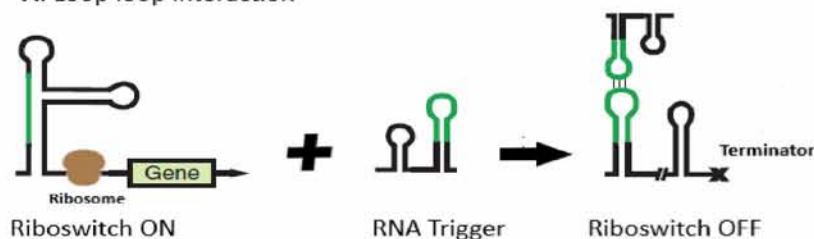
Κεφάλαιο 3: Ριβοδιακόπτης Toehold

3.1 Ριβοδιακόπτες στη φύση και τη συνθετική βιολογία

Τα μη κωδικοποιητικά RNA συμμετέχουν στη ρύθμιση ποικίλων κυτταρικών διαδικασιών με τη δομή τους να καθορίζει τη λειτουργία τους. Μια ιδιαίτερη κατηγορία μη κωδικοποιητικών RNA αποτελούν οι ριβοδιακόπτες που στη φύση εντοπίζονται συνήθως στο 5' άκρο των mRNA των κυττάρων και ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση ανταποκρινόμενα στα επίπεδα μεταβολιτών, θερμοκρασίας ή pH λειτουργώντας ως αισθητήρες. Η άμεση αλληλεπίδραση των ριβοδιακοπών με τους μεταβολίτες χωρίς την απαίτηση ενδιάμεσων παραγόντων υποδεικνύει ότι πρόκειται για έναν από τους παλαιότερους ρυθμιστικούς μηχανισμούς του κυττάρου (Sinumvayo et al., 2018).

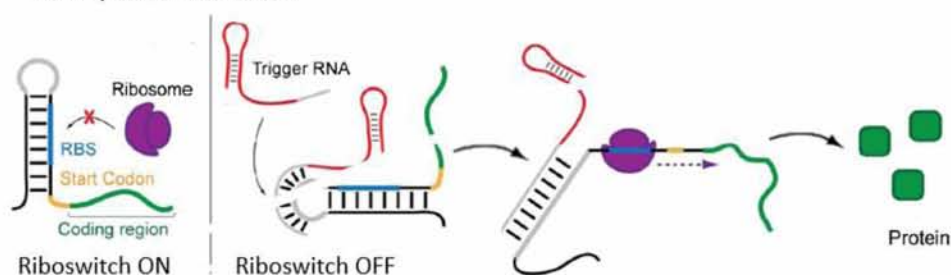
Στο τομέα της συνθετικής βιολογίας, οι συνθετικοί ριβοδιακόπτες έχουν συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον και θεωρούνται ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο με εφαρμογές σε ποικίλα πεδία συμπεριλαμβανομένης της διάγνωσης (Rossetti et al., 2019). Όσον αφορά στον σχεδιασμό των συνθετικών ριβοδιακοπών, ένας ριβοδιακόπτης συγκροτείται από 1 ζεύγος αλληλουχιών RNA: μια αλυσίδα μεταγωγέα με δευτεροταγή δομή που ρυθμίζει την μεταγραφή ή την μετάφραση και μια αλυσίδα που είναι συμπληρωματική με τμήμα του μεταγωγέα. Η αλυσίδα αυτή αλληλεπιδρά *in trans* με τον μεταγωγέα με αποτέλεσμα να μεταβάλλει την διαμόρφωσή του, μεταπίπτοντας συνήθως από την ανενεργή στην βιολογικά ενεργή κατάσταση. Στην αρχική αυτή RNA-RNA αλληλεπίδραση βασίζεται η κατηγοριοποίηση των συνθετικών ριβοδιακοπών σε αλληλεπιδράσεις θηλιάς-θηλιάς, με τις θηλιές του ζεύγους RNA να υβριδίζουν μεταξύ τους, και θηλιάς-γραμμής, με τη δομή θηλιάς να υβριδίζει με γραμμικό RNA, και αλληλεπιδράσεις μεταξύ γραμμικών τμημάτων RNA (Εικόνα 7)(Green et al., 2014). Η κατηγορία των συνθετικών ριβοδιακοπών που θα αναλυθεί παρακάτω είναι οι μεταφραστικοί toehold ριβοδιακόπτες.

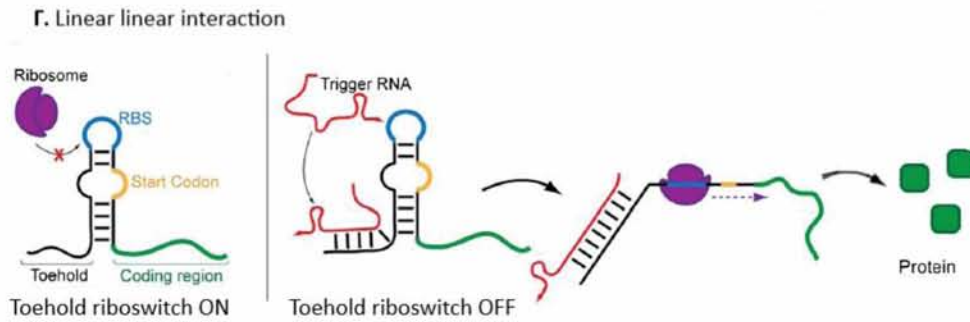
A. Loop loop interaction



Τροποποίηση από Takahashi, M. K., & Lucks, J. B. (2013). A modular strategy for engineering orthogonal chimeric RNA transcription regulators. *Nucleic acids research*, 41(15), 7577–7588.

B. Loop linear interaction





Rossetti M, Del Grosso E, Ranallo S, et al. Programmable RNA-based systems for sensing and diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chem.* 2019;411(19):4293-4302.

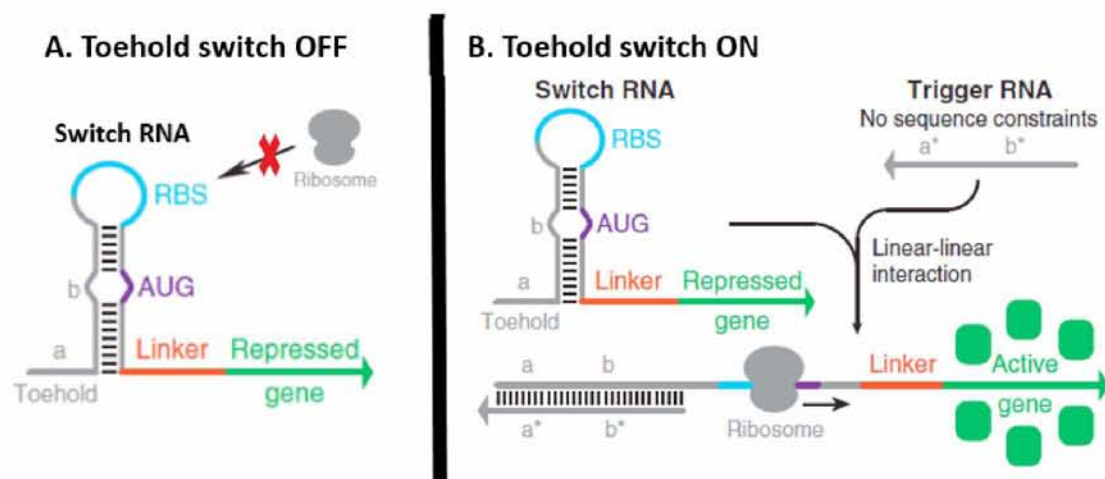
Εικόνα 7: Κατηγοριοποίηση των ριβοδιακοπών με κριτήριο την αρχική υβριδοποίηση με την RNA αλυσίδα του σηματοδότη. Α) Αλληλεπίδραση θηλιάς-θηλιάς : Η αρχική υβριδοποίηση πραγματοποιείται μεταξύ θηλιών διακόπτη και σηματοδότη. Β) Η αλληλεπίδραση θηλιάς- γραμμής: Η αρχική υβριδοποίηση πραγματοποιείται μεταξύ της θηλιάς του διακόπτη και της γραμμικής αλυσίδας του σηματοδότη. Γ) Αλληλεπίδραση γραμμής- γραμμής : Η αρχική υβριδοποίηση πραγματοποιείται μεταξύ γραμμικών τμημάτων των αλυσίδων διακόπτη και σηματοδότη. Ο τύπος αυτός αλληλεπίδρασης συναντάται αποκλειστικά στους toehold ριβοδιακόπτες (Green et al., 2014).

3.2 Δομή και λειτουργία συνθετικών ριβοδιακοπών toehold

Το σύστημα του ριβοδιακόπτη toehold αποτελείται από 2 αλυσίδες RNA με την μια αλυσίδα να λειτουργεί ως διακόπτης και η άλλη ως σηματοδότης. Σχετικά με την δομή της αλυσίδας διακόπτη, το 5' άκρο είναι γραμμικό και συμπληρωματικό με την αλληλουχία σηματοδότη. Ακολουθεί η δομή φουρκέτας στην θηλιά της οποίας εντοπίζεται η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος με το κωδικόνιο έναρξης να βρίσκεται καθοδικά της στο δίκλωνο τμήμα της φουρκέτας χωρίς να υβριδίζει ενδομοριακά. Καθοδικά της θηλιάς εντοπίζεται η κωδική περιοχή ενός γονιδίου αναφοράς, τη μετάφραση και κατά επέκταση την έκφραση του οποίου ρυθμίζει ο διακόπτης. Μεταξύ της δομής φουρκέτας και της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου παρεμβάλλεται η περιοχή του συνδέτη που κωδικοποιεί για αμινοξέα χαμηλού μοριακού βάρους που προστίθενται στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης του γονιδίου αναφοράς χωρίς να επηρεάζουν τη λειτουργία της. Όσον αφορά στην αλυσίδα σηματοδότη, δεν φέρει δευτεροταγή δομή και είναι συμπληρωματική με περιοχή της αλυσίδας του διακόπτη που εκτείνεται από το 5' άκρο μέχρι την αρχή της θηλιάς χωρίς να περιλαμβάνεται η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος (Green et al., 2014).

Ο διακόπτης μπορεί να βρίσκεται στην βιολογικά ενεργή ή ανενεργή του διαμόρφωση, παράγοντας ή όχι την πρωτεΐνη του γονιδίου αναφοράς αντίστοιχα ανάλογα με την παρουσία και άρα υβριδισμό του σηματοδότη στην συμπληρωματική περιοχή. Απουσία, λοιπόν, ενός ενεργοποιητή ο διακόπτης παραμένει σε μια κλειστή διαμόρφωση αποτρέποντας την πρόσδεση του ριβοσώματος και άρα την παραγωγή πρωτεΐνης από το γονίδιο αναφοράς (Εικόνα 8Α). Αντίθετα, παρουσία της αλυσίδας

σηματοδότη, η δομή φουρκέτας παύει να υφίσταται με αποτέλεσμα ο διακόπτης να έχει γραμμική διαμόρφωση. Αυτό συμβαίνει, καθώς η αλληλουχία του σηματοδότη υβριδίζει με την συμπληρωματική της αλληλουχία στην αλυσίδα του διακόπτη που συμπεριλαμβάνει μέρος της φουρκέτας εκτοπίζοντας την περιοχή της αλληλουχίας που σχηματίζει το δίκλωνο τμήμα της φουρκέτας. Στην γραμμική διαμόρφωση αποκαλύπτονται η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος και το κωδικόνιο έναρξης στο ριβόσωμα με αποτέλεσμα το τελευταίο να προσδέεται στο RNA του διακόπτη και να πραγματοποιεί τη μετάφραση του γονιδίου αναφοράς, καθιστώντας έτσι τον διακόπτη βιολογικά ενεργό (Εικόνα 8B). Μάλιστα η κατασκευή πρότυπης καμπύλης για το γονίδιο αναφοράς επιτρέπει τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του σηματοδότη στο εξεταζόμενο δείγμα (Green et al., 2014).



Τροποποίηση από Green Alexander A. et al., (2014), Toehold switches: de novo-designed regulators of gene expression, *Cell*, 159, 925–939.

Εικόνα 8: Δομή του ριβοδιακόπτη toehold σε κλειστή και ανοιχτή κατάσταση. Τα γκρι τμήματα αντιστοιχούν στις μεταβλητές περιοχές που είναι συμπληρωματικές με τον εκάστοτε RNA-σηματοδότη, το γαλάζιο τμήμα στην αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος, το μωβ στο κωδικόνιο έναρξης AUG, το πορτοκαλί τμήμα στην αλληλουχία σύνδεσης και το πράσινο στο γονίδιο αναφοράς που κωδικοποιείται. Α) Λόγω της ενσωμάτωσης της αλληλουχίας πρόσδεσης του ριβοσώματος και το κωδικονίου στην φουρκέτα του ριβοδιακόπτη toehold, το ριβόσωμα δεν μπορεί να προσδεθεί με αποτέλεσμα να μην μεταφράζεται το γονίδιο αναφοράς και ο διακόπτης να είναι κλειστός. Β) Οι γραμμικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις συμπληρωματικές περιοχές RNA-σηματοδότη και διακόπτη οδηγούν στην κατάρρευση της φουρκέτας και πρόσδεση του ριβοσώματος με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του διακόπτη.

3.3 Σύγκριση toehold με προηγούμενους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες

Οι toehold φέρουν ορισμένα χαρακτηριστικά που τους προσδίδουν πλεονεκτήματα έναντι μεταφραστικών διακοπών προηγούμενης γενιάς. Πιο συγκεκριμένα, στην φύση δεν συναντώνται αντίστοιχοι ριβοδιακόπτες με τους toehold εξασφαλίζοντας την ορθογονικότητα του συστήματος. Ο όρος αυτός σημαίνει ότι το συνθετικό σύστημα δεν αλληλεπιδρά με αντίστοιχα συστήματα της φύσης. Επομένως, δεν τίθεται περιορισμός στον σχεδιασμό των αλληλουχιών του συγκεκριμένου τύπου

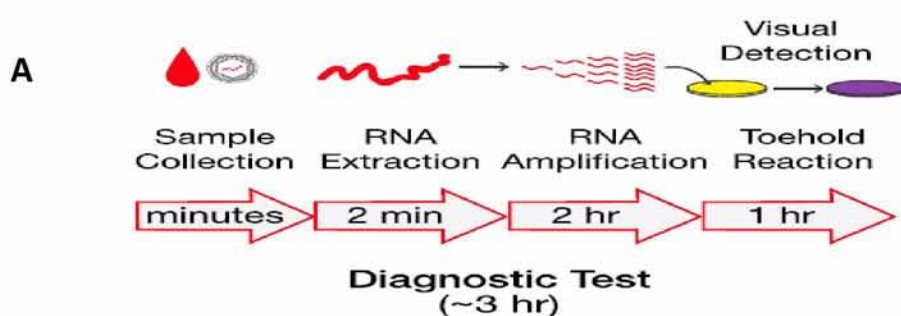
διακοπών για τη διασφάλιση της ορθογονικότητας. Επίσης, οι μεταφραστικοί ριβοδιακόπτες προηγούμενης γενιάς (Εικόνα 8B) φέρουν την αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος στο δίκλωνο τμήμα της δομής φουρκέτας με αποτέλεσμα την υποχρεωτική συντήρηση της στην αλυσίδα-σηματοδότη ώστε να είναι συμπληρωματική με τον διακόπτη. Στους toehold, όμως, δεν υφίσταται ο περιορισμός αυτός, αφού η αλληλουχία πρόσδεσης του ριβοσώματος περιέχεται στην θηλιά επιτρέποντας τον ανεξάρτητο σχεδιασμό της αλυσίδα-σηματοδότη. Ακόμη, η αρχική αλληλεπίδραση σηματοδότη-διακόπτη για την ενεργοποίηση του συστήματος πραγματοποιείται ανάμεσα σε γραμμικά τμήματα RNA σε αντιδιαστολή με τους άλλους ριβοδιακόπτες που οι αλληλεπιδράσεις είναι θηλιάς-θηλιάς ή θηλιάς-γραμμής (Εικόνα 8A –B). Καθώς οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε γραμμικά τμήματα RNA ευνοούνται περισσότερο από άποψη κινητικής και θερμοδυναμικής, η ενεργοποίηση των toehold ριβοδιακοπών επιτυγχάνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό. Επιπλέον, οι toehold επιδεικνύουν εξαιρετικά υψηλότερο δυναμικό εύρος του σήματος που παράγουν και μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τους προηγούμενους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες. Συμπερασματικά, τα χαρακτηριστικά αυτά των toehold ριβοδιακοπών τους καθιστούν αποδοτικότερους (Green et al., 2014).

3.4 Toehold ριβοδιακόπτες στη μοριακή διάγνωση: Εφαρμογή ιού Zika

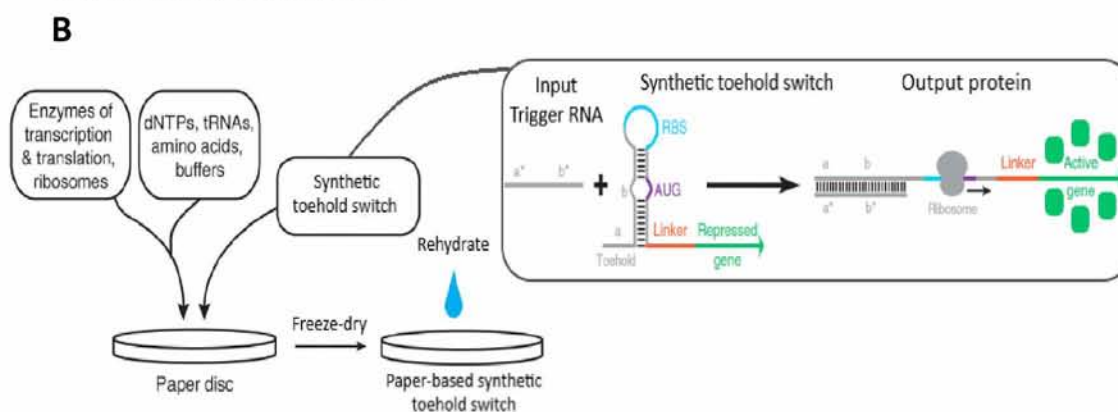
Ένα πεδίο εφαρμογής των toehold ριβοδιακοπών είναι η μοριακή διάγνωση με το νουκλεϊκό οξύ του κλινικού δείγματος που επιδιώκεται να ανιχνευτεί να λειτουργεί ως το σήμα που θα ενεργοποιήσει τους διακόπτες. Έχει δειχθεί ότι ως αλληλουχία σηματοδότη μπορεί να λειτουργήσει το mRNA καθώς και γονιδιώματα ιών (Green et al., 2014). Μάλιστα το 2016 ο Pardee και η ομάδα του αξιοποίησαν τους toehold ριβοδιακόπτες στη δημιουργία διαγνωστικού τεστ για την ανίχνευση του ιού Zika. Πιο συγκεκριμένα, πρώτο βήμα του διαγνωστικού τεστ αποτελεί η εκχύλιση RNA από κλινικό δείγμα αίματος που στη συνέχεια υφίσταται ενίσχυση του γονιδιώματος του ιού μέσω NASBA. Τελευταίο βήμα αποτελεί η επώαση του δείγματος με τον toehold ριβοδιακόπτη ο οποίος κωδικοποιεί για την β-γαλακτοζιδάση που καταλύει τη μετατροπή του κίτρινου υποστρώματος σε μωβ προϊόν (Εικόνα 9A). Πρόκειται, λοιπόν, για μια μέθοδο που παρέχει αποτελέσματα σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ χάρη στην εξειδίκευση της αλληλουχίας του διακόπτη για το γονιδίωμα του Zika δεν υφίσταται πλέον ο κίνδυνος ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω της παρουσίας συγγενικών φλαβοϊών στο κλινικό δείγμα (Pardee et al., 2016).

Στο διαγνωστικό τεστ εφαρμόστηκε και μια πλατφόρμα έκφρασης πρωτεϊνών ενσωματωμένη σε χαρτί απουσία κυττάρων που περιγράφηκε από τον Pardee και την ομάδα του το 2014. Πρόκειται για μια τεχνολογία πολλά υποσχόμενη με τη δυνατότητα να υποστηρίξει συνθετικά δίκτυα γονιδίων. Όσον αφορά στην αρχή λειτουργίας της, ριβοδιακόπτες, ριβοσώματα, ένζυμα απαραίτητα για τη μεταγραφή και μετάφραση και συστατικά που χρειάζονται για την μετάφραση ενσωματώνονται

σε λυοφιλιωμένη μορφή σε χαρτί ή άλλο πορώδες υλικό. Πρόκειται, λοιπόν, για ένα αποστερωμένο σύστημα ελεύθερο από βακτηριακά κύτταρα που μπορεί να διεκπεραιώσει *in vitro* τις διαδικασίες της μεταγραφής και μετάφρασης. Όντας σταθερό το σύστημα σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να αποθηκευτεί και να διανεμηθεί με ευκολία, ενώ για την ανασύστασή του απαιτείται μόνο η προσθήκη νερού (Εικόνα 9B). Η αξιοποίηση της τεχνολογίας αυτής εξασφάλισε στη διαγνωστική αυτή μέθοδο χαμηλό κόστος, απλότητα στη χρήση, ενώ κατήργησε την ανάγκη για ακριβό εξοπλισμό. Η απουσία κυττάρων από το σύστημα προσέδωσε ασφάλεια για χρήση έξω από το εργαστήριο. Λόγω των χαρακτηριστικών αυτών, κατέστη δυνατή η εφαρμογή του διαγνωστικού αυτού τεστ για τον Ζίκα στο πεδίο (Pardee et al., 2014) (Tinafar, 2019).



Pardee K. et al, (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266



Τροποποίηση από Green Alexander A. et al., (2014), Toehold switches: de novo-designed regulators of gene expression, *Cell*, 159, 925–939. και Pardee K. et al., (2014), Paper-based synthetic gene networks, *Cell*, 159, 940–954.

Εικόνα 9: Διαγνωστικό τεστ για την ανίχνευση του Ζίκα βασισμένο σε συνθετικό ριβοδιακόπτη. Α) Βήματα για τη διεξαγωγή του διαγνωστικού τεστ. Β) Η διαγνωστική μέθοδος βασίζεται στην ενσωμάτωση του toehold ριβοδιακόπτη υπό λυοφιλιωμένη μορφή σε χαρτί με σύστημα για *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση. (Tinafar, 2019)

3.5 Σύγκριση ριβοδιακοπών toehold με τις υπάρχουσες διαγνωστικές μεθόδους για τον ιό του Δυτικού Νείλου

Αντίστοιχο με το διαγνωστικό τεστ για την ανίχνευση του Zika (Pardee et al., 2016) θα μπορούσε να σχεδιαστεί και για τον ιό του Δυτικού Νείλου με το σύστημα ριβοδιακόπτη toehold να υπερτερεί έναντι των υπάρχουσών μεθόδων διάγνωσης του ιού. Πιο συγκεκριμένα, όπως προαναφέρθηκε στην ενότητα 2.6, μείζον πρόβλημα που έχει προκύψει στην οροεξουδετέρωση και στις ανοσολογικές μεθόδους διάγνωσης που εφαρμόζονται είναι οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με τους ιούς Dengue και Zika λόγω της υψηλής ομοιότητας τους οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Στους ριβοδιακόπτες, όμως, το πρόβλημα αυτό δεν υφίσταται, αφού η αλληλουχία του διακόπτη που υβριδίζει με το τμήμα του γονιδιώματος που λειτουργεί ως σηματοδότης μπορεί να σχεδιαστεί ώστε να είναι εξειδικευμένη για τον ιό του Δυτικού Νείλου. Επιπλέον, εφόσον δεν χρειάζεται καλλιέργεια του ιού δεν απαιτείται επίπεδο βιοασφάλειας 3, πράγμα που συνεπάγεται μειωμένο κόστος, χωρίς την ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού και με λιγότερες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό. Επίσης, σε σχέση με τις μεθόδους αυτές, παρέχει σύντομα αποτελέσματα (Barzon et al. 2015, Lustig et al. 2018, Rossetti Marianna et al. 2019, Shoba et al. 2016).

3.6 Γονίδια αναφοράς στους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες

Η επιλογή του γονιδίου αναφοράς είναι αρκετά σημαντική στους ριβοδιακόπτες, καθώς με βάση την ένταση του σήματος της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί και την κατάλληλη πρότυπη καμπύλη προσδιορίζεται το ικό φορτίο του κλινικού δείγματος. Ως γονίδια αναφοράς χρησιμοποιούνται κυρίως ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις που οδηγούν στη παραγωγή έγχρωμου προϊόντος ή προϊόντος που φθορίζει και οι ίδιες οι φθορίζουσες πρωτεΐνες. Ενδεικτικά στα ένζυμα που χρησιμοποιούνται ως γονίδια αναφοράς συγκαταλέγονται η β-γαλακτοζιδάση και η β-λακταμάση. Η β-γαλακτοζιδάση καταλύει τη μετατροπή του ερυθρού της χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης, ενός κίτρινου υποστρώματος, σε μωβ προϊόν, το ερυθρό της φαινόλης. Η β-λακταμάση καταλύει την υδρόλυση του δακτυλίου της β-λακτάμης με αποτέλεσμα το σχηματισμό μωβ προϊόντος από κίτρινο υπόστρωμα (συνήθως νιτροκεσίνη). Πλεονεκτήματα των αντιδράσεων αυτών είναι ότι η αλλαγή του χρώματος είναι ορατή με γυμνό μάτι, ενώ η φωτομέτρηση για τη ποσοτικοποίηση της έντασης γίνεται με οικονομικό εξοπλισμό. Επιπλέον, η ενίσχυση του σήματος από το ένζυμο συνεπάγεται αύξηση της ευαισθησίας του συστήματος του ριβοδιακόπτη. Μειονέκτημα των ενζυμικών γονιδίων αναφοράς αποτελεί η απαίτηση για υπόστρωμα και συμπράγοντες για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων (Jiang et al, 2008).

Σχετικά με τις φθορίζουσες πρωτεΐνες, ευρέως χρησιμοποιείται η πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (GFP), η κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry καθώς και η κίτρινη και μπλε φθορίζουσες πρωτεΐνες με το σήμα του φθορισμού να είναι γραμμικά ανάλογο με τη ποσότητα του σηματοδότη. Η παρατήρηση των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι είναι δυνατή με γυμνό μάτι, αλλά απαιτείται πηγή εκπομπής φωτός για τη διέγερση του φθορισμού, πράγμα που συνεπάγεται πιο ακριβό εξοπλισμό. Επιπλέον μειονέκτημα της κατηγορίας αυτής γονιδίων αναφοράς αποτελεί το γεγονός ότι, σε αντιδιαστολή με τα ένζυμα, το σήμα που παράγεται από τον ριβοδιακόπτη δεν ενισχύεται με αποτέλεσμα την μειωμένη ευαισθησία του συστήματος. Από την άλλη πλευρά, οι φθορίζουσες πρωτεΐνες πλεονεκτούν έναντι των ενζύμων ως προς το ότι δεν χρειάζονται υπόστρωμα και συμπαραγοντες, ενώ είναι ανθεκτικές στη θερμότητα, στις αλκαλικές διακυμάνσεις του pH, στα χαοτροπικά άλατα και στους οργανικούς διαλύτες (Close et, 2009) (Jiang et al, 2008).

Κεφάλαιο 4: Σκοπός πτυχιακής εργασίας

Συνοψίζοντας, η ευρεία γεωγραφική κατανομή, ο ενδοζωικός κύκλος μετάδοσης που ευνοεί την διάδοση του καθώς και η παθογόνος δράση που εμφανίζει καθιστούν τον ιό του Δυτικού Νείλου σοβαρή απειλή για την δημόσια υγεία. Ακόμη, η απουσία εμβολίου και κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής για την αντιμετώπιση των λοιμώξεων που προκαλεί ο ιός, εντείνουν την ανάγκη για περιορισμό της μετάδοσης του. Συνεπώς, απαραίτητη κρίνεται η παρακολούθηση του ιού του Δυτικού Νείλου σε πληθυσμούς πτηνών που λειτουργούν ως δεξαμενές του ιού ώστε να εκτιμηθεί ο κίνδυνος για μελλοντικές εξάρσεις και να αποτραπούν με τη χρήση μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού των κουνουπιών. Επίσης, μείζονος σημασίας για το προσδιορισμό της επιδημιολογίας του ιού είναι και δειγματοληψίες πεδίου σε ευρεία κλίμακα στο κοινωνικό σύνολο με σκοπό καταγραφή των κρουσμάτων, η οποία επί του παρόντος έχει περιοριστεί μόνο στους συμπτωματικούς. Επιπλέον, εφόσον ο ιός είναι δυνατόν να μεταδοθεί μέσω μετάγγισης αίματος είναι απαραίτητος ο έλεγχος του αίματος των δωρητών ιδιαίτερα σε περιοχές που ενδημεί ο ιός (Sejvar 2016, Lustig et al. 2018). Ωστόσο, η διεξαγωγή των ενεργειών αυτών προϋποθέτει την ύπαρξη μιας διαγνωστικής μεθόδου που αφενός να παράγει αξιόπιστα και γρήγορα αποτελέσματα χωρίς να είναι εργαστηριακά απαιτητική, αφετέρου να είναι οικονομική επιτρέποντας την μαζική εφαρμογή της εκτός εργαστηρίου. Όμως, καμία από τις διαγνωστικές μεθόδους που χρησιμοποιείται σήμερα δεν συγκεντρώνει όλα αυτά τα χαρακτηριστικά με αποτέλεσμα την ελλιπή παρακολούθηση και καταγραφή των κρουσμάτων υποτιμώντας την επιδημιολογία του ιού.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην ανάπτυξη μιας μοριακής μεθόδου διάγνωσης του ιού του Δυτικού Νείλου με τη χρήση συνθετικών ριβοδιακοπών για την κάλυψη του κενού της πλημμελούς παρακολούθησης του ιού. Αυτό σημαίνει ότι το διαγνωστικό αυτό τεστ είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να είναι οικονομικό, αξιόπιστο, γρήγορο, εύκολο στη χρήση και να μην απαιτεί ειδικό εργαστηριακό εξοπλισμό. Επομένως, θα μπορούσε να εφαρμοστεί εκτός εργαστηρίου σε ανθρώπους ακόμη και σε υπανάπτυκτες χώρες καθώς και σε δειγματοληψίες σε πληθυσμούς πτηνών. Επιπλέον, οι toehold ριβοδιακόπτες έχουν σχεδιαστεί με γνώμονα να υβριδίζουν με εξειδικευμένο τμήμα της αλληλουχίας του RNA γονιδιώματος του ιού ώστε να ενεργοποιούνται αποκλειστικά παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου.

Στο πλαίσιο αυτό, λοιπόν, πειραματικά δημιουργήθηκαν και ελέχθηκαν για την απόδοση τους 5 υποψήφιοι toehold ριβοδιακόπτες με γονίδιο αναφοράς την ενισχυμένη πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (eGFP), μετάλλαγμα της GFP. Η πρωτεΐνη αυτή επιλέχθηκε καθώς είναι ανθεκτική σε θερμότητα, αλκαλικές διακυμάνσεις pH, χαοτροπικά άλατα, οργανικούς διαλύτες, δεν χρειάζεται υποστρώματα και συμπαραγοντες, ενώ είναι πιο σταθερή και το σήμα φθορισμού της είναι 35 φορές πιο ισχυρό σε σχέση με την GFP (Stepanenko et al, 2008). Επιπλέον, έγινε απομόνωση του γονιδίου της β-λακταμάσης ώστε στο μέλλον να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς σε toehold ριβοδιακόπτες έπειτα από επιτυχή κλωνοποίηση σε

πλασμιδιακούς φορείς. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν qPCR σε δείγματα ιών Zika, Dengue και του Δυτικού Νείλου στα πλαίσια της συγκρότησης ενός εργαλείου που να δύναται να επιβεβαιώνει και να υπολογίζει τον ιικό τίτλο σε κάθε δείγμα.

Κεφάλαιο 5: Υλικά και μέθοδοι

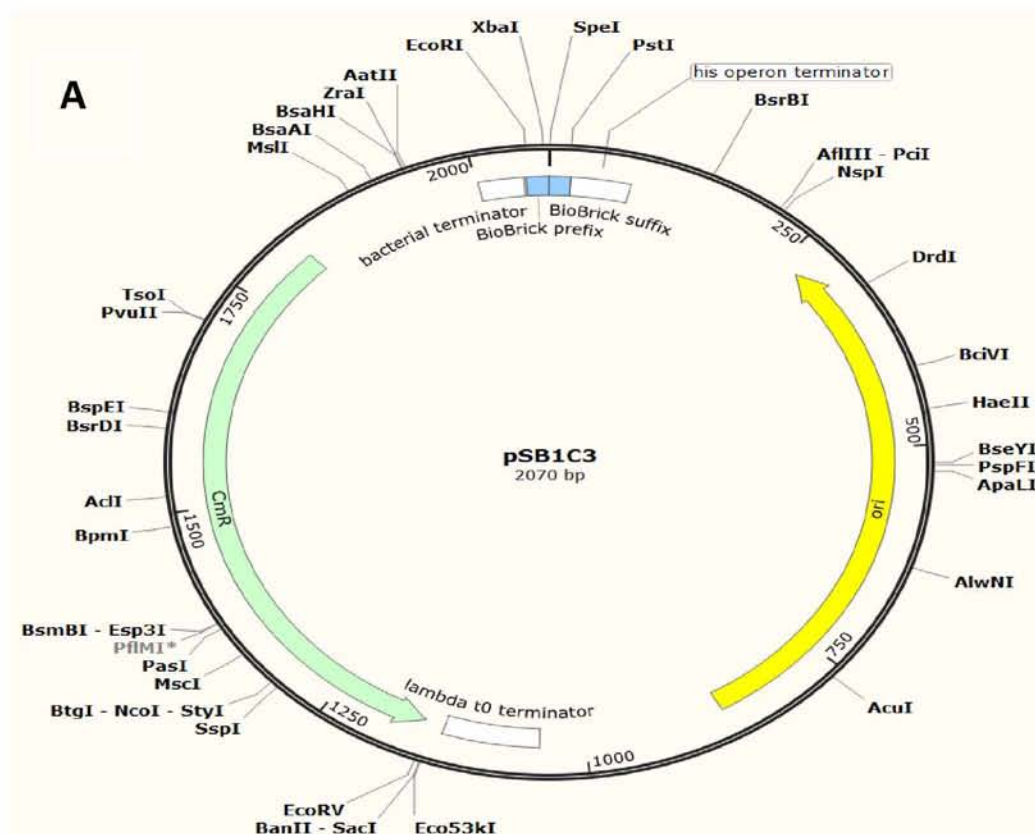
5.1 Υλικά

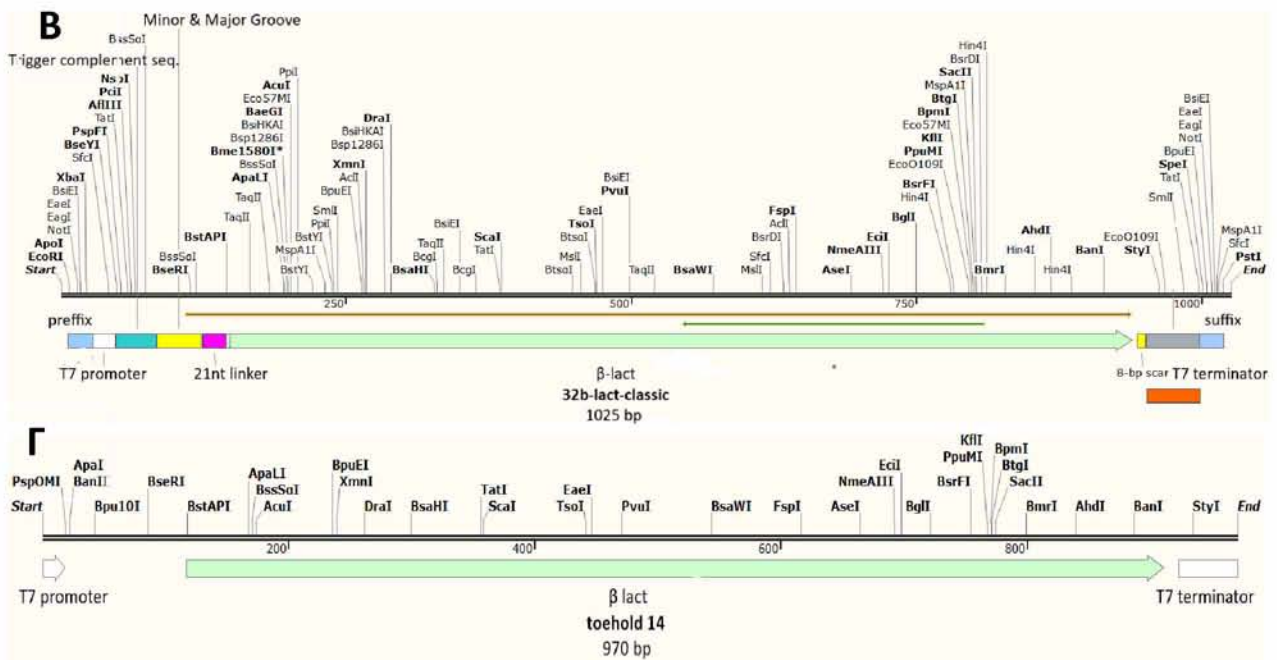
5.1.1 Δείγματα ιών Δυτικού Νείλου, Zika και Dengue

Στο εργαστήριο παραχωρήθηκαν RNA κλινικά δείγματα αίματος και ούρων του Ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 από το Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο της Θεσσαλονίκης. Επίσης, υπήρχαν διαθέσιμα RNA κλινικό δείγμα ούρων του ιού Zika και RNA κλινικό δείγμα αίματος για τον ιό Dengue. Τέλος, αξιοποιήθηκαν και RNA δείγματα κυτταροκαλλιέργειας του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 1 και 2.

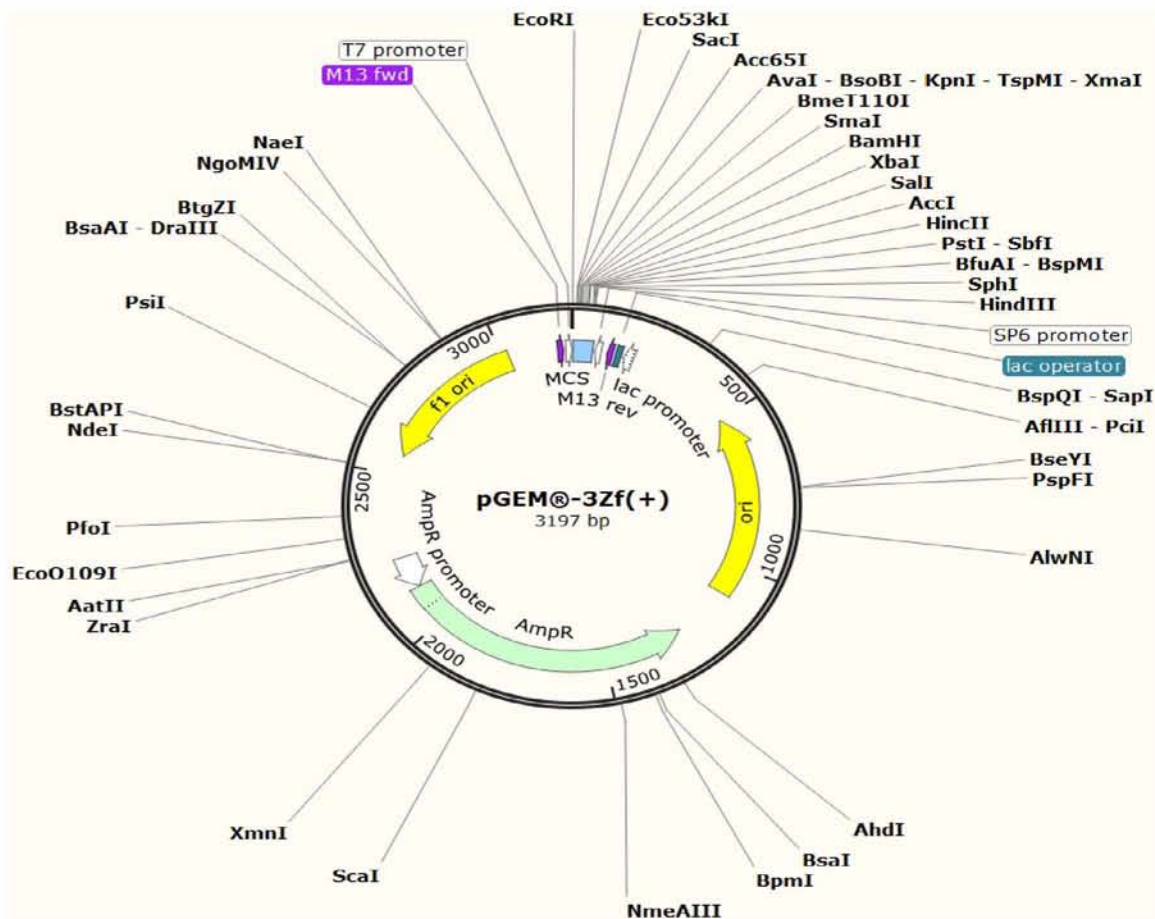
5.1.2 Πλασμίδια

Από την ομάδα iGEM 2019 του Τμήματος παραχωρήθηκαν κύτταρα *E. coli* μετασηματισμένων με τα ανασυνδιασμένα πλασμίδια 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 PSB1C3 στα οποία είχε ενσωματωθεί η αλληλουχία της β-λακταμάσης μεταξύ των τμημάτων prefix-suffix. Επιπλέον, υπήρχαν διαθέσιμα κύτταρα *E. coli* με ενσωματωμένη την αλληλουχία του eGFP σε πλασμιδιακό φορέα έκφρασης ριβοδιακοπών.





Εικόνα 10: Α) Χάρτης του πλασμιδίου pSB1C3. Β) Χάρτης ενθέματος 32b lact classic που έχει ενσωματωθεί μεταξύ των τμημάτων prefix και suffix του φορέα pSB1C3. Γ) Χάρτης ενθέματος toehold 14 που έχει ενσωματωθεί μεταξύ των τμημάτων prefix και suffix του φορέα pSB1C3.



Εικόνα 11: Χάρτης του πλασμιδίου pGEM.

5.1.3 Ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες NotI HF, ScalI, Kpn I, η λιγάση T4 καθώς και οι πολυμεράσες Q5 και KAPA Taq που χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάζονται από την εταιρία New England Biolabs.

5.2 Κλωνοποίηση β-λακταμάσης

5.2.1 Απομόνωση πλασμιδίων 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 (4) pSB1C3 από βακτηριακό στοκ *E.coli* DH5α.

Αφού είχε προηγηθεί δημιουργία αμιγούς καλλιέργειας από τρυβλία με LB άγαρ και χλωραμφαινικόλη με τη μέθοδο streak plate από τα βακτηριακά στοκ 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 (4) pSB1C3 *E.coli* DH5α, απομόνωση αποικίας και 5 ml υγρής καλλιέργειας, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των πλασμιδίων με πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο. Πιο συγκεκριμένα, φυγοκεντρήθηκε η ποσότητα των υγρών καλλιιεργειών για 2 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4°C και απορρίφθηκε το υπερκείμενο. Ακολούθησε προσθήκη σε κάθε δείγμα 100 μl κρύου διαλύματος I [50mM Tris, 10mM EDTA, 100ug/ml RNaseA] και ανάδευση σε Vortex μέχρι να διαλυθεί η πελλέτα που σχηματίστηκε. Έπειτα, προστέθηκε 200 μl διαλύματος II [1% SDS που προστέθηκε τελευταία στιγμή, 0.2M NaOH], ακολούθησε ελάφρια ανάμειξη (x5) και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, έγινε προσθήκη 150 μl κρύου διαλύματος III [3.0M potassium Asc, pH 5.5], ελαφριά ανάμειξη και επώαση για 5 λεπτά σε πάγο. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4°C, ανάκτηση του υπερκειμένου, προσθήκη 1 ml αιθανόλης και ανάδευση. Τα δείγματα επώαστηκαν για 20 λεπτά στους -80°C και ύστερα φυγοκεντρήθηκαν για 20 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4°C, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl 70% αιθανόλη. Πραγματοποιήθηκε ξανά φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 12.000 rpm στους 4°C. Απομακρύνθηκε προσεκτικά η ποσότητα αιθανόλης από κάθε δείγμα με πιπέτα χωρίς να διαταραχθεί η πελλέτα και αφήνονται τα tube με ανοιχτά καπάκια για περίπου 15 λεπτά ώστε να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης. Τέλος, η πελλέτα επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 100 μl H₂O και ακολούθησε επώαση για 5 λεπτά στους 65°C και vortex.

5.2.2 Ενίσχυση του γονιδίου β-λακταμάσης από τα πλασμίδια 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 (4) pSB1C3 με PCR

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με την πολυμεράση χαμηλής πιστότητας KAPA taq ώστε να επαληθευτεί με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος PCR ότι όντως ενισχύθηκε η β-λακταμάση. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 1 μl dNTPs, 2 μl μείγματος των εκκινητών που υβριδίζουν σε 5' και 3' άκρα του γονιδίου της β-λακταμάσης, 2,5 μl KAPA buffer, 0,25 μl KAPA taq, περίπου 3,3 ng του εκάστοτε πλασμιδίου και H₂O μέχρι να επιτευχθεί τελικός όγκος

25 μ l. Το πρωτόκολλο της δοκιμαστικής PCR με Taq πολυμεράση που πραγματοποιήθηκε είναι το εξής:

1. 95°C, 3:00
 2. 95°C, 0:20
 3. 60°C, 0:20
 4. 72°C, 0:50
 5. 72°C, 1:00
 6. 12°C, ∞
- } X 36 κύκλοι

Στη συνέχεια, διεξήχθει αντίδραση PCR με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5 στο πλασμίδιο 32b b-lact pSB1C3 ώστε μετέπειτα να ηλεκτροφορηθεί το προϊόν της PCR, να απομονωθεί και να καθαριστεί από τη γέλη ηλεκτροφόρησης. Πιο συγκεκριμένα, για κάθε αντίδραση παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 1 μ l dNTPs, 5 μ l μείγματος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παραπάνω, 10 μ l 5X buffer, 0,25 μ l Q5, περίπου 33 ng πλασμιδίου και H₂O μέχρι να επιτευχθεί τελικός όγκος 50 μ l. Το πρωτόκολλο της PCR που πραγματοποιήθηκε είναι το εξής:

1. 98°C, 3:00
 2. 98°C, 0:20
 3. 60°C, 0:20
 4. 72°C, 0:35
 5. 72°C, 2:00
 6. 12°C, ∞
- } X 37 κύκλοι

5.2.3 Απομόνωση και καθαρισμός της β-λακταμάσης από γέλη ηλεκτροφόρησης

Το προϊόν της αντίδρασης PCR με την πολυμεράση Q5 ηλεκτροφορήθηκε σε 1% γέλη των 70 ml στα 100 mV. Απομονώθηκε η ζώνη που αντιστοιχούσε στη β-λακταμάση και καθαρίστηκε με το gel extraction kit της nucleospin σύμφωνα με τις οδηγίες που παρέχει η κατασκευάστρια εταιρία με την τελική επαναδιάλυση να γίνεται σε 20 μ l διαλύματος NE.

5.2.4 Αντίδραση λιγάσης

Επόμενο βήμα αποτελεί η αντίδραση λιγάσης με σκοπό την εισαγωγή της αλληλουχίας της β-λακταμάσης στο γραμμοποιημένο πλασμίδιο pGEM. Να σημειωθεί ότι το πλασμίδιο είχε γραμμοποιηθεί μέσω πέψης με το περιοριστική ενδονουκλεάση SmaI που αφήνει δίκλινα άκρα. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 2 μ l T4 λιγάσης, 2 μ l T4 buffer, 50 ng του γραμμοποιημένου πλασμιδίου και 300 ng του ενθέματος (αναλογία 1:6) και H₂O ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 20 μ l. Παράλληλα, παρασκευάστηκε κι δείγμα-μάρτυρας στο οποίο αντί για ένθεμα προστέθηκε H₂O. Ακολούθησε επώαση στους 16°C για 16 ώρες.

5.2.5 Κλωνοποίηση του πλασμιδίου pGEM με ένθεμα τη β-λακταμάση σε *E. coli* DH5α

Επόμενο βήμα αποτελεί η κλωνοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης λιγάσης σε *E. coli* DH5α. Αρχικά, για κάθε αντίδραση, υπό φλόγα αναμείχθηκαν 100 μl δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α με 10 μl από το προϊόν αντίδρασης της λιγάσης που αντιστοιχούσαν περίπου σε 25 ng πλασμιδίου. Για να μετασχηματιστούν τα κύτταρα, υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ κατά το οποίο επώαστηκαν 20 λεπτά στο πάγο, 50 δευτερόλεπτα στους 42°C και κατευθείαν 2 λεπτά στο πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκε θρεπτικό SOB ώστε να συμπληρωθεί 1 ml όγκου υγρής καλλιέργειας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C υπό ανάδευση 160 rpm για 50 λεπτά. Έπειτα, 350 μl από κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκε σε τρυβλία με LB άγαρ που περιείχαν αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml ώστε να αναπτυχθούν βακτηριακές αποικίες που φέρουν ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό, πράγμα που συνεπάγεται ότι είχαν λάβει το πλασμίδιο. Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονυχτίως (περίπου 16 ώρες) στους 37°C. Την επόμενη μέρα, επιλέχθηκε 1 μεμονωμένη αποικία από το τρυβλίο που είχαν επιστρωθεί τα κύτταρα που είχαν μετασχηματιστεί μόνο με το πλασμίδιο (δείγμα-μάρτυρας) και 5 μεμονωμένες αποικίες από το μετασχηματισμό με την αντίδραση λιγάσης που περιείχε το πλασμίδιο και τη β-λακταμάση. Οι αποικίες που συλλέχθηκαν επανακαλλιεργήθηκαν σε 2 ml υγρής καλλιέργειας LB που περιείχε 100 ml αμπικιλίνης και επώαστηκαν ολονυχτίως (περίπου 16 ώρες) στους 37°C υπό ανάδευση 210 rpm.

5.2.6 Απομόνωση πλασμιδίων, προετοιμασία για αλληλούχηση

Πλασμίδια απομονώθηκαν από τις υγρές καλλιέργειες με το πρωτόκολλο που περιγράφηκε στη παράγραφο 5.5.1 με τη διαφορά ότι οι φυγοκεντρήσεις έγιναν σε 14.000 g και η ποσότητα της RNase A αυξήθηκε από 10 σε 15 μl. Διαγνωστική αποκάλυψε το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο με την αλληλουχία της β-λακταμάσης.

Το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο κλωνοποιήθηκε σε *E. coli* DH5α. Πιο συγκεκριμένα, αναμείχθηκαν 50 μl κυττάρων με 1 μl πλασμιδίου από αραιώση 1/50 του mini-prep και επαναλήφθηκε η διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 5.1.5 με τη διαφορά ότι 100 μl υγρής καλλιέργειας επιστρώθηκαν στο τρυβλίο.

Αφού αναπτύχθηκε η υγρή καλλιέργεια, το ανασυνδιασμένο πλασμίδιο απομονώθηκε με kit της Nucleospin για mini-preps σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρέχεται από την εταιρία. Προετοιμάστηκε δείγμα για αλληλούχηση με τελική συγκέντρωση 100 ng/μl. Τέλος, παρασκευάστηκε στοκ του βακτηριακού κλώνου με την προσθήκη γλυκερόλης ώστε η περιεκτικότητα του στοκ να είναι 25% και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

5.3 Κλωνοποίηση 5 αλληλουχιών toehold σε φορέα eGFP

5.3.1 Υβριδοποίηση DNA αλυσίδων toehold

Προκειμένου να υβριδοποιηθούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες DNA των toehold 134, 1874, 4174, 7834 και 10284, για κάθε αντίδραση δημιουργήθηκε διάλυμα των 100 μl που απαρτιζόταν από 96 μl annealing buffer (10 mM Tris, 50 mM NaCl, 1mM EDTA) και 2 μl από κάθε μονόκλωνο τμήμα DNA. Έπειτα, τοποθετήθηκαν για 5 λεπτά σε ποτήρι ζέσεως με νερό σε θερμοκρασία βρασμού. Τα δείγματα αφέθηκαν στο πάγκο για 1:30 περίπου ώρα έως ότου η θερμοκρασία σταδιακά μειωθεί κάτω από 30°C.

5.3.2 Αντιδράσεις λιγάσης

Στη συνέχεια έλαβαν χώρα αντιδράσεις λιγάσης με στόχο την εισαγωγή των αλληλουχιών toehold 134, 1874, 4174, 7834 και 10284 στο γραμμοποιημένο φορέα pGEM-eGFP. Να σημειωθεί ότι η γραμμοποίηση του φορέα είχε επιτευχθεί μέσω πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και BamHI που αφήνουν διαφορετικά μονόκλινα άκρα. Για κάθε αντίδραση, λοιπόν, παρασκευάστηκε μείγμα που αποτελούνταν από 2 μl T4 λιγάσης, 2 μl 10X buffer, 60 ng του γραμμοποιημένου πλασμιδίου και 4 μl ενθέματος και H₂O ώστε ο τελικός όγκος να ισούται με 20 μl. Παράλληλα, δημιουργήθηκε δείγμα-μάρτυρας στο οποίο αντί για ένθεμα προστέθηκε H₂O. Ακολούθησε επώαση στους 16°C για 16 ώρες. Να σημειωθεί ότι προηγήθηκε ηλεκτροφόρηση του πλασμιδίου σε 1% γέλη για να διαπιστωθεί ότι υψηλό ποσοστό της ποσότητας του πλασμιδίου είναι γραμμοποιημένο.

5.3.3 Κλωνοποιήσεις με ένθεμα τις αλληλουχίες των toehold σε *E. coli* DH5α

Αρχικά, για κάθε αντίδραση, υπό φλόγα αναμείχθηκαν 100 μl δεκτικών κυττάρων *E. coli* DH5α με 10 μl από το προϊόν αντίδρασης της λιγάσης που αντιστοιχεί περίπου σε 30 ng πλασμιδίου. Για να μετασηματιστούν τα κύτταρα, υποβλήθηκαν σε θερμικό σοκ κατά το οποίο επώαστηκαν 20 λεπτά στο πάγο, 50 δευτερόλεπτα στους 42°C και κατευθείαν 2 λεπτά στο πάγο. Στη συνέχεια, προστέθηκε θρεπτικό SOB ώστε να συμπληρωθεί 1 ml όγκου υγρής καλλιέργειας. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τις υγρές καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε επωαστήρα στους 37°C υπό ανάδευση 160 rpm για 50 λεπτά. Έπειτα, 200 μl από κάθε καλλιέργεια επιστρώθηκαν σε τρυβλία με LB άγαρ που περιείχαν αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 100 μg/ml. Τα τρυβλία επώαστηκαν ολονύχτια (περίπου 16 ώρες) στους 37°C. Την επόμενη μέρα, επιλέχθηκε 1 μεμονωμένη αποικία από το τρυβλίο που είχαν επιστρωθεί τα κύτταρα που είχαν μετασηματιστεί μόνο με το πλασμίδιο (δείγμα-μάρτυρας) και 4 μεμονωμένες αποικίες από κάθε τρυβλίο με κύτταρα που μετασηματίστηκαν με τα 5 ανασυνδιασμένα πλασμίδια που προέκυψαν από τις αντιδράσεις λιγάσης. Οι αποικίες που συλλέχθηκαν επανακαλλιιεργήθηκαν σε 2 ml υγρής καλλιέργειας LB που

περιέχει 100 ml αμπικιλίνης και επώαστηκαν ολονυχτίως (περίπου 16 ώρες) στους 37°C υπό ανάδευση 210 rpm.

5.3.4 Απομόνωση πλασμιδίων, προετοιμασία για αλληλούχηση

Πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδίου από υγρές καλλιέργειες με το kit της Nucleospin για miniprepers σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρέχεται από την εταιρία. Για αλληλούχηση προετοιμάστηκε δείγμα με τελική συγκέντρωση να ισούται με 100 ng/μl για τον εκάστοτε toehold.

5.4 Απομόνωση RNA – Επεξεργασία με DNase – Κατακρήμνιση RNA

5.4.1 Απομόνωση RNA

Διεξήχθη απομόνωση RNA από δείγμα ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων. Αρχικά, προστέθηκε στο δείγμα κυττάρων 1 ml TRI και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Ύστερα, προστέθηκαν 200 μl χλωροφόρμιο, το διάλυμα αναμειχθηκε με καλό vortex και φυγοκεντρήθηκε για 5 λεπτά σε 14000 rpm στους 4°C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε νέο tube όπου προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης και 5 μl γλυκογόνο. Ακολούθησε επώαση 10 λεπτών στο πάγο και φυγοκέντρωση για 15 λεπτά σε 14000 rpm στους 4°C. Έπειτα, απορρίφθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 500 μl κρύας αιθανόλης. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά σε 14000 rpm στους 4°C. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε με πιπέτα η ποσότητα αιθανόλης που προστέθηκε προηγουμένως, με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η πελλέτα, και το tube αφέθηκε με ανοιχτό καπάκι για 15 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να εξατμιστούν τυχόν υπολείμματα αιθανόλης. Ακολούθησε προσθήκη 50 μl RNase free H₂O, επώαση για 5 λεπτά στους 65°C και vortex για την επαναδιάλυση του ιζήματος. Τέλος, το δείγμα αποθηκεύτηκε στους - 80°C. Να σημειωθεί ότι με το πρωτόκολλο που παρατέθηκε δεν έχει απομονωθεί αποκλειστικά RNA, αλλά και γονιδιωματικό DNA.

5.4.2 Επεξεργασία με DNase

Προκειμένου να απαλλαγθεί το δείγμα που προέκυψε από το πρωτόκολλο απομόνωσης RNA από κατάλοιπα γονιδιωματικού DNA, επεξεργάστηκε με το ένζυμο DNase. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 30 μl που απαρτιζόταν από 1 μl DNase I, 3 μl 10X buffer, 1 μl RNase out και 25 μl δείγματος. Ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37°C.

5.4.3 Κατακρήμνιση RNA

Αφού ολοκληρώθηκε η επώαση, προστέθηκαν 40 μl οξικό νάτριο 3 M και pH = 5.6, H₂O μέχρι να συμπληρωθεί όγκος ίσος με 400 μl και 5 μl γλυκογόνου. Για να επιτευχθεί καθίζηση του RNA, προστέθηκε 400 μl διαλύματος φαινόλης, χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25:24:1 και έγινε καλό vortex. Πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rpm στους 4°C. Έπειτα, το υπερκείμενο συλλέχθηκε προσεκτικά και μεταφέρθηκε σε άλλο tube όπου αναμειχθηκε με 1ml 100% κρύας αιθανόλης. Το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C έως την επόμενη μέρα που φυγοκεντρήθηκε για 30 λεπτά σε 14.000 rpm στους 4°C. Αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκαν 500 μl 70% κρύας αιθανόλης. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά σε 14.000 rpm στους 4°C. Στη συνέχεια, απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με προσοχή ώστε να μην διαταραχθεί η πελλέτα, και το tube αφέθηκε με ανοιχτό καπάκι για 15 περίπου λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η πελλέτα επαναδιαλύθηκε σε 25 μl H₂O με επώαση 5 λεπτών στους 65°C και έντονο vortex. Τέλος, το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -80°C.

5.5 Αντίστροφη μεταγραφή

Πραγματοποιήθηκε σύνθεση cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής από RNA δείγματα των ιών Dengue, Zika και Δυτικού Νείλου και ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων που παρασκευάστηκε προηγουμένως. Αρχικά, παρασκευάστηκαν δείγματα γενεαλογίας 1 και 2 του ιού του Δυτικού Νείλου σε τελικό όγκο 10 μl που περιείχαν 650 ng RNA επιθηλιακών κυττάρων και 100 ng RNA κυτταροκαλλιέργειας ιού του Δυτικού Νείλου της εκάστοτε γενεαλογίας. Παράλληλα, για κάθε κλινικό δείγμα των ιών του Δυτικού Νείλου, Zika και Dengue παρασκευάστηκε διάλυμα όγκου 10 μl που περιείχε ποσότητα 1000 ng RNA. Ακολούθως προστέθηκαν 1 μl τυχαίων εξαμερών εκκινητών καθώς και 1 μl dNTPs. Ακολούθησε επώαση 5 λεπτών στους 65°C. Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 4 μl 5X buffer, 1 μl της αντίστροφης μεταγραφάσης M-MLV, 1 μl RNase out καθώς και 2 μl DTT. Τα δείγματα επώαστηκαν για 2 ώρες στους 37°C. Τέλος, κάθε δείγμα αραιώθηκε με την προσθήκη 380 μl H₂O.

5.6 Ποσοτική PCR

Για κάθε δείγμα δημιουργήθηκε αντίδραση όγκου 20 μl από την ανάμειξη 10 μl 2X Syber green, 4 μl μείγματος εκκινητών, 2 μl H₂O και 4 μl cDNA. Ωστόσο, σε επόμενη qPCR που πραγματοποιήθηκε σε cDNA από κλινικά δείγματα του ιού του Δυτικού Νείλου και δείγματα γενεαλογίας 1 και 2 η σύσταση διαφέρει, καθώς προστέθηκαν 2 μl μείγματος εκκινητών και 4 μl H₂O σε κάθε αντίδραση. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε το GAPDH ως γονίδιο αναφοράς, καθώς και 4 πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί από αντίστροφη μεταγραφή 1000 ng RNA ανθρώπινων επιθηλιακών

κυττάρων εμπλουτισμένων με 100ng, 10 ng, 1ng και 0,1ng RNA ιού του Δυτικού Νείλου. Το πρωτόκολλο της ποσοτικής PCR που εφαρμόστηκε παρατίθεται παρακάτω:

1. 95°C, 3:00
 2. 95°C, 0:10
 3. 58°C, 0:20
 4. 72°C, 0:30
- } X 45 κύκλοι
5. Melt Curve Analysis: 55°C to 95°C , increment 0.5°C for 0:05
 6. 12°C, ∞

5.7 *In vitro* μεταγραφή και μετάφραση toehold ριβοδιακοπών με γονίδιο αναφοράς την eGFP.

Τελικό βήμα αποτελεί η δοκιμή της λειτουργίας των 5 toehold ριβοδιακοπών παρουσία του γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση του 5 διαφορετικών toehold ριβοδιακοπών με γονίδιο αναφοράς την eGFP που κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pGEM με τη χρήση της PURExpress[®] *In Vitro* Protein Synthesis Kit (New England Biolabs) σύμφωνα με τις υποδείξεις της κατασκευάστριας εταιρίας. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε παρουσία του δείγματος κυτταροκαλλιέργειας του ιού του Δυτικού Νείλου της γενεαλογίας 2. Ακολούθησε επώαση στους 37°C. Έπειτα, ποσοτικοποιήθηκε το σήμα της eGFP στη συσκευή Varioskan LUX ρυθμίζοντας το μήκος κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης και εκπομπής στα 488 nm και 515 nm αντίστοιχα.

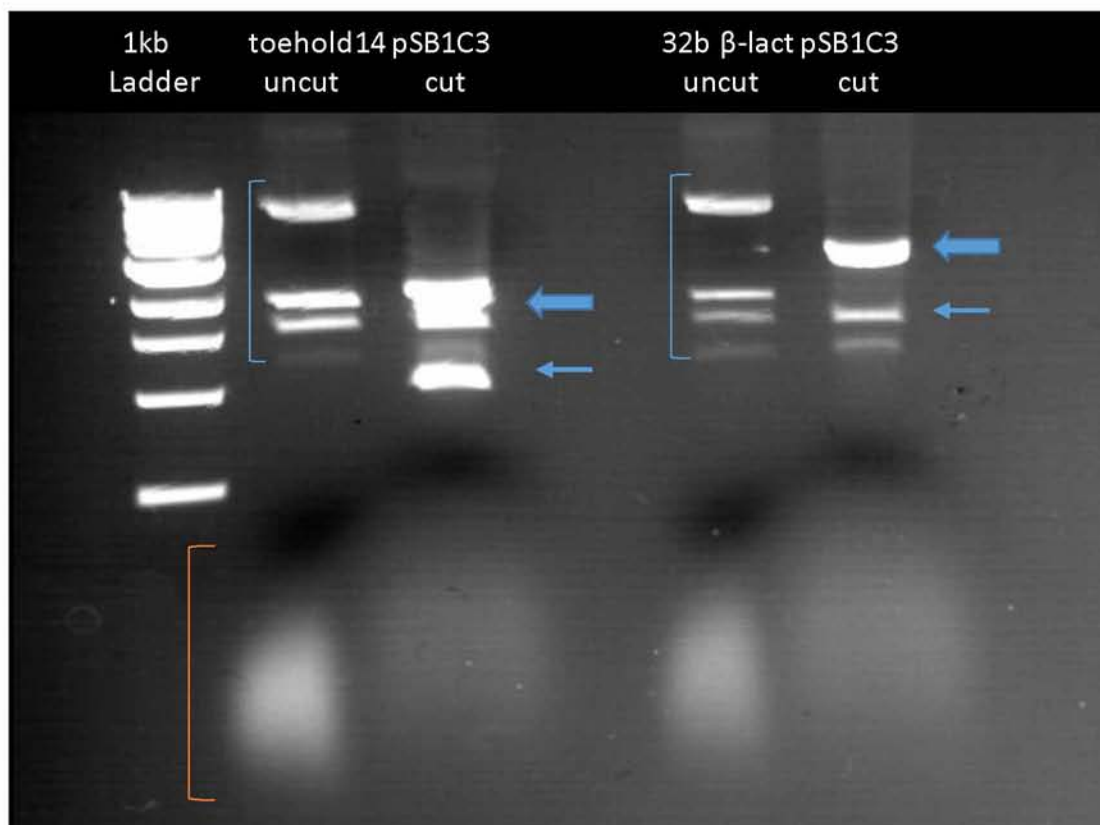
Κεφάλαιο 6: Αποτελέσματα

6.1 Κλωνοποίηση β-λακταμάσης

6.1.1 Διαγνωστική πέψη των φορέων 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 pSB1C3

Πραγματοποιήθηκε διαγνωστική πέψη του φορέα pSB1C3 για να διαπιστωθεί η ένθεση της β-λακταμάσης. Με βάση τον χάρτη του πλασμιδίου επιλέχθηκε το ένζυμο NotI HF το οποίο πέπτει το πλασμίδιο σε αλληλουχίες prefix και suffix που βρίσκονται αμέσως πριν και μετά το ένθεμα. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση στήθηκε σε τελικό όγκο 50 μl, στον οποίο περιέχονται 5 μl Buffer cutsmart, 2 μl NotI HF, 100 ng πλασμιδίου και H₂O. Το μείγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 1 ώρα στους 37°C. Μετά την επώαση, οι αντιδράσεις της πέψης καθώς και δείγματα άκοπων πλασμιδίων ηλεκτροφορήθηκαν σε 1% γέλη αγαρόζης όγκου 250 ml στα 140 mV.

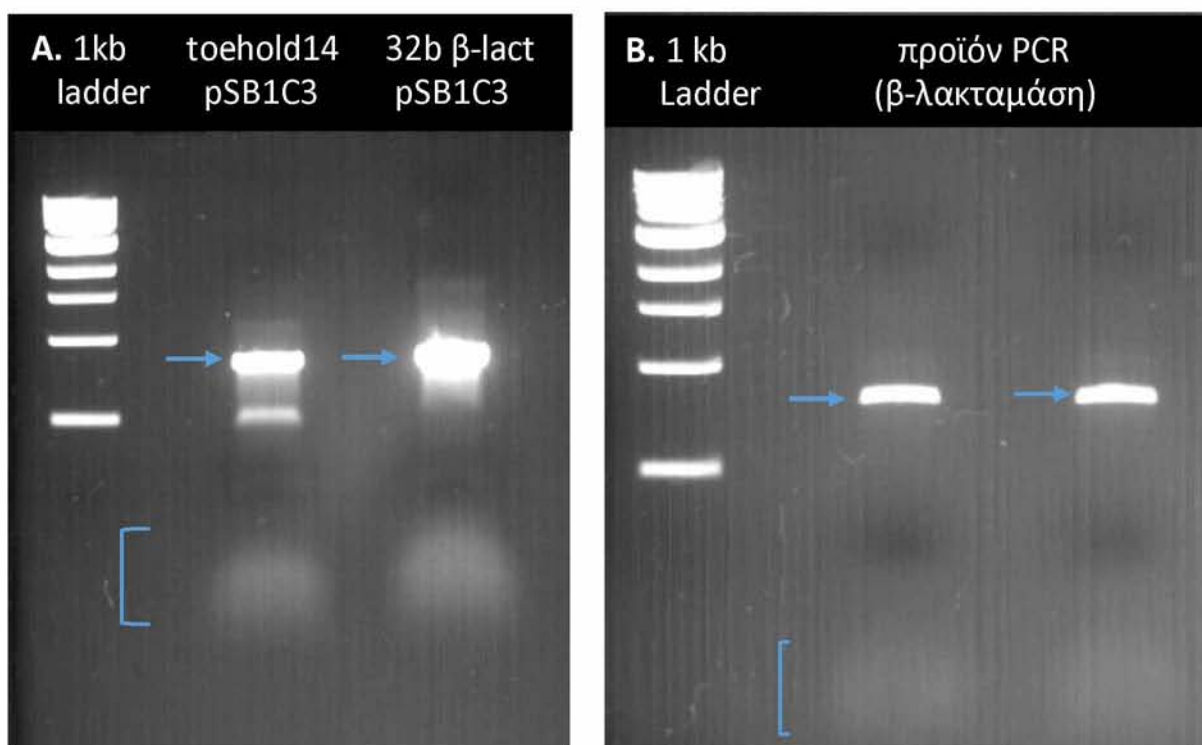
Στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης, παρατηρούνται οι 3 διαμορφώσεις των άκοπων πλασμιδίων: ελικωμένη, γραμμική και υπερελικωμένη. Στα πλασμίδια που υπέστησαν πέψη εμφανίζονται 2 έντονες ζώνες. Η ζώνη στα 3 Kb αντιστοιχεί την αλληλουχία του κομμένου πλασμιδίου που προέκυψε και η ζώνη στα 1 Kb που αντιστοιχεί στην αλληλουχία της β-λακταμάσης. Η αχνή μπάντα που διαφαίνεται αντιστοιχεί στη ποσότητα του πλασμιδίου που δεν υπέστη πέψη. Να σημειωθεί ότι το αχνό διάχυτο σήμα στη γέλη οφείλεται στην παρουσία υπολειμμάτων RNA στα δείγματα απομόνωσης του πλασμιδίου.



Εικόνα 12: Εικόνα ηλεκτροφόρησης φορέων 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 pSB1C3 άκοπων και έπειτα από διαγνωστική πέψη με το ένζυμο Not I HF. Τα έντονα μπλε βελάκια υποδεικνύουν το κομμένο πλασμίδιο, τα λεπτά μπλε τη β-λακταμάση, οι μπλε αγκύλες τις 3 διαμορφώσεις του πλασμιδίου και η πορτοκαλί αγκύλη τα υπολείμματα RNA.

6.1.2 Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR

Έπειτα από την διεξαγωγή PCR με την πολυμεράση χαμηλής πιστότητας KAPA taq στους φορείς 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 pSB1C3 για την ενίσχυση της β-λακταμάσης, το προϊόν της αντίδρασης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση. Πιο συγκεκριμένα, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε γέλη αγαρόζης 1% όγκου 60 ml υπό 100 mV. Η ηλεκτροφόρηση και στα 2 δείγματα αποκάλυψε ζώνη μεταξύ 0,5 Kb και 1 Kb, όπως υποδεικνύει ο μάρτυρας. Το εύρημα αυτό επιβεβαιώνει ότι το προϊόν της PCR ταυτίζεται με την αλληλουχία της β-λακταμάσης, καθώς το μήκος της ισούται με 795 ζεύγη βάσεων. Ωστόσο, στο δείγμα που το πλασμίδιο Toehold14 pSB1C3 χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα παρατηρείται μια επιπλέον ζώνη στα 0,5 Kb, υποδηλώντας ενίσχυση παραπροϊόντος από την αντίδραση PCR. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε μόνο το πλασμίδιο 32b β-lact pSB1C3 να χρησιμοποιηθεί ως καλούπι για τη σύνθεση της β-λακταμάσης μέσω αντίδρασης PCR με την πολυμεράση υψηλής πιστότητας Q5. Η αντίδραση αυτή πραγματοποιήθηκε 2 φορές και τα προϊόντα της ηλεκτροφορήθηκαν σε γέλη αγαρόζης 1% όγκου 70 ml υπό 100 mV. Η εικόνα της ηλεκτροφόρησης υπέδειξε ζώνες στο ίδιο μέγεθος με την προηγούμενη, πράγμα που συνεπάγεται ότι πρόκειται για τη β-λακταμάση. Στη συνέχεια, ακολούθησε απομόνωση και καθαρισμός των ζωνών αυτών από τη γέλη όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2.3. Να σημειωθεί ότι το αχνό διάχυτο σήμα στις εικόνες των ηλεκτροφορήσεων οφείλεται στα διμερή εκκινητών που προέκυψαν κατά την αντίδραση PCR.

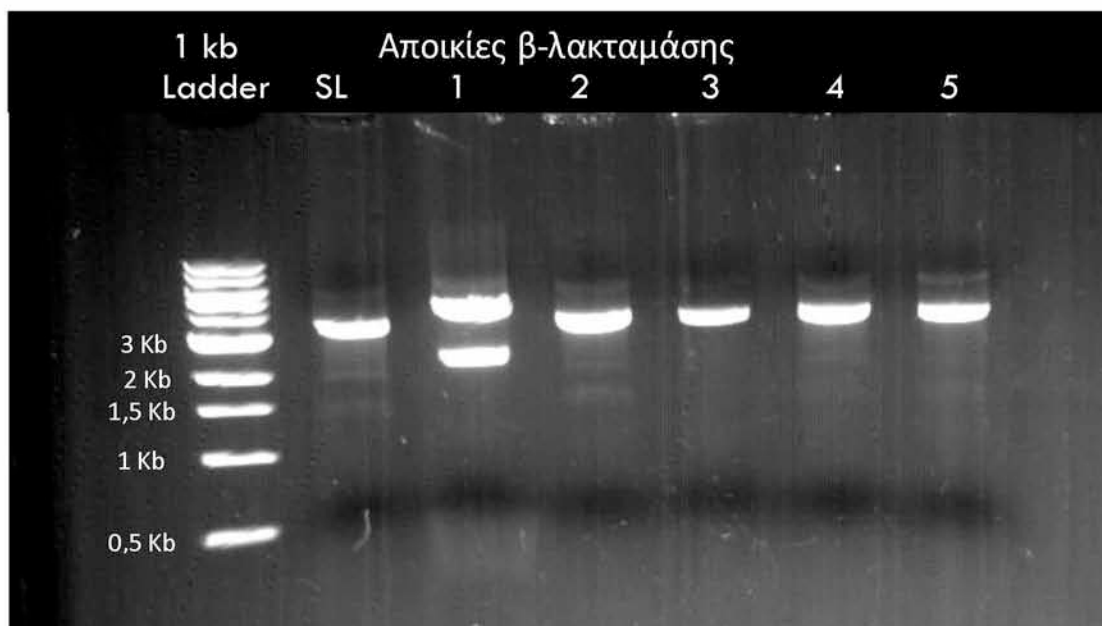


Εικόνα 13: Εικόνες ηλεκτροφορήσεων προϊόντων PCR. Α) Εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με την πολυμεράση KAPA taq για την ενίσχυση της β-λακταμάσης με καλούπια τους φορείς 32b β-lact pSB1C3 και Toehold14 pSB1C3. Β) Εικόνα ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR με την πολυμεράση Q5 για την ενίσχυση της β-λακταμάσης με υπόστρωμα τον φορέα 32b β-lact pSB1C3. Τα μπλε βελάκια υποδεικνύουν τη β-λακταμάση, ενώ οι μπλε αγκύλες διμερή εκκινητών.

6.1.3 Διαγνωστική πέψη των πλασμιδίων των μετασχηματισμένων αποικιών *E.coli*

Ύστερα από την απομόνωση του φορέα από μετασχηματισμένες αποικίες, έλαβε χώρα διαγνωστική πέψη για να διαπιστωθεί εάν το πλασμίδιο έφερε ως ένθεμα την αλληλουχία την β-λακταμάσης. Δεδομένου ότι η αντίδραση λιγάσης έγινε μεταξύ αλληλουχιών DNA με δίκλιωνα άκρα, είναι αναγκαίο μέσω της διαγνωστικής πέψης να καθίσταται εφικτή η διάκριση του προσανατολισμού που εντέθηκε το γονίδιο-αναφοράς. Με βάση το χάρτη του πλασμιδίου και την αλληλουχία του ενθέματος, το περιοριστικό ένζυμο που επιλέχθηκε είναι το *ScaI*. Το ένζυμο αυτό πέπτει μια φορά το πλασμίδιο και μια φορά το ένθεμα ασύμμετρα επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό του προσανατολισμού της β-λακταμάσης ανάλογα με το μήκος του θραύσματος που προκύπτει. Έτσι, λοιπόν, 2 θραύσματα μεγέθους 2 Kb υποδεικνύουν ότι το γονίδιο έχει εντεθεί με τέτοιο προσανατολισμό ώστε να μεταγράφεται και μεταφράζεται με τη σωστή φορά. Ειδάλλως, προκύπτουν θραύσματα των 1,5 και 2,5 Kb.

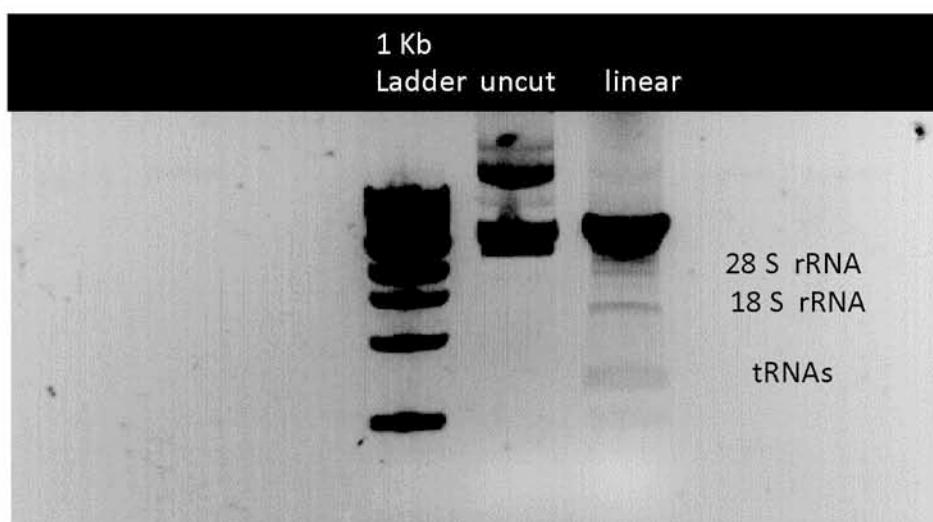
Η εικόνα που λήφθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτει ότι τα πλασμίδια που απομονώθηκαν από τις αποικίες 2-5 δεν είναι ανασυνδιασμένα, καθώς προκύπτει μόνο μια ζώνη. Εξαιρεση συνιστά μόνο το πλασμίδιο της αποικίας 1, καθώς έχει ενσωματωθεί το ένθεμα όπως υποδηλώνουν οι ζώνες. Ωστόσο, το αποτέλεσμα της αλληλούχησης της β-λακταμάσης του θετικού κλώνου υπέδειξε μεταλλάξεις καθιστώντας την αλληλουχία αυτή ακατάλληλη.



Εικόνα 14: Εικόνα ηλεκτροφόρησης πλασμιδίων των μετασχηματισμένων αποικιών *E.coli* έπειτα από διαγνωστική πέψη με *ScaI*. Το δείγμα SL (*self-ligation*) αναφέρεται στην αποικία βακτηρίων που μετασχηματίστηκε με το πλασμίδιο *pGEM* λειτουργώντας ως κοντρόλ.

6.2 Διαγνωστική πέψη μετασχηματισμένων αποικιών με φορέα eGFP για τον έλεγχο της ένθεσης των toeholds

Προτού πραγματοποιηθεί η αντίδραση λιγάσης μεταξύ των αλληλουχιών toehold και του φορέα, ήταν απαραίτητο να επιβεβαιωθεί ότι ο φορέας ήταν γραμμοποιημένος και όχι κυκλικός. Για το σκοπό αυτό, διεξήχθη ηλεκτροφόρηση σε γέλη αγαρόζης 1% 400 ng γραμμοποιημένου φορέα καθώς και δείγματος του άκοπου φορέα. Όπως η ηλεκτροφόρηση υπέδειξε μια ζώνη στο γραμμοποιημένο πλασμίδιο αποδεικνύοντας ότι είχε επιτευχθεί η πέψη του πλασμιδίου. Ακόμη, στο δείγμα του γραμμοποιημένου πλασμιδίου παρατηρούνται 3 αμυδρές ζώνες που αντιστοιχούν σε 28S rRNA, 18S rRNA και tRNAs υποδεικνύοντας τη παρουσία υπολειμμάτων RNA.

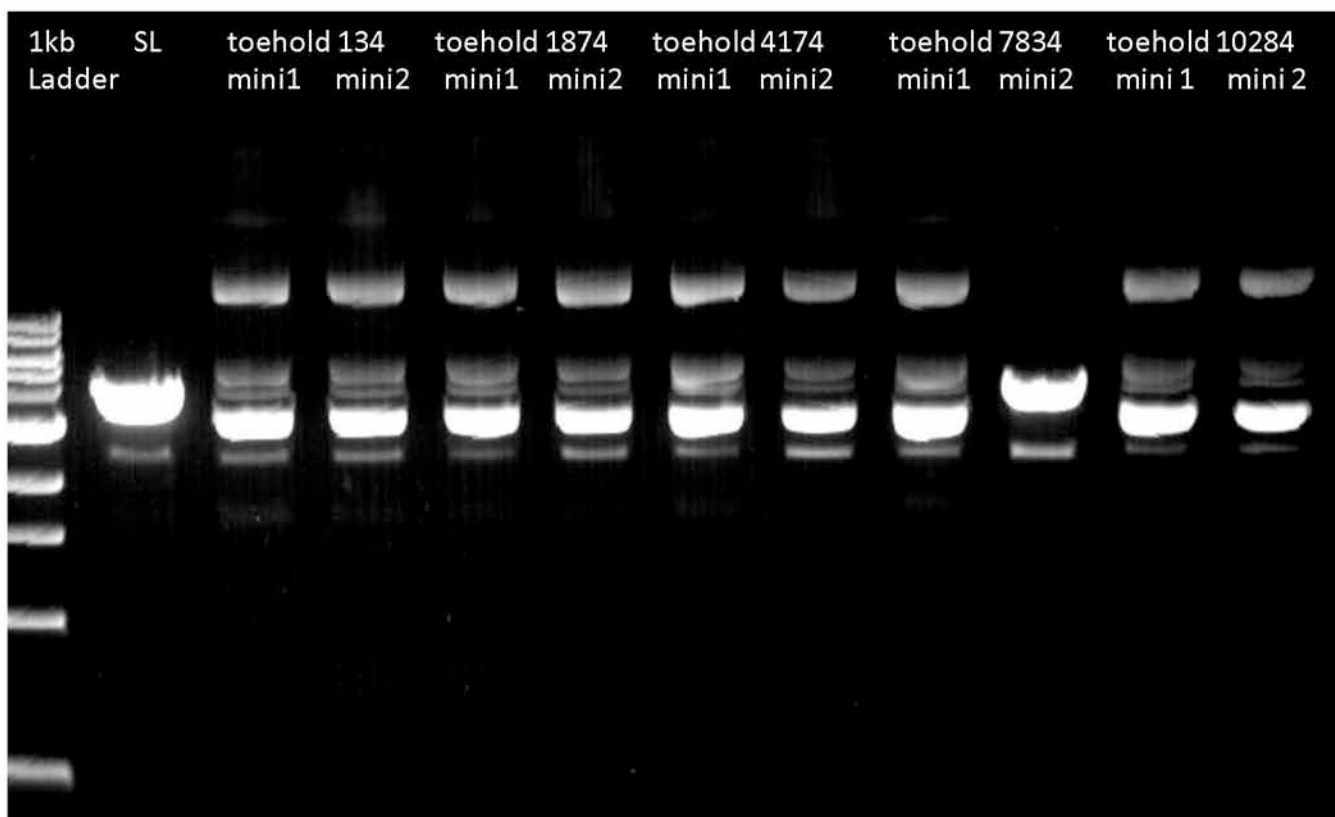


Εικόνα 15: Εικόνα ηλεκτροφόρησης πλασμιδίου στην κυκλική μορφή του και στη γραμμοποιημένη έπειτα από πέψη.

Μετέπειτα, έλαβε χώρα διαγνωστική πέψη για τον προσδιορισμό των αποικιών που είχαν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο που έφερε αλληλουχία toehold. Δεδομένου ότι από την πέψη του πλασμιδίου προκύπτουν διαφορετικά μονόκλιωνα άκρα, η εκάστοτε αλληλουχία toehold σχεδιάστηκε με συμπληρωματικά μονόκλιωνα άκρα έτσι ώστε να εντεθεί στο πλασμίδιο με τέτοιο προσανατολισμό που να προκύπτει το επιθυμητό μετάγραφο. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ο σωστός προσανατολισμός ένθεσης έχει εξασφαλιστεί, επιλέχθηκε η περιοριστική ενδονουκλεάση KpnI που αναγνωρίζει μια θέση κοπής. Η θέση, όμως, αυτή καταστρέφεται στην περίπτωση που έχει επιτευχθεί η αντίδραση λιγάσης μεταξύ του πλασμιδίου και του toehold.

Σχετικά με τη διαγνωστική πέψη, για καθεμιά από τις 5 διαφορετικές αλληλουχίες toehold εξετάστηκαν 2 βακτηριακοί κλώνοι καθώς και ένας κλώνος-μάρτυρας που έφερε το πλασμίδιο χωρίς ένθεμα. Όλοι οι κλώνοι που εξετάστηκαν για την παρουσία της εκάστοτε αλληλουχίας toehold, με εξαίρεση την αποικία 2 του toehold 7834, εμφανίζουν 3 ζώνες που αναπαριστούν τις 3 διαμορφώσεις του πλασμιδίου. Αυτό συνεπάγεται ότι το πλασμίδιο δεν υπέστη πέψη και συνεπώς φέρει αλληλουχία

toehold. Αντίθετα, ο κλώνος 2 του toehold 10284 δεν παρουσιάζει 3 ζώνες, αλλά το ίδιο πρότυπο ζωνών με το δείγμα μάρτυρα και ως εκ τούτου είναι αρνητικός.

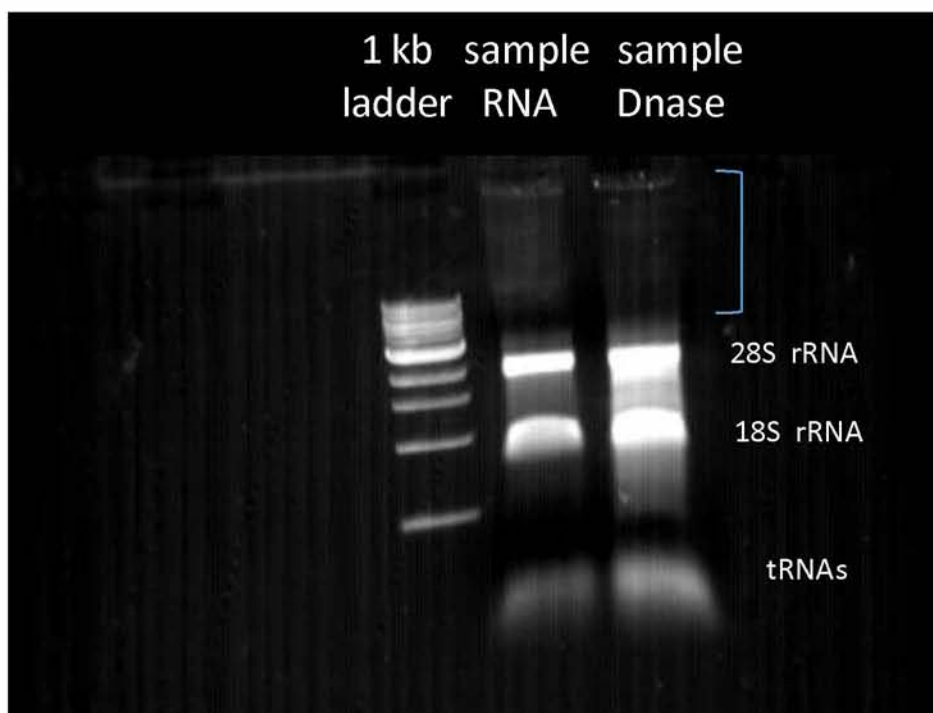


Εικόνα 16: Εικόνα ηλεκτροφόρησης πλασμιδίων μετασχηματισμένων αποικιών *E. coli* έπειτα από διαγνωστική πέψη για τον προσδιορισμό των πλασμιδίων που φέρουν την εκάστοτε αλληλουχία toehold. Το δείγμα SL (self-ligation) αναφέρεται στην αποικία βακτηρίων που μετασχηματίστηκε με το πλασμίδιο eGFP λειτουργώντας ως αρνητικός μάρτυρας.

6.3 Ηλεκτροφόρηση RNA

Λόγω της απαίτησης επιπέδου βιοασφάλειας 3 για το χειρισμό των ιών Dengue, Zika και Δυτικού Νείλου, παραχωρήθηκαν RNA δείγματα των ιών επεξεργασμένα με DNase. Ωστόσο, η διαδικασία απομόνωσης RNA πραγματοποιήθηκε σε δείγμα ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1% 2,5 ng του δείγματος RNA πριν και μετά την επεξεργασία με Dnase. Στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης και στα 2 δείγματα καταγράφονται 3 ζώνες που υποδεικνύουν το 28S ριβοσωμικό RNA, το 18S ριβοσωμικό RNA υπομονάδα και μεταφορικά RNA. Μάλιστα, όπως είναι αναμενόμενο, οι ζώνες στο δείγμα RNA που έχει υποστεί αντίδραση Dnase είναι πιο έντονες λόγω «εμπλουτισμού» σε RNA. Να σημειωθεί ότι τα ριβοσωμικά και μεταφορικά RNA συγκροτούν τη συντριπτική πλειοψηφία του ολικού RNA των κυττάρων. Αντίθετα, η περιεκτικότητα του ολικού RNA σε αγγελιαφόρα RNA είναι εξαιρετικά χαμηλή με αποτέλεσμα να μην αποτυπώνονται στην εικόνα της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον, το αχνό διάχυτο σήμα που αποτυπώνεται σε υψηλά μοριακά βάρη αναπαριστά το γονιδιωματικό DNA που

απομονώθηκε κατά την εκχύλιση RNA με την ένταση του να είναι πιο έντονη στο δείγμα που δεν υπέστη αντίδραση Dnase.



Εικόνα 16: Εικόνα ηλεκτροφόρησης ολικού RNA δείγματος ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων πριν και μετά την επεξεργασία με Dnase. Η μπλε αγκύλη υποδεικνύει υπολείμματα DNA.

6.4 Αποτελέσματα ποσοτικής PCR

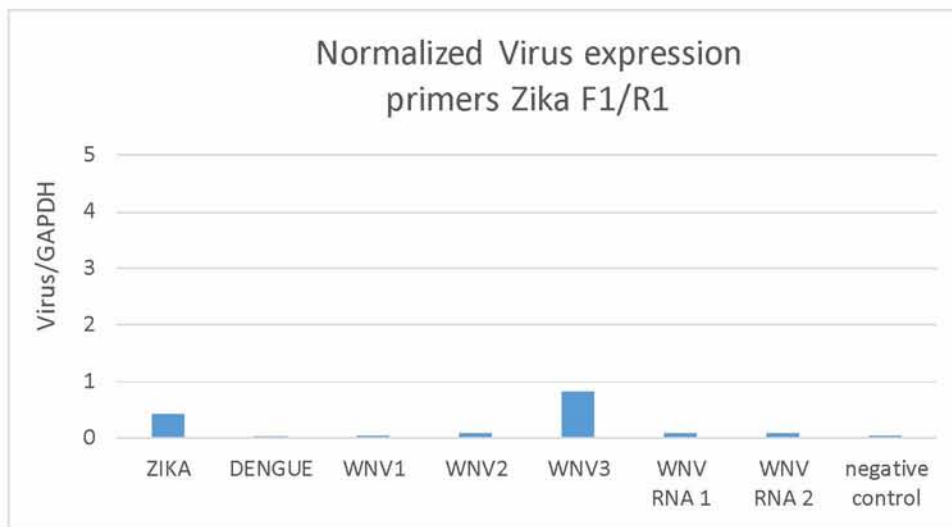
Στην αντίδραση που θα ελεγχθεί η απόδοση του συνθετικού ριβοδιακόπτη, είναι αναγκαία η δυνατότητα επαλήθευσης της παρουσίας του γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου στο δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί με άλλη μέθοδο. Πέρα, όμως, από την ανίχνευση, κρίσιμος είναι και ο υπολογισμός της ποσότητας του ιού του Δυτικού Νείλου στο δείγμα που θα επιτρέψει τον χαρακτηρισμό της ευαισθησίας της μεθόδου. Μάλιστα, σκόπιμη κρίνεται και η πραγματοποίηση της αντίδρασης παρουσία των ιών Dengue και Zika για να διαπιστωθεί πειραματικά η εξειδίκευση του ριβοδιακόπτη για τον ιό του Δυτικού Νείλου. Στο πλαίσιο αυτό, η ποσοτική PCR λειτουργεί ως ένα εργαλείο ικανό να ανιχνεύσει καθώς και να προσδιορίσει τη συγκέντρωση του εκάστοτε ιού με τη χρήση εξειδικευμένων για τον ιό εκκινητών. Εκτός, λοιπόν, από τον προσδιορισμό του ιικού φορτίου των δειγμάτων, οι αντιδράσεις της qPCR που έλαβαν χώρα αποσκοπούσαν και στον έλεγχο της εξειδίκευσης των εκκινητών.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR σε δείγματα Dengue, Zika και ιού του Δυτικού Νείλου για να ελεγχθεί η εξειδίκευση του εκάστοτε ζεύγους εκκινητών που σχεδιάστηκαν για να ενισχύουν αποκλειστικά το γονιδίωμα του Zika ή του Dengue. Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα Dengue, Zika και WNV1-3 είναι κλινικά, ενώ τα δείγματα WNV RNA 1-2 προέρχονται από κυτταροκαλλιέργειες. Παράλληλα, δείγμα

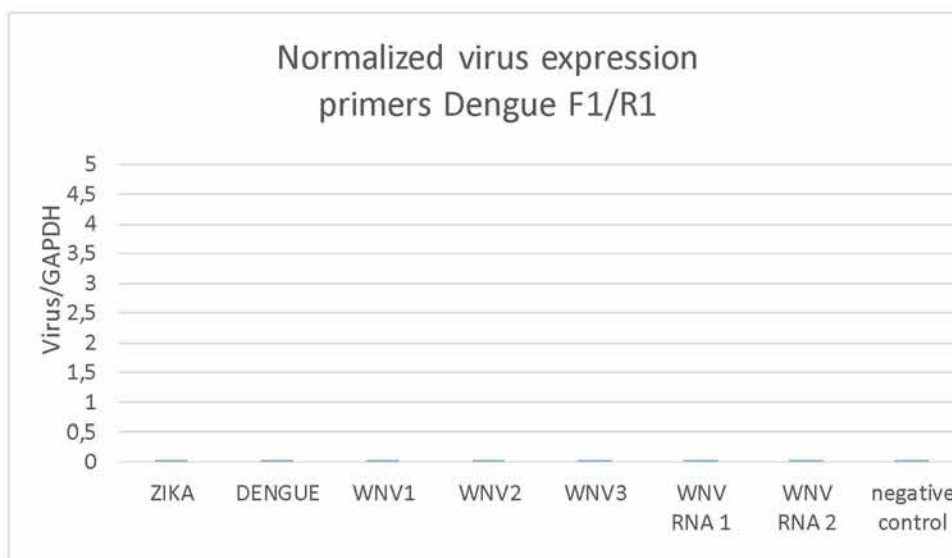
επιθηλιακών ανθρώπινων κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Στα γραφήματα 1 και 2 παρατίθενται τα κανονικοποιημένα έναντι του GAPDH αποτελέσματα της qPCR παρουσία των εκκινητών για τους Zika και Dengue. Στο γράφημα 1 η χαμηλή ενίσχυση που φαίνεται στα δείγματα ιών Dengue και Δυτικού Νείλου προκύπτει από πειραματικό θόρυβο, αφού ενίσχυση παρατηρείται ακόμη και στον αρνητικό μάρτυρα. Το γεγονός ότι πρόκειται για πειραματικό θόρυβο υποστηρίζεται περαιτέρω από τα υψηλά Cq (> 28,5) και την καμπύλη τήξης που υποδεικνύει μη εξειδικευμένα προϊόντα. Ομοίως, σε πειραματικό θόρυβο οφείλεται και η πολύ χαμηλή ενίσχυση στα δείγματα Zika και Δυτικού Νείλου στο γράφημα 2, αφού παρατηρείται ενίσχυση και στον αρνητικό μάρτυρα και οι τιμές Cq είναι αυξημένες (> 32). Συνεπώς, τα γραφήματα 1 και 2 αποδεικνύουν ότι δεν ενισχύονται τα δείγματα των συγγενικών ιών επιβεβαιώνοντας την εξειδίκευση των εκκινητών. Ωστόσο, δεν παρατηρείται σημαντική ενίσχυση του γονιδιώματος των ιών Zika και Dengue παρουσία των εξειδικευμένων εκκινητών τους. Αυτό οφείλεται στα χαμηλά ικά φορτία των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν όπως υπέδειξαν οι αυξημένες τιμές Cq (28,87 για το δείγμα Zika και 32,46 για το δείγμα Dengue).

Στη συνέχεια έλαβαν χώρα αντιδράσεις qPCR με το ζεύγος των εκκινητών του ιού του Δυτικού Νείλου στα κλινικά δείγματα του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2 καθώς και σε δείγματα κυτταροκαλλιιεργειών του ιού γενεαλογίας 1 και 2. Το γράφημα 3 υποδηλώνει ενίσχυση του γονιδιώματος της γενεαλογίας 2 (Cq=17,11) και όχι της γενεαλογίας 1 (Cq=30,21). Αυτό συνεπάγεται ότι το ζεύγος των εκκινητών είναι εξειδικευμένο για στελέχη του ιού του Δυτικού Νείλου που κατατάσσονται στην γενεαλογία 2. Επιπλέον, δεν σημειώνεται σημαντική ενίσχυση στα κλινικά δείγματα του ιού του Δυτικού Νείλου παρότι το στέλεχος του ιού ανήκει στη γενεαλογία 2. Αυτό οφείλεται στα χαμηλά ικά φορτία των κλινικών δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν όπως υπέδειξαν οι αυξημένες τιμές Cq (31,27 για WNV1, 32,61 για WNV2 και 30,16 για WNV3).

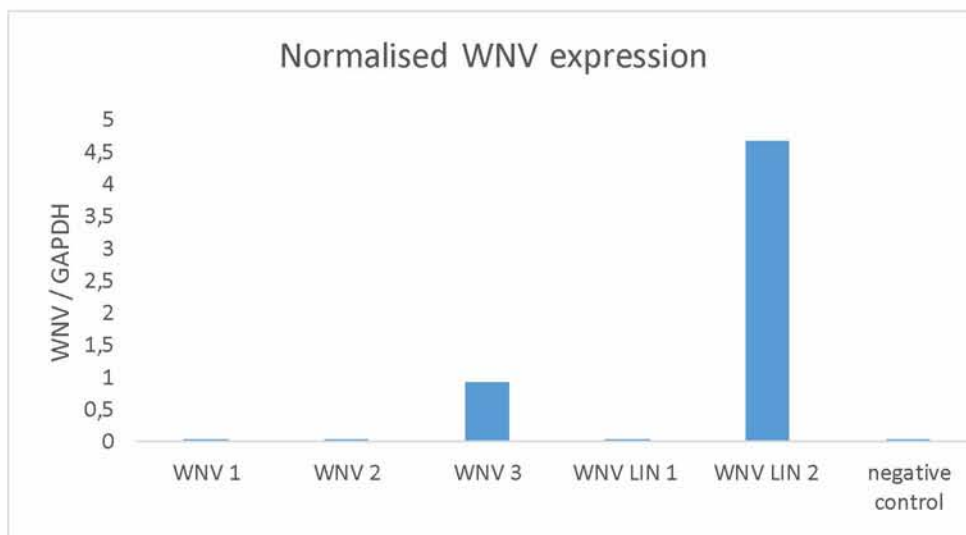
Με βάση τα ευρήματα αυτά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι τα ζεύγη εκκινητών για τους Zika και Dengue χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση. Αυτό προσδίδει στην qPCR αξιοπιστία για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό του φορτίων των ιών Dengue, Zika στα εξεταζόμενα δείγματα. Δεδομένου ότι είναι θεμιτό μελλοντικά να ελεγχθεί η λειτουργία του ριβοδιακόπτη παρουσία του γονιδιώματος του ιού του Δυτικού Νείλου αλλά και των στενά συγγενικών φλαβοϊών Zika και Dengue, η qPCR αποκτά ιδιαίτερη σημασία όντας ικανή να επαληθεύσει την παρουσία και να προσδιορίσει την ποσότητα του εκάστοτε ιού στο δείγμα που θα χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί ο ριβοδιακόπτης. Ωστόσο, οι χαμηλές συγκεντρώσεις των ιών Zika και Dengue καθιστούν ακατάλληλα τα κλινικά αυτά δείγματα για την πραγματοποίηση αντίδρασης με τον ριβοδιακόπτη για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου λόγω αυξημένης πιθανότητας ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος.



Γράφημα 1: Αποτελέσματα της ποσοτικής PCR με χρήση του ζεύγους των εκκινητών Zika F1/R1 έπειτα από κανονικοποίηση έναντι του GAPDH. Το δείγμα των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας.



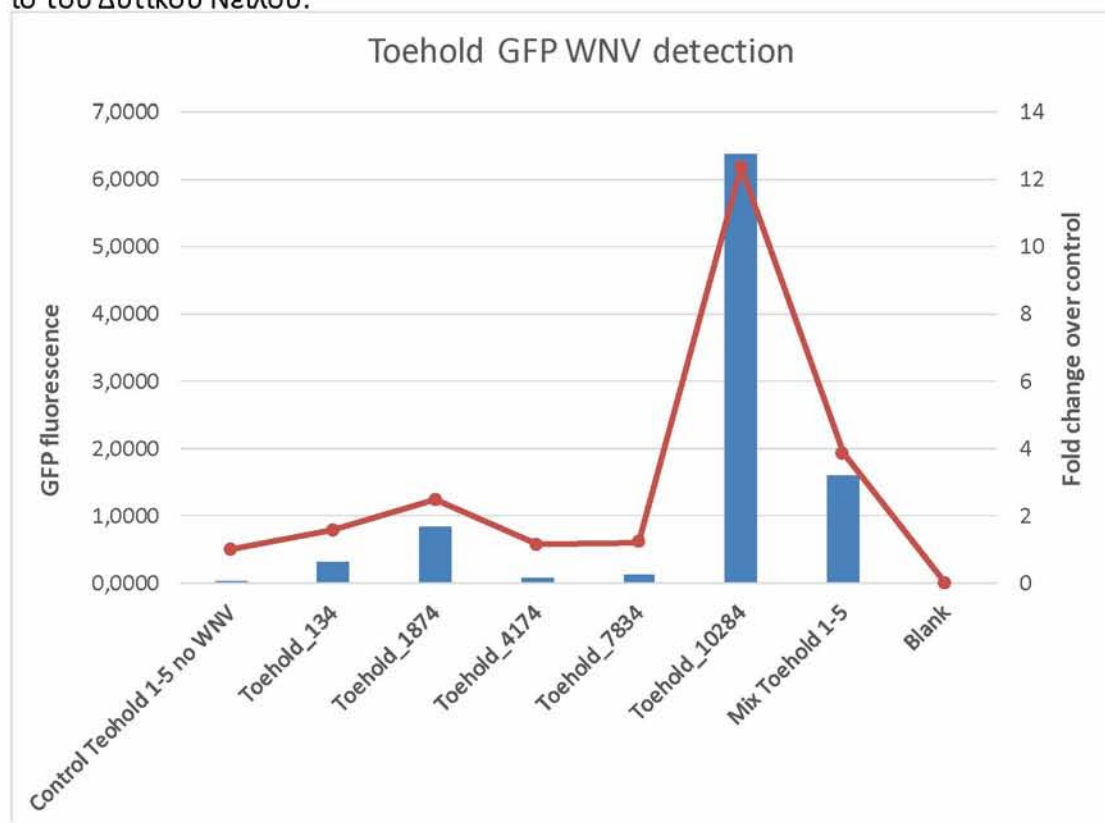
Γράφημα 2: Αποτελέσματα της ποσοτικής PCR με χρήση του ζεύγους των εκκινητών Dengue F1/R1 έπειτα από κανονικοποίηση έναντι του GAPDH. Το δείγμα των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας.



Γράφημα 3: Αποτελέσματα της ποσοτικής PCR με χρήση του ζεύγους των εκκινητών wnv F1/R1 έπειτα από κανονικοποίηση έναντι του GAPDH. Το δείγμα των ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων λειτουργεί ως αρνητικός μάρτυρας.

6.5 Ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου με τους 5 υποψήφιους ριβοδιακόπτες που φέρουν ως γονίδιο αναφοράς την eGFP

Έπειτα από την κλωνοποίηση των αλληλουχιών toehold 134, 1874, 4174, 7834 και 10284 στο φορέα που κωδικοποιεί για το γονίδιο αναφοράς eGFP, πραγματοποιήθηκε *in vitro* μεταγραφή και μετάφραση των 5 υποψήφιων ριβοδιακοπτών παρουσία RNA δείγματος του ιού του Δυτικού Νείλου γενεαλογίας 2. Παράλληλα, παρασκευάστηκε και μείγμα με τους 5 υποψήφιους ριβοδιακόπτες παρουσία και απουσία του ιού. Τα αποτελέσματα από τη μέτρηση του φθορισμού της eGFP που παράχθηκε σε κάθε δείγμα παρατίθενται στο γράφημα 4. Πιο συγκεκριμένα, δεν παρατηρείται σημαντικό σήμα φθορισμού στο μείγμα των ριβοδιακοπτών που δεν προστέθηκε ιός (αρνητικός μάρτυρας) καθώς οι αλληλουχίες toehold διατηρούν την ανενεργή τους διαμόρφωση υποδεικνύοντας την εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή τους με το γονιδίωμα του ιού. Χαμηλό σήμα φθορισμού λαμβάνεται και από τις αντιδράσεις με τις αλληλουχίες toehold 134, 4174, 1874 και 7834 καθιστώντας ακατάλληλες για εφαρμογή τους σε διαγνωστικό τεστ. Ωστόσο, στην αντίδραση με την αλληλουχία toehold 10284 σημειώθηκε εντυπωσιακά ισχυρό σήμα φθορισμού με τιμή κατά 12 φορές υψηλότερη του αρνητικού μάρτυρα. Αυτό συνεπάγεται ότι ο toehold 10284 συνιστά σοβαρό υποψήφιο ριβοδιακόπτη για να στηρίξει την παρασκευή διαγνωστικού τεστ για τον ιό του Δυτικού Νείλου.



Γράφημα 4: Αποτελέσματα της μέτρησης φθορισμού eGFP των αντιδράσεων *in vitro* μεταγραφής-μετάφρασης των 5 υποψήφιων ριβοδιακοπτών με γονίδιο αναφοράς την eGFP για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου. Οι μπλε μπάρες αντιστοιχούν στα επίπεδα φθορισμού του GFP (αριστερός άξονας) ενώ η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στην διαφορά του σήματος παρουσία ιικού RNA, συγκριτικά με την απουσία αυτού (άξονας γ στα δεξιά)

Κεφάλαιο 7: Συζήτηση και συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη την ευρεία εξάπλωση, τις σοβαρές κλινικές εκδηλώσεις που προκλαεί καθώς και την απουσία εμβολίου και αποτελεσματικής θεραπευτικής αγωγής για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του ιού του Δυτικού Νείλου, επιτακτική κρίνεται η ανάγκη επιτήρησης πληθυσμών των πτηνών, αφού λειτουργούν ως ξενιστές δεξαμενή, αλλά και των κουνουπιών. Ακόμη, παρακολούθηση χρήζουν και οι κοινότητες των ανθρώπων ώστε να εκτιμηθεί ορθά η διασπορά και η επιδημιολογική σημασία του ιού. Ωστόσο, οι υπάρχουσες διαγνωστικές μέθοδοι δεν διαθέτουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά ώστε να καταστεί εφικτή η διεξαγωγή μαζικών δειγματοληψιών πεδίου. Συγκεκριμένα, η κυταροκαλλιέργεια του ιού και η οροξεουδετέρωση απαιτούν επίπεδο βιασφάλειας 3 και είναι χρονοβόρες. Η ανίχνευση με ανοσολογικές μεθόδους συνοδεύεται με αυξημένη πιθανότητα ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω διασταυρούμενων αντιδράσεων με άλλους φλαβοϊούς, όπως ο Dengue και ο Zika, ενώ δεν διαχωρίζει την ενεργή παρουσία του ιού από την ανοσολογική μνήμη του ασθενούς. Οι μοριακές μέθοδοι, παρότι παρέχουν σύντομα τα αποτελέσματα και διακρίνονται από μεγάλη ευαισθησία, απαιτούν ακριβό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό (Barzon et al. 2015, Lustig et al. 2018, Shoba et al. 2016, De Filette et al 2012).

Ένα άλλο ζήτημα που δυσχεραίνει τη διάγνωση του ιού μέσω μοριακών μεθόδων είναι η επιλογή του κατάλληλου κλινικού δείγματος. Ο ιός επιτυγχάνει αιμία σε 2-3 μέρες και παραμένει για 8-10 μέρες σε ασυμπτωματικούς ανθρώπους και για περισσότερο σε συμπτωματικούς ασθενείς, ενώ μπορεί να απομονωθεί από ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό. Μελέτη του Lustig το 2016 σε συμπτωματικούς ασθενείς υπέδειξε ότι το γονιδίωμα του ιού απομονώνεται με μεγαλύτερη συχνότητα από το ολικό αίμα (86,8% για το ολικό αίμα και 58,3% για τα ούρα). Ωστόσο, το υψηλότερο ικό φορτίο καταγράφεται στα ούρα και μάλιστα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (1.100 αντίγραφα/ml στα ούρα και 550 αντίγραφα/ml στο ολικό αίμα). Ακόμη, μελέτη της Barzon το 2013 αποκάλυψε ότι σε ασθενείς με προσβεβλημένο νευρικό σύστημα ο ιός ανιχνεύεται σε ούρα και αίμα, σε ασθενείς με πυρετό του ιού του Δυτικού Νείλου ανιχνεύεται στα ούρα και όχι στο αίμα και σε ασυμπτωματικούς μόνο στο αίμα. Προκύπτει, λοιπόν, το ερώτημα εάν προτιμότερο κλινικό δείγμα είναι το αίμα ή τα ούρα, καθώς και ο προβληματισμός μήπως κριτήριο για την επιλογή του δείγματος πρέπει να αποτελούν τα κλινικά συμπτώματα του ασθενούς.

Ωστόσο, οι ριβοδιακόπτες, μόρια RNA που λειτουργούν ως βιοαισθητήρες στη φύση, έχουν εξελιχθεί μέσω της συνθετικής βιολογίας σε ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τον τομέα της διάγνωσης ικανό να επιλύσει τα προβλήματα των σημερινών μεθόδων. Το γεγονός ότι οι ριβοδιακόπτες είναι ικανοί να ανιχνεύουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες σε συνδυασμό με το σύντομο χρόνο σχεδιασμού, τους καθιστά ιδανικούς για την διάγνωση αναδυόμενων παθογόνων για των οποίων οι γνώσεις μας είναι περιορισμένες. Ακόμη, σε αντιδιαστολή με τις προαναφερθείσες μεθόδους, μπορεί να επιτευχθεί εξειδίκευση στην διάγνωση ενός παθογόνου έναντι συγγενικών παθογόνων επιλέγοντας κατάλληλη περιοχή του γονιδιώματος να

λειτουργεί ως σηματοδότη και προσαρμόζοντας ανάλογα την αλληλουχία του ριβοδιακόπτη.

Μεταξύ των κατηγοριών των ριβοδιακοπών, ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι συνθετικοί toehold μεταφραστικοί ριβοδιακόπτες, λόγω των προτερημάτων που διαθέτουν. Πιο συγκεκριμένα, όντας προϊόν της συνθετικής βιολογίας και όχι της φύσης, χαρακτηρίζονται από ορθογωνικότητα και ευελιξία στο σχεδιασμό τους. Επιπλέον, η ιδιαιτερότητα στη δομή τους που έγκειται στην ενσωμάτωση της αλληλουχίας πρόσδεσης του ριβοσώματος στην περιοχή της θηλιάς, σε αντιδιαστολή με τους μεταφραστικούς ριβοδιακόπτες προηγούμενης γενιάς που φέρουν την αλληλουχία στο δίκλωνο τμήμα της φουρκέτας, αυξάνει την ευελιξία στο σχεδιασμό τους. Ακόμη, ένα γνώρισμα των toehold ριβοδιακοπών είναι ότι η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ του σηματοδότη και του διακόπτη αφορά γραμμικά τμήματα RNA ευνοώντας θερμοδυναμικά και κινητικά την ενεργή διαμόρφωση του ριβοδιακόπτη. Τα χαρακτηριστικά αυτά συμβάλλουν στην επίτευξη υψηλής αναλογίας ενεργούς προς ανενεργή κατάσταση παρουσία του σηματοδότη με την πρωτεϊνοσύνθεση του γονιδίου αναφοράς να ενισχύεται κατά 400 φορές.

Ο Pardee και η ομάδα του το 2016 συνδύασαν το σύστημα των toehold ριβοδιακοπών με την τεχνολογία έκφρασης πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε χαρτί απουσία κυττάρων για την ανίχνευση του ιού Zika κατασκευάζοντας μια μέθοδο διάγνωσης με χαμηλό κόστος, απλή στη χρήση, χωρίς την ανάγκη ακριβού εξοπλισμού και εξειδικευμένου προσωπικού. Αυτό συνεπάγεται ότι δύναται να εφαρμοστεί σε μαζική κλίμακα εκτός εργαστηρίου. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία του γονιδιώματος του Zika ενεργοποιείται ο toehold ριβοδιακόπτης με αποτέλεσμα την παραγωγή της β-γαλακτοσιδάσης που μετατρέπει το κίτρινο υποστρώμα (ερυθρό της χλωροφαινόλης-β-D-γαλακτοπυρανοσίδη) σε μωβ προϊόν που είναι ορατό μάτι (το ερυθρό της φαινόλης). Το σύστημα ενεργοποιείται στο σύντομο διάστημα των 20 λεπτών, το μέγιστο δυναμικό εύρος ισούται με 34, ενώ επιτρέπει τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του ιικού φορτίου. Ωστόσο, αποκαλύφθηκε ότι η μέθοδος δεν χαρακτηρίζεται από αρκετή ευαισθησία για να ανιχνεύσει τα femtomolar του ιού που συναντώνται στα κλινικά δείγματα (20×10^6 αντίγραφα/ml στα ούρα, 3×10^6 αντίγραφα/ml στον ορό), διότι η ενεργοποίηση του ριβοδιακόπτη προϋποθέτει τουλάχιστον 30 nM συγκέντρωση της αλληλουχίας σηματοδότη. Ενσωματώνοντας ένα βήμα ενίσχυσης της περιοχής σηματοδότη του γονιδιώματος του Zika επιτεύχθηκε η ζητούμενη ευαισθησία.

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός συνθετικού toehold ριβοδιακόπτη για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου που θα μπορούσε να συγκροτήσει ένα διαγνωστικό τεστ παρόμοιο με του Zika που αναπτύχθηκε από τον Pardee το 2016. Στο πλαίσιο αυτό αρχικά κατασκευάστηκαν 5 υποψήφιοι toehold ριβοδιακόπτες με γονίδιο αναφοράς την eGFP. Προτού ελεγχθεί η απόδοση των 5 ριβοδιακοπών, επιβεβαιώθηκε μέσω qPCR η παρουσία του ιού του Δυτικού Νείλου στα διαθέσιμα δείγματα. Τα αποτελέσματα της qPCR αποκάλυψαν την εξειδίκευση του ζεύγος των εκκινητών για την γενεαλογία 2. Αυτό συνεπάγεται ότι η qPCR θα

μπορούσε κάλλιστα να λειτουργήσει ως ένα διαγνωστικό εργαλείο για την ανίχνευση κρουσμάτων στην Ελλάδα αλλά και την Ευρώπη όπου κυριαρχεί η γενεαλογία 2. Επιπλέον, από προηγούμενα πειράματα του εργαστηρίου έχει αποδειχθεί η εξειδίκευση του ζεύγους των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε έναντι των στενά συγγενικών ιών Zika και Dengue προσδίδοντας αξιοπιστία στα αποτελέσματα. Έπειτα, ελέγχθηκε η απόδοση των 5 toehold ριβοδιακοπών παρουσία 135 ng δείγματος κυτταροκαλλιέργειας του ιού γενεαλογίας 2 και όχι κλινικών δειγμάτων διότι η qPCR υπέδειξε χαμηλό ιικό φορτίο. Η ποσοτικοποίηση του φθορισμού της eGFP που παράχθηκε σε κατάλληλο φωτόμετρο υπέδειξε ότι και οι 5 ριβοδιακόπτες φέρουν εξειδίκευση για το γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου, καθώς δεν ενεργοποιήθηκαν απουσία του ιού. Ωστόσο, εντυπωσιακή ενίσχυση του σήματος φθορισμού κατά 12 φορές σημείωσε ο toehold ριβοδιακόπτης 10284 με αποτέλεσμα την ανάδειξη του σε σημαντικό υποψήφιο για ανάπτυξη διαγνωστικού τεστ που θα εφαρμοστεί σε περιοχές που ενδημεί ο ιός.

Καθώς η συγκεκριμένη πτυχιακή αποβλέπει στην παραγωγή μιας οικονομικής και εύχρηστης διαγνωστικής μεθόδου για την ανίχνευση του ιού του Δυτικού Νείλου, σκόπιμη κρίνεται η αντικατάσταση του πιλοτικού γονιδίου αναφοράς eGFP σε ένα ένζυμο που να καταλύει την παραγωγή ενός έγχρωμου προϊόντος ορατού ακόμη και με γυμνό μάτι καταργώντας την ανάγκη για ειδικό εξοπλισμό. Η επιλογή του ενζύμου ως γονίδιο αναφοράς υπερτερεί των φθοριζουσών πρωτεϊνών, διότι πραγματοποιείται ενίσχυση του τελικού σήματος. Η β-λακταμάση θα μπορούσε να παίξει το ρόλο αυτό, αφού καταλύει την υδρόλυση του δακτυλίου της β-λακτάμης με αποτέλεσμα το σχηματισμό μωβ προϊόντος από κίτρινο υπόστρωμα (συνήθως νιτροκεσίνη). Στο πλαίσιο αυτό έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης της β-λακταμάσης στον φορέα pGEM χωρίς, όμως, να στεφτεί με επιτυχία.

Μελλοντικά αναμένεται να πραγματοποιηθούν η κλωνοποίηση της β-λακταμάσης και ο έλεγχος της απόδοσης της δεξαμενής αλληλουχιών toehold που έχει σχεδιαστεί με τη β-λακταμάση και την eGFP να λειτουργούν ως γονίδια αναφοράς του ριβοδιακόπτη. Επιπλέον, πρόκειται να διεξαχθούν αντιδράσεις με τους toehold ριβοδιακόπτες παρουσία των συγγενικών ιών Zika και Dengue. Μάλιστα τα αποτελέσματα της qPCR που διεξήχθησαν με τη χρήση των ζευγών εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τους ιούς αυτούς επιβεβαίωσαν την εξειδίκευσή τους. Συνεπώς, έχουμε ήδη στη διάθεση μας το εργαλείο επιβεβαίωσης και εκτίμησης του φορτίου των ιών. Τέλος, μείζονα σημασίας ζήτημα που πρέπει να συζητηθεί είναι η ευαισθησία που μπορεί να επιτευχθεί με τους toehold ριβοδιακόπτες. Δεδομένου ότι το φορτίο του ιού του Δυτικού Νείλου που συναντάται στα κλινικά δείγματα είναι ακόμη πιο χαμηλό από του Zika (550 αντίγραφα/ml στο ολικό αίμα, 1100 αντίγραφα/ml στα ούρα), τίθεται το ερώτημα αν η μέθοδος μπορεί να ανταποκριθεί στην ανάγκη τόσο υψηλής ευαισθησίας χωρίς προϋπάρχουσα *in vitro* ενίσχυση του ιικού RNA. Όμως, το υψηλό ιικό φορτίο που παρατηρείται στα πτηνά ($10^{10.3}$ αντίγραφα/ml στο αίμα κορακοειδούς που είχε μολυνθεί με το στέλεχος GRE10) δημιουργεί ελπίδες ότι οι toehold ριβοδιακόπτες δύνανται να ανιχνεύσουν απευθείας τον ιό του Δυτικού Νείλου σε κλινικά δείγματα πτηνών. Φυσικά

πειράματα που θα διεξαχθούν σε μεταγενέστερο στάδιο θα δώσουν απάντηση στα ερωτήματα αυτά.

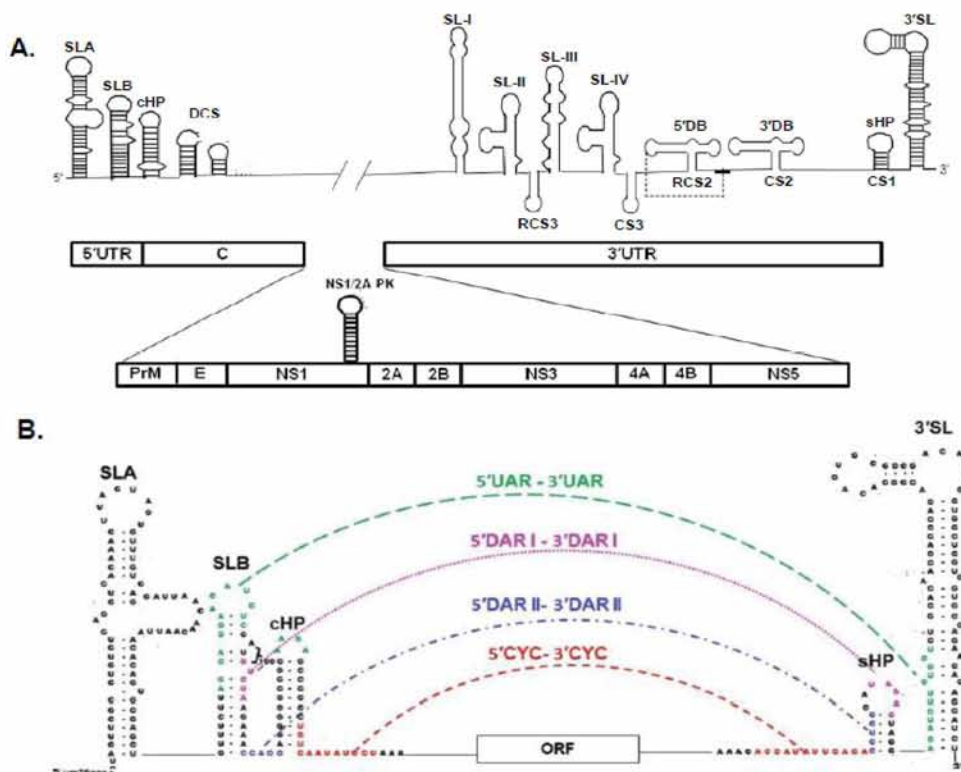
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Οργάνωση γονιδιώματος ιού Δυτικού Νείλου

1.1 Τερματικές αλληλουχίες

Όσον αφορά στην 5' τερματική αλληλουχία (Εικόνα 18Α), στην 5' αμετάφραστη περιοχή εντοπίζεται το πρώτο διακλαδισμένο στέλεχος βρόγχου (SLA), που λειτουργεί ως υποκινητής της αντιγραφής του ιού και το δεύτερο στέλεχος βρόγχου (SLB), που περιέχει την περιοχή ανοδικά του κωδικονίου έναρξης AUG (5' UAR) και τη περιοχή καθοδικά του AUG (5' DAR I). Ακολουθεί δεύτερη περιοχή καθοδικά του AUG (5' AUG II), μια δομή φουρκέτας (cHP), μια περιοχή κυκλοποίησης (5' CYC) και μια περιοχή διπλού βρόγχου (pseudoknot) που εντοπίζονται στην αλληλουχία που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη C (Brinton, 2013).

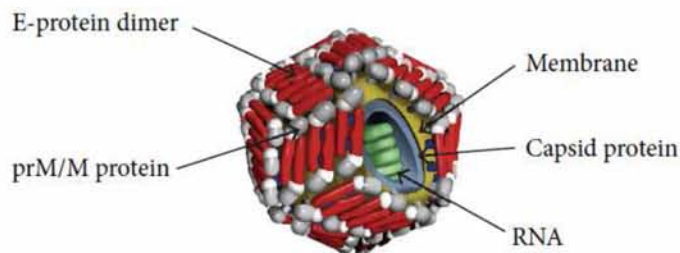
Όσον αφορά στην 3' τερματική αλληλουχία (Εικόνα 17Α), το σύνολο των δομών συναντώνται στην 3' αμετάφραστη περιοχή. Αρχικά, εντοπίζονται 4 δομές βρόγχου (SL I-IV). Ακολουθούν οι άμεσες επαναλήψεις (CS2 και RCS2) που σχηματίζουν δευτερεύουσες δομές αλτήρα (3' DB και 5' DB) στις οποίες περιέχονται αλληλουχίες απαραίτητες για την αντιγραφή και τη μετάφραση. Τέλος, κοντά στο 3' άκρο του RNA εντοπίζεται η αλληλουχία 3' CYC, μια μικρή δομή φουρκέτας (sHP), που περιέχει τις αλληλουχίες 3' DAR I και II, και μια δομή βρόγχου, που περιέχει την αλληλουχία 3' UAR, με τις δομές αυτές να απαιτούνται για την σύνθεση RNA. Οι αλληλουχίες 3' CYC, 3' CYC, UAR, DAR I και II αλληλεπιδρούν με τις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες στην 5' περιοχή του γονιδιώματος παίζοντας ρόλο στην κυκλοποίηση και αντιγραφή του (Εικόνα 18B) (Brinton, 2013).



Εικόνα 18 : Οι δευτεροταγείς δομές στο γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου και οι μακρινές αλληλεπιδράσεις RNA-RNA για την κυκλοποίηση του. Α) Συντηρημένες δομές θηλιών, φουρκετών, διπλών βρόγχων και αλτήρων που βρίσκονται στις 3' και 5' αμετάφραστες περιοχές και στην περιοχή NS1 στο γονιδίωμα του ιού του Δυτικού Νείλου. Β) Μακρινές αλληλεπιδράσεις RNA-RNA των τερματικών περιοχών που απαιτούνται για την κυκλοποίηση του γονιδιώματος αναπαρίστανται με διακεκομμένες γραμμές. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στη 5' περιοχή ανοδικά του κωδικονίου AUG (UAR) και στην συμπληρωματική της στο 3' άκρο αναπαρίσταται με πράσινο χρώμα. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στη πρώτη 5' περιοχή καθοδικά του κωδικονίου AUG (DAR I) με την συμπληρωματική της αναπαρίσταται με μωβ χρώμα, ενώ στη δεύτερη 5' περιοχή καθοδικά του κωδικονίου AUG (DAR II) με την συμπληρωματική της αναπαρίσταται με μπλε χρώμα. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις αλληλουχίες κυκλοποίησης (CYC) στις 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές αναπαρίσταται με πορτοκαλί χρώμα.

1.2 Δομικές πρωτεΐνες - ιικό σωματίο

Το ώριμο ιικό σωματίο (Εικόνα 19) είναι σφαιρικό με διάμετρο 50 nm και περιβάλλεται από φάκελο με εικοσαεδρική συμμετρία. Ο φάκελος συγκροτείται από ομοδιμερή της γλυκοπρωτεΐνης E και την πρωτεΐνη M και το πεπτιδίο που προκύπτει από την πέψη της prM που είναι ενσωματωμένα στη λιπιδική μεμβράνη. Η πρωτεΐνη E παίζει ρόλο στην πρόσδεση με τον υποδοχέα του κυττάρου στόχου και την είσοδο του ιού στο κύτταρο, ενώ η πρωτεΐνη prM αποτρέπει την πρόωρη σύντηξη των ανώριμων ισωματίων με την κυτταρική μεμβράνη. Εσωτερικά της μεμβράνης εντοπίζεται το νουκλεοκαψίδιο που συγκροτείται από το γονιδίωμα του ιού και τη καψιδιακή πρωτεΐνη C, η οποία δεν έχει καμιά επαφή με την γλυκοπρωτεΐνη E και την πρωτεΐνη M. Η πρωτεΐνη C είναι διμερής με άνιση κατανομή φορτίου, αφού η μια πλευρά είναι θετικά φορτισμένη λόγω βασικών καταλοίπων και η άλλη πλευρά άπολη λόγω υδρόφοβων περιοχών της πρωτεΐνης. Θεωρείται ότι η θετικά φορτισμένη επιφάνεια της καψιδιακής πρωτεΐνης αλληλεπιδρά με το γονιδίωμα του ιού, ενώ η άπολη επιφάνεια με την εσωτερική πλευρά του φακέλου (Barrows. et al. 2018, Chancey et al., 2015).

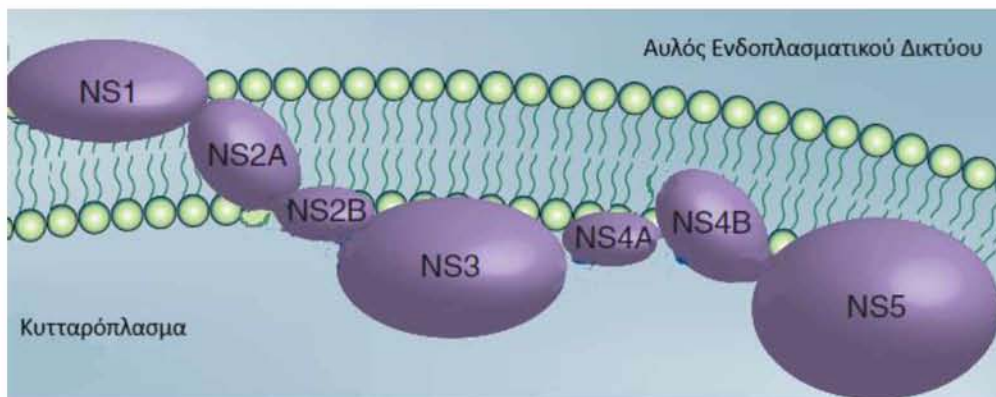


Chancey Caren et al., (2015), The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus, *Biomed Research International*, 2015 (3).

Εικόνα 19 : Δομή σωματίου ιού Δυτικού Νείλου. (Barrows. et al., 2018)

1.3 Μη Δομικές πρωτεΐνες-Σύμπλοκο αντιγραφής

Το σύμπλοκο αντιγραφής του ιού εντοπίζεται στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και συγκροτείται από τις μη δομικές πρωτεΐνες με τις NS3 και NS5 να κατανέμονται στην κυτταροπλασματική πλευρά της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, ενώ η NS1 στον αυλό και οι NS2A, NS2B, NS4A και NS4B εντός της μεμβράνης του ενδοπλασματικού (Εικόνα 20) (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018).



Τροποποίηση από Medigeshi Guruprasad R.,(2011), Mosquito-borne flaviviruses overview of viral life cycle and host-virus interactions, *Future Virology*, 6 (9), 1075–1089.

Εικόνα 20: Κατανομή των μη δομικών πρωτεϊνών στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018)

Πρωτεΐνη NS1

Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που συναντάται σε 2 μορφές με τη δεύτερη να προκύπτει από ολίσθηση του ριβοσώματος λόγω της παρουσίας αλληλουχίας ολίσθησης ακολουθούμενη από διπλό βρόγχο στην περιοχή NS1 με αποτέλεσμα την επέκταση του αναγνωστικού πλαισίου στη περιοχή της NSA2. Η NS1 φέρει 3 συντηρημένες θέσεις γλυκοσυλίωσης και κυστεΐνες που σχηματίζουν ομοιολογικούς δεσμούς και συντίθεται ως μονομέρες, το οποίο είναι υδρόφιλο και διαλυτό. Μπορεί να σχηματίσει ομοδιμερή, που συναντώνται στην πλευρά του αυλού του ενδοπλασματικού δικτύου αλλά και στην εξωτερική πλευρά όπου συνεντοπίζεται στα σύμπλοκα αντιγραφής του ιού. Μπορεί, επίσης, να σχηματίσει ομοεξαμερή τα οποία εκκρίνονται από το κύτταρο. Αν και ο ρόλος της δεν έχει διευκρινιστεί, φαίνεται να εμπλέκεται στην έναρξη της σύνθεσης του RNA. Επίσης, εμποδίζει τη δράση του μη ειδικού ανοσοποιητικού συστήματος μέσω αναστολής της ενεργοποίησης του συμπληρώματος. Πιο συγκεκριμένα, στρατολογεί τον ρυθμιστικό παράγοντα F και αλληλεπιδρά με τα συστατικά C1 και C4 με τρόπο που εμποδίζει την ενεργοποίηση του συμπληρώματος επιτυγχάνοντας την προστασία των ιικών σωματίων (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018).

Πρωτεΐνες NS2A, NS2B, NS4A, NS4B

Πρόκειται για μικρές, υδρόφοβες πρωτεΐνες οι οποίες δεν διαθέτουν κάποιο συντηρημένο μοτίβο που είναι χαρακτηριστικό γνωστών ενζύμων. Καθεμία πρωτεΐνη φέρει 2 ή 3 περιοχές που εντοπίζονται στη μεμβράνη και διευκολύνει την συναρμολόγηση και/ή την αγκυροβόληση των συμπλεγμάτων αντιγραφή του ιού στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Πιο συγκεκριμένα, σχετικά με την NS2B, η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά με την επικράτεια πρωτεάσης της NS3 δρώντας ως συμπαραγόντας. Ωστόσο, οι δομές καθώς και λειτουργίες που επιτελούν οι πρωτεΐνες αυτές δεν έχουν χαρακτηριστεί ικανοποιητικά (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018).

Πρωτεΐνη NS3

Η πρωτεΐνη NS3 καταλύει αρκετές ενζυμικές αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, στην αμινοτελική της περιοχή συγκροτείται η επικράτεια πρωτεάσης σερίνης που είναι ενεργή μόνο σε σύμπλοκο με την NS2B. Το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει στην πέψη της ιικής πολυπρωτεΐνης στις επιμέρους πρωτεΐνες με την σύνδεση του στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου να είναι απαραίτητη για την απόδοσή του. Επίσης, η NS3 φέρει δραστικότητα ελικάσης εξαρτώμενης από ATP που της επιτρέπει να ξεδιπλώνει το δίκλωνο RNA κατά την σύνθεση του ιικού RNA. Η NS4A έχει αναφερθεί ότι δρα ως συμπαραγόντας της NS3 ελικάσης βοηθώντας ώστε να διατηρήσει την δραστικότητα της παρουσία χαμηλών επιπέδων ATP. Επιπλέον, μπορεί να λειτουργήσει ως νουκλεοτιδική τριφωσφατάση που διεγείρεται από RNA καθώς και 5' τριφωσφατάση η οποία καταλύει την αποφωσφορυλίωση του 5' άκρου του RNA, βήμα που προηγείται της προσθήκης της καλύπτρας (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018).

Πρωτεΐνη NS5

Είναι η πιο συντηρημένη πρωτεΐνη στους φλαβοϊούς που λειτουργεί ως ένζυμο. Πιο συγκεκριμένα, στην αμινοτελική περιοχή της εντοπίζεται η επικράτεια μεθυλοτρανσφεράσης που μπορεί να λειτουργεί ως N7 και 2'Ο μεθυλοτρανσφεράση καθώς και ως γουανυλτρανσφεράση. Με τις δραστικότητες αυτές που φέρει η NS5 επιτελείται η προσθήκη της 5' καλύπτρας στα νεοσυντιθέμενα RNA θετικής πολικότητας. Στην καρβοξυτελική της περιοχή εντοπίζονται μοτίβα αλληλουχιών που είναι χαρακτηριστικά των RNA εξαρτώμενων RNA πολυμερασών με την NS5 να διαθέτει την ενζυμική αυτή λειτουργία. Η NS5 με την NS3 συγκροτούν σύμπλοκο που είναι σημαντικό για την αντιγραφή του ιού (Brinton 2013, Barrows. et al. 2018).

2. Στάδια προσβολής από τον ιό του Δυτικού Νείλου

Η μόλυνση από τον ιό του Δυτικού Νείλου ξεκινάει με την αναγνώριση και την είσοδο του ιικού σωματίου στο κύτταρο στόχο. Ακολουθεί μετάφραση για την παραγωγή πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο και αντιγραφή για τον πολλαπλασιασμό του γονιδιώματος στο κυτταρόπλασμα γύρω από την μεμβράνη του ενδοπλασματικού με αυτό να αλλάζει μορφές λειτουργώντας ως mRNA (γραμμική μορφή) ή ως καλούπι για την σύνθεση της αλυσίδας RNA αρνητικής πολικότητας (κυκλική μορφή). Χρονικά κοντά στην μόλυνση, τα επίπεδα σύνθεσης του RNA είναι χαμηλά με παρόμοιο αριθμό αλυσίδων RNA θετικής και αρνητικής πολικότητας. Αντίθετα, τα επίπεδα μετάφρασης είναι υψηλά. Η εκθετική φάση πολλαπλασιασμού του γονιδιώματος αρχίζει με τον σχηματισμό κοιλοτήτων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου του οποίου έχουν συγκροτηθεί τα σύμπλοκα πολλαπλασιασμού με πολλαπλές αλυσίδες RNA να συντίθενται ταυτόχρονα από ένα υπόστρωμα (Brinton 2013, Mazeaud et al. 2018). Τέλος, πραγματοποιείται συναρμολόγηση του ιοσωματίου, εκβλάστηση και εκ νέου μόλυνση κυττάρων στόχων επαναλαμβάνοντας τον κύκλο ζωής (Medigeshi, 2011).

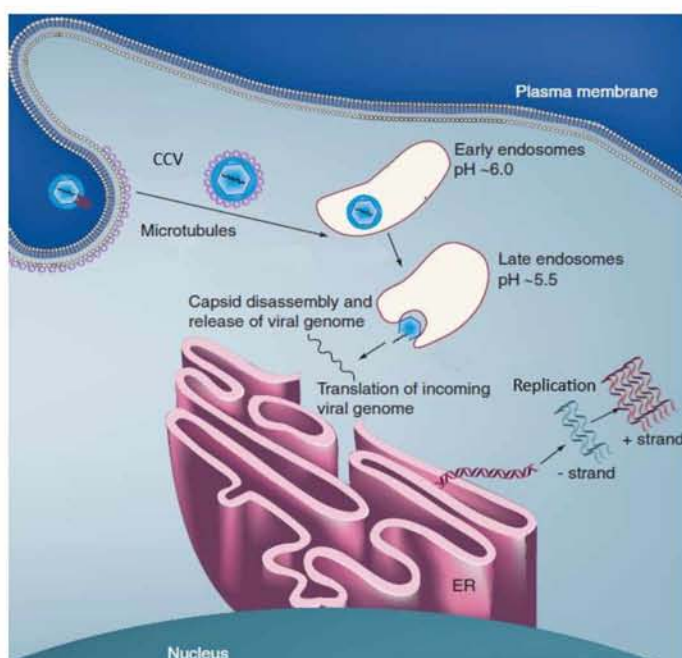
2.1 Αναγνώριση του κυττάρου στόχου από τον ιό του Δυτικού Νείλου

Ο ιός του Δυτικού Νείλου μπορεί να μολύνει θηλαστικά, έντομα και πτηνά με τον υποδοχέα που αναγνωρίζει και τις πρωτεΐνες που διαμεσολαβούν την είσοδο του στο κύτταρο να παραμένουν άγνωστα. Οι ιντεγκρίνες έχουν προταθεί ως υποψήφιοι υποδοχείς που αναγνωρίζει ο ιός χωρίς όμως όλα τα πειραματικά δεδομένα να συγκλίνουν προς αυτή την υπόθεση. Το γεγονός ότι ο ιός μπορεί να εισέλθει σε ποικίλα είδη ιστών και κυτταρικών τύπων υποδεικνύει ότι είτε ο υποδοχέας και τα μόρια που συμμετέχουν στην είσοδο είναι αρκετά συντηρημένα είτε εκμεταλλεύεται διαφορετικές πρωτεΐνες και μονοπάτια εισόδου ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και τον οργανισμό ξενιστή. Στον άνθρωπο ο τροπισμός του ιού φαίνεται να περιορίζεται σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (δενδριτικά κύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα), νευρώνες και ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, ένας παράγοντας που μπορεί να συμμετέχει στον καθορισμό της επιλογής του υποδοχέα φαίνεται να είναι η πρωτεΐνη E του ιού και η γλυκοσυλίωση της (Brinton 2013).

2.2 Είσοδος

Ύστερα από την αλληλεπίδραση του με τον υποδοχέα, ο ιός του Δυτικού Νείλου εισέρχεται στο κύτταρο στόχο μέσω ενδοκύττωσης κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη χωρίς όμως αυτό να ισχύει για κάθε κυτταρικό τύπο που μολύνει ο ιός υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολλαπλών μονοπατιών. Η ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από κυστίδια που περιβάλλονται από κλαθρίνη έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνει σε κύτταρα θηλαστικών και κουνουπιών. Πιο συγκεκριμένα, αφού το ιϊκό

σωμάτιο συνδεθεί στους παράγοντες προσκόλλησης της λιπιδικής σχεδίας, αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του οδηγώντας στο σχηματισμό μιας κοιλότητας καλυμμένης από κλαθρίνη στην περιοχή εκείνη. Στη συνέχεια, από την κοιλότητα σχηματίζεται ένα κυστίδιο καλυμμένο με κλαθρίνη που απελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα και περιέχει το ιικό σωματίο. Το κυστίδιο μεταφέρεται μέσω του δικτύου των μικροσωληνίσκων σε πρώιμα ενδοσώματα που περιέχουν την GTPase Rab 5 με τα οποία ενώνεται. Η οξίνιση του pH στο ενδόσωμα προκαλεί τον σχηματισμό ομοτριμερών πρωτεΐνης E. Η δομική αυτή αναδιάταξη φέρνει σε τέτοια κοντινή απόσταση τις μεμβράνες του ιικού σωματίου και του ενδοσώματος που συγχωνεύονται με αποτέλεσμα να απελευθερώνεται το σύμπλεγμα του γονιδιώματος του ιού με την πρωτεΐνη C στο κυτταρόπλασμα. Τέλος, η πρωτεΐνη C αποδιατάσσεται και το γονιδίωμα είναι ελεύθερο (Medigeshi, 2011). Η διαδικασία αυτή αναπαρίσταται στην εικόνα 21.



Εικόνα 21: Είσοδος του σωματίου του στο κύτταρο στόχο. Το ιοσωμάτιο εισέρχεται στο κύτταρο στόχο μέσω κυστιδίου καλυμμένου με κλαθρίνη που συγχωνεύεται με πρώιμο ενδόσωμα η οξίνιση του οποίου οδηγεί στην απέκδυση από τον φάκελο με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του νουκλεοκαψιδίου στο κυτταρόπλασμα. Ύστερα από την αποδιάταξη του καψιδίου, το γονιδίωμα μπορεί να μεταφραστεί και να αντιγραφεί.

CCV: Clathrin-coated vesicle; ER: Endoplasmic reticulum.

Τροποποίηση από Medigeshi Guruprasad R.,(2011), Mosquito-borne flaviviruses overview of viral life cycle and host-virus interactions, *Future Virology*, 6 (9), 1075–1089.

2.3 Μετάφραση

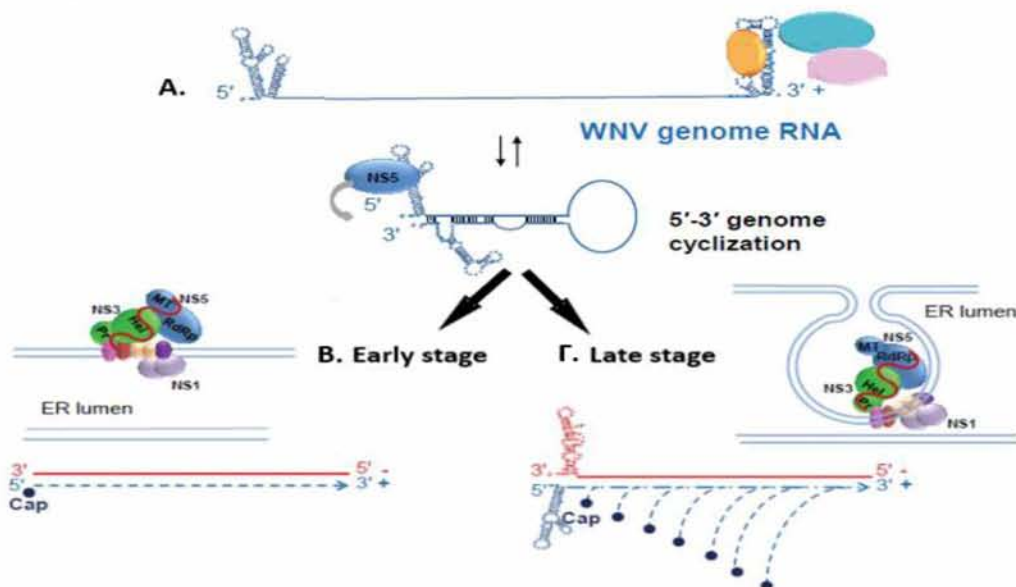
Η μετάφραση του RNA θετικής πολικότητας του ιού λαμβάνει χώρα στην επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου. Αρχικά, η 5' καλύπτρα τύπου I ($m^7GpppAm$) του RNA προσελκύει παράγοντες έναρξης της μετάφρασης που στρατολογούν την 40S υπομονάδα του ριβοσώματος, ενώ παρά την απουσία πολυA ουράς οι πρωτεΐνες πρόσδεσης στην πολυA ουρά αλληλεπιδρούν με τις περιοχές αλτήρα στην 3' UTR. Η 40S υπομονάδα του ριβοσώματος αναγνωρίζει το κωδικόνιο έναρξης AUG με την βοήθεια της δομής cHP καθοδικά του κωδικονίου. Μετά την στρατολόγηση της 60S υπομονάδας, το ριβόσωμα εκκινεί την μετάφραση συνθέτοντας μια ική πολυπρωτεΐνη που πέπτει σε συγκεκριμένα σημεία από κυτταρικές πρωτεάσες και

την ικής προέλευσης NS3 παράγοντας τις πρωτεΐνες C, pM, E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B και NS5 (Barrows. et al. 2018, Medigeshi 2011).

2.4 Αντιγραφή

Πρώτο βήμα για τη σύνθεση της αλυσίδας RNA αρνητικής πολικότητας είναι η μετάβαση του γραμμικού γονιδιώματος σε κυκλική μορφή που επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μακρινών τμημάτων 3'-5' RNA RNA (Εικόνα 22Α). Πιο συγκεκριμένα, αρχικά αλληλεπιδρούν τα τμήματα 5' και 3' CS, στη συνέχεια τα 5' και 3' DAR διευκολύνοντας την μακρινή αλληλεπίδραση των τμημάτων UAR που μαζί με την βοήθεια ορισμένων παραγόντων ξεδιπλώνουν τη 3' SL. Στη συνέχεια, στο 5' SLA προσδέεται η NS5 που με τη δράση της RNA εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης συνθέτει την αλυσίδα αρνητικής πολικότητας σχηματίζοντας δίκλωνο μόριο RNA (Brinton 2013).

Η αλυσίδα RNA αρνητικής πολικότητας λειτουργεί ως καλούπι για την παραγωγή αλυσίδων RNA θετικής πολικότητας. Πιο συγκεκριμένα, η αρνητικής πολικότητας αλυσίδα αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο αντιγραφής που βρίσκεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Η NS3 με την ενεργότητα ελικάσης ξεδιπλώνει το δίκλωνο RNA. Η NS5 προσδέεται στο 3' άκρο αλυσίδας αρνητικής πολικότητας και με καλούπι αυτή συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα θετικής πολικότητας. Παράλληλα, η NS3 με τη δράση 5' νουκλεοτιδικής τριφωσφατάσης αποφωσφορυλιώνει το 5' άκρο του θετικής πολικότητας RNA και ακολουθεί η προσθήκη της καλύπτρας τύπου I από NS5 που δρα ως γουανυλτρανσφεράση και μεθυλοτρανσφεράση. Ωστόσο, σε αρχικό στάδιο η σύνθεση είναι χαμηλή με τα επίπεδα των 2 αλυσίδων να είναι όμοια (Εικόνα 22Β). Σε μετέπειτα στάδιο, οι ικές πρωτεΐνες επάγουν τον σχηματισμό εγκολπώσεων στη μεμβράνη στις οποίες εντοπίζονται σύμπλοκα αντιγραφής. Στα έγκλειστρα που δημιουργούνται απομονώνονται οι κλώνοι RNA αρνητικής πολικότητας και η φάση σύνθεσης του γονιδιώματος (Εικόνα 22Γ) (Brinton 2013, Mazeaud et al. 2018)

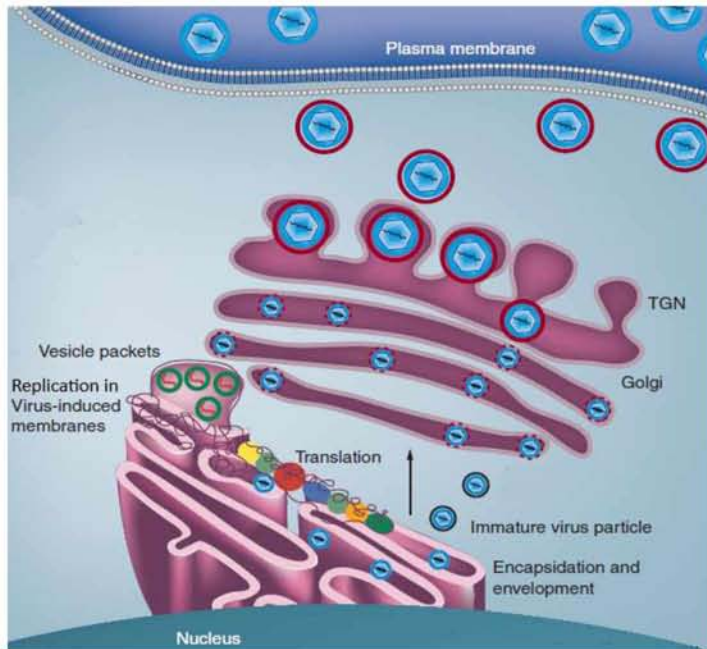


Τροποποίηση από Brinton Margo A. ,(2013), Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus, *Viruses* , 6, 13-53.

Εικόνα 22: Οι φάσεις της αντιγραφής του RNA γονιδιώματός του ιού του Δυτικού Νείλου. Α) Το γονιδίωμα εναλλάσσεται μεταξύ γραμμικής και κυκλικής μορφής με την κυκλική μορφή να λειτουργεί ως καλούπι για την αντιγραφή για την πρωτεΐνη NS5. Β) Σε αρχικό στάδιο αντιγραφής συντίθεται ο κλώνος αρνητικής πολικότητας από το σύμπλοκο αντιγραφής με πρότυπο το κλώνο θετικής πολικότητας με χαμηλούς ρυθμούς. Γ) Σε μεταγενέστερα στάδια αντιγραφής, η επαγωγή εγκολπώσεων στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου από τις μη δομικές πρωτεΐνες πυροδοτεί την σύνθεση του αρνητικού κλώνου με υψηλό ρυθμό. (Mazeaud et al. 2018)

2.5 Συναρμολόγηση, ωρίμανση και εκβλάστηση ιοσωματίων

Αρχικά, τα διμερή πρωτεΐνης C που βρίσκονται στη μεμβράνη ενδοπλασματικού δικτύου στην πλευρά του κυτταροπλάσματος αλληλεπιδρούν μέσω των θετικά φορτισμένων τμημάτων τους με το ιικό RNA επάγοντας τον σχηματισμό του νουκλεοκαψιδίου. Ακολουθεί στον αυλό του ενδοπλασματικού ο σχηματισμός πρώιμων ιοσωματίων στις περιοχές της μεμβράνης που συνεντοπίζονται οι πρωτεΐνες C, prM και E λόγω των αλληλουχιών σημάτων συνεντοπισμού που φέρουν. Οι πρωτεΐνες prM και E συγκροτούν σταθερά ετεροδιμερή στην μεμβράνη με την διάταξη αυτή να εμποδίζει την πρώιμη σύντηξη με την μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου ή του Golgi. Τα πρώιμα ιοσωμάτια φέρουν στην επιφάνεια τους τριμερείς αιχμές από ετεροδιμερή prM – E που αυξάνουν τη διάμετρο σε 60 nm από τα 50 nm που είναι στα ώριμα. Μεταφέρονται στο Golgi όπου οι prM, E και NS1 υφίσταται γλυκοσυλίωση και στη συνέχεια προωθούνται στο trans Golgi δίκτυο. Έπειτα, τα ετεροδιμερή prM–E αλλάζουν διαμόρφωση λόγω του όξινου pH εκθέτοντας στην prM την περιοχή αναγνώρισης από την πρωτεάση φουρίνη με αποτέλεσμα να την πέπτει παράγοντας την πρωτεΐνη M και το πεπτίδιο pr που παραμένει προσδεδεμένο στην E αποτρέποντας την σύντηξη κατά την εξωκύττωση. Ακόμα, η πέψη αυτή πυροδοτεί την αναδιάταξη και περιστροφή των ομοδιμερών πρωτεΐνης E ώστε να είναι αντιπαράλληλα και να σχηματίσουν εικοσάεδρη συμμετρία στην εξωτερική πλευρά του φακέλου ολοκληρώνοντας την ωρίμανση των μολυσματικών, πλέον, ιοσωματίων. Τέλος, τα ιοσωμάτια μεταφέρονται μέσω κυστιδίων στην πλασματική μεμβράνη, εκκρίνονται μέσω εξωκύττωσης και μολύνουν εκ νέου κύτταρα στόχους (Εικόνα 23) (Medigeshi, 2011).



Εικόνα 23: Συναρμολόγηση, ωρίμανση και εκβλάστηση σωματίων ιού Δυτικού Νείλου. Μετά την υψηλή παραγωγή κλώνων RNA θετικής πολικότητας στις εγκοιλώσεις του ενδοπλασματικού δικτύου και δομικών πρωτεϊνών, πρώιμα ιοσωμάτια συναρμολογούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Μεταφέρονται στο Golgi που υφίσταται που υφίσταται γλυκοσυλίωση και στη συνέχεια στο trans Golgi που υφίσταται δομικές αλλαγές με αποτέλεσμα την ωρίμανση τους. Εξέρχονται από το κύτταρο μέσω εκβλάστησης.

Τροποποίηση από Medigeshi Guruprasad R.,(2011), Mosquito-borne flaviviruses overview of viral life cycle and host-virus interactions, *Future Virology*, 6 (9), 1075–1089.

Βιβλιογραφία

1. Añez, G., Grinev, A., Chancey, C., Ball, C., Akolkar, N., Land, K. J., Winkelman, V., Stramer, S. L., Kramer, L. D., & Rios, M. (2013). Evolutionary dynamics of West Nile virus in the United States, 1999-2011: phylogeny, selection pressure and evolutionary time-scale analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, *7*(5), e2245.
2. Bai, F., Thompson, E. A., Vig, P., & Leis, A. A. (2019). Current Understanding of West Nile Virus Clinical Manifestations, Immune Responses, Neuroinvasion, and Immunotherapeutic Implications. *Pathogens*, *8*(4), 193.
3. Barrows, N. J., Campos, R. K., Liao, K. C., Prasanth, K. R., Soto-Acosta, R., Yeh, S. C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O. M., Bradrick, S. S., & Garcia-Blanco, M. A. (2018). Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chemical reviews*, *118*(8), 4448–4482.
4. Barzon, L., Pacenti, M., Franchin, E., Pagni, S., Martello, T., Cattai, M., Cusinato, R., & Palù, G. (2013). Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *The Journal of infectious diseases*, *208*(7), 1086–1092.
5. Barzon, L., Pacenti, M., Ulbert, S., & Palù, G. (2015). Latest developments and challenges in the diagnosis of human West Nile virus infection. *Expert review of anti-infective therapy*, *13*(3), 327–342.
6. Blitvich Bradley J., (2008), Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile Virus, *Animal Health Research Reviews*, *9* (1), 71–86.
7. Botha, E. M., Markotter, W., Wolfaardt, M., Paweska, J. T., Swanepoel, R., Palacios, G., Nel, L. H., & Venter, M. (2008). Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging infectious diseases*, *14*(2), 222–230.
8. Brinton Margo A. ,(2013), Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus , *Viruses* , *6*, 13-53.
9. Byas Alex D. and Ebel Gregory D., (2020), Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals, *Pathogens*, *9*(1), 48
10. Chaintoutis, S. C., Papa, A., Pervanidou, D., & Dovas, C. I. (2019). Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004-2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Molecular phylogenetics and evolution*, *141*, 106617.
11. Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., & Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *BioMed research international*, 376230.
12. Ciota Alexander T., (2017), West Nile virus and its vectors, *Current opinion in Insect Direct*, *22*, 28-36.
13. Close, D. M., Ripp, S., & Sayler, G. S. (2009). Reporter proteins in whole-cell optical bioreporter detection systems, biosensor integrations, and biosensing applications. *Sensors*, *9*(11), 9147–9174.
14. De Filette, M., Ulbert, S., Diamond, M., & Sanders, N. N. (2012). Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Veterinary research*, *43*(1), 16

15. Deubel, V., Kinney, R. M., & Trent, D. W. (1988). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the nonstructural proteins of dengue type 2 virus, Jamaica genotype: comparative analysis of the full-length genome. *Virology*, *165*(1), 234–244.
16. Docherty, D. E., Long, R. R., Griffin, K. M., & Saito, E. K. (2004). Corvidae feather pulp and West Nile virus detection. *Emerging infectious diseases*, *10*(5), 907–909.
17. Ferraris, P., Yssel, H., & Missé, D. (2019). Zika virus infection: an update. *Microbes and infection*, *21*(8-9), 353–360.
18. Green, A. A., Silver, P. A., Collins, J. J., & Yin, P. (2014). Toehold switches: de-novo-designed regulators of gene expression. *Cell*, *159*(4), 925–939.
19. Grubaugh, N. D., Fauver, J. R., Rückert, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S., Murrieta, R. A., Gendernalik, A., Smith, D. R., Brackney, D. E., & Ebel, G. D. (2017). Mosquitoes Transmit Unique West Nile Virus Populations during Each Feeding Episode. *Cell reports*, *19*(4), 709–718.
20. Grubaugh Nathan D. and Ebel Gregory D., (2017), Dynamics of West Nile virus evolution in mosquito vectors, *Current opinion in virology*, *21*, 132-238.
21. Guzman M. G., & Harris, E., (2015), Dengue, *Lancet*, *385*(9966), 453–465.
22. Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegrino, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., & Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, *8*(12 Suppl), S7–S16.
23. Jiang, T., Xing, B., & Rao, J. (2008). Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, *25*, 41–75.
24. Koenraadt, C., Möhlmann, T., Verhulst, N. O., Spitzen, J., & Vogels, C. (2019). Effect of overwintering on survival and vector competence of the West Nile virus vector *Culex pipiens*. *Parasites & vectors*, *12*(1), 147.
25. Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R., & Bunning, M. (2003). Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerging infectious diseases*, *9*(3), 311–322.
26. Kramer, L. D., Styer, L. M., & Ebel, G. D. (2008). A global perspective on the epidemiology of West Nile virus. *Annual review of entomology*, *53*, 61–81.
27. Lim, S. M., Brault, A. C., van Amerongen, G., Bosco-Lauth, A. M., Romo, H., Sewbalaksing, V. D., Bowen, R. A., Osterhaus, A. D., Koraka, P., & Martina, B. E. (2015). Susceptibility of Carrion Crows to Experimental Infection with Lineage 1 and 2 West Nile Viruses. *Emerging infectious diseases*, *21*(8), 1357–1365.
28. Lustig, Y., Mannasse, B., Koren, R., Katz-Likvornik, S., Hindiyeh, M., Mandelboim, M., Dovrat, S., Sofer, D., & Mendelson, E. (2016). Superiority of West Nile Virus RNA Detection in Whole Blood for Diagnosis of Acute Infection. *Journal of clinical microbiology*, *54*(9), 2294–2297.

29. Lustig, Y., Sofer, D., Bucris, E. D., & Mendelson, E. (2018). Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2421.
30. Malavige, G. N., Fernando, S., Fernando, D. J., & Seneviratne, S. L. (2004). Dengue viral infections. *Postgraduate medical journal*, *80*(948), 588–601.
31. Mazeaud, C., Freppel, W., & Chatel-Chaix, L. (2018). The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Frontiers in genetics*, *9*, 595.
32. Mann, B. R., McMullen, A. R., Swetnam, D. M., & Barrett, A. D. (2013). Molecular epidemiology and evolution of West Nile virus in North America. *International journal of environmental research and public health*, *10*(10), 5111–5129.
33. McMullen, A. R., Albayrak, H., May, F. J., Davis, C. T., Beasley, D., & Barrett, A. (2013). Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *The Journal of general virology*, *94*(2), 318–325.
34. Medigeshi Guruprasad R., (2011), Mosquito-borne flaviviruses overview of viral life cycle and host-virus interactions, *Future Virology*, *6* (9), 1075–1089.
35. Napp, S., Petrić, D., & Busquets, N. (2018). West Nile virus and other mosquito-borne viruses present in Eastern Europe. *Pathogens and global health*, *112*(5), 233–248.
36. Niedrig, M., Patel, P., El Wahed, A. A., Schädler, R., & Yactayo, S. (2018). Find the right sample: A study on the versatility of saliva and urine samples for the diagnosis of emerging viruses. *BMC infectious diseases*, *18*(1), 707.
37. Papa, A., Bakonyi, T., Xanthopoulou, K., Va' zquez, A., Tenorio, A. & Nowotny, N. (2011). Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010. *Emerg Infect Dis* *17*, 920–922.
38. Pardee, K., Green, A. A., Ferrante, T., Cameron, D. E., DaleyKeyser, A., Yin, P., & Collins, J. J. (2014). Paper-based synthetic gene networks. *Cell*, *159*(4), 940–954.
39. Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., & Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, *165*(5), 1255–1266.
40. Rossetti M, Del Grosso E, Ranallo S, et al. Programmable RNA-based systems for sensing and diagnostic applications. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411(19):4293-4302.
41. Sambri, V., Capobianchi, M. R., Cavrini, F., Charrel, R., Donoso-Mantke, O., Escadafal, C., Franco, L., Gaibani, P., Gould, E. A., Niedrig, M., Papa, A., Pierro, A., Rossini, G., Sanchini, A., Tenorio, A., Varani, S., Vázquez, A., Vocale, C., & Zeller, H. (2013). Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies. *Viruses*, *5*(10), 2329–2348.
42. Sejvar James J., (2016), West Nile Virus Infection, *Microbiology Spectrum*, *4*:3:EI10-0021-2016.

43. Sharma, S., Tandel, K., Dash, P. K., & Parida, M. (2017). Zika virus: A public health threat. *Journal of medical virology*, 89(10), 1693–1699.
44. Shoba David & Asha Mary Abraham (2016): Epidemiological and clinical aspects on West Nile virus, a globally emerging pathogen, *Infectious Diseases*, 48(8), 571-586.
45. Sinumvayo, J. P., Zhao, C., & Tuyishime, P. (2018). Recent advances and future trends of riboswitches: attractive regulatory tools. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(11), 171.
46. Stepanenko, O. V., Verkhusha, V. V., Kuznetsova, I. M., Uversky, V. N., & Turoverov, K. K. (2008). Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: throwing color lights on molecular and cellular processes. *Current protein & peptide science*, 9(4), 338–369.
47. Suthar, M. S., Diamond, M. S., & Gale, M., Jr (2013). West Nile virus infection and immunity. *Nature reviews. Microbiology*, 11(2), 115–128.
48. Tan Alvin, M. J., Gaunt, M. W., Hibberd, M. L., & Furnham N., (2017), The complex relationship between the emerging flaviviruses: Dengue and Zika, *Biochemist*, 39(3), 18-2.
49. Takahashi, M. K., & Lucks, J. B. (2013). A modular strategy for engineering orthogonal chimeric RNA transcription regulators. *Nucleic acids research*, 41(15), 7577–7588.
50. Tinafar, A., Jaenes, K., & Pardee, K. (2019). Synthetic Biology Goes Cell-Free. *BMC biology*, 17(1), 64.
51. Yun S. I. & Lee Y. M., (2017), Zika virus: An emerging Flavivirus, *Journal of microbiology*, 55(3), 204–219.
52. <https://eody.gov.gr/disease/ios-toy-dytikoy-neiloy/> τελευταία πρόσβαση στις 2/5/2020
53. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-infection-annual-epidemiological-report-2018> τελευταία πρόσβαση στις 13/04/2020