

Χριστίνα Κοτταρίδη

ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ECHO ΙΩΝ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Εφαρμοσμένης Μικροβιολογίας με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΚΩΝ/ΝΟΣ ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ: Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΔΗΜΗΤΡΗΣ ΚΟΥΡΕΤΑΣ: Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΜΗΝΑΣ ΑΡΣΕΝΑΚΗΣ: Καθηγητής Μικροβιολογίας εκτός Ιατρικής Μικροβιολογίας, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΝΙΚΟΣ ΚΑΤΗΣ: Καθηγητής Ιολογίας Φυτών, Γεωπονική Σχολή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

ΑΝΤΩΝΙΟΣ ΜΑΝΙΑΤΗΣ: Καθηγητής Μικροβιολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Περίληψη

Η οικογένεια των Picorna ιών αποτελείται από 6 γένη τα οποία συγκεντρώνουν μικρούς μη ελυτροφόρους RNA-ιούς θετικής πολικότητας με αρκετά παθογόνα για τον άνθρωπο στελέχη. Οι Echo ιοί ανήκουν στο γένος των

εντεροϊών το οποίο είναι το πιο σημαντικό ως προς τις ασθένειες που προκαλούν τα μέλη του στον άνθρωπο και αποτελείται από 64 ορότυπους. Οι ορότυποι αυτοί σήμερα ταξινομούνται με βάση μοριακά και βιολογικά δεδομένα στα παρακάτω πέντε είδη: (i) PV (πολιοϊοί 1-3), (ii) HEV-A (CAV2-8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 και EV71), (iii) HEV-B (CAV9, CBV1-6, όλοι οι echo ιοί και ο EV69), (iv) HEV-C (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17-22 και CAV24) και (v) HEV-D (EV68 και EV70). Το γονιδίωμα όλων των Picorna ιών είναι ένα μονόκλωνο RNA μόριο, θετικής πολικότητας, το οποίο έχει μήκος 7,4-7,5 Kb. Στους εντεροϊούς, διακρίνονται από το 5' άκρο προς το 3' άκρο, η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), στην οποία βρίσκεται ομοιοπολικά συνδεδεμένη η πρωτεΐνη VPg, ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame - ORF), μήκους περίπου 2100 κωδικονίων, από το οποίο κωδικοποιείται μια πολυπρωτεΐνη, που στη συνέχεια πρωτεολύεται από ιικές πρωτεάσες για να προκύψουν οι δομικές και λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού και τέλος μία 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR), που καταλήγει σε πολυαδενυλιωμένη ουρά - περιοχή (poly-A tract). Η P1 περιοχή της πολυπρωτεΐνης κωδικοποιεί για τις δομικές-καψιδιακές πρωτεΐνες VP4, VP2, VP3 και VP1, και ακολουθούν η πρωτεάση 2A^{pro} και οι πρωτεΐνες 2B και 2C (συμμετέχουν στην αντιγραφή του RNA) που κωδικοποιούνται από την P2 περιοχή. Τέλος η P3 περιοχή περιλαμβάνει την πρωτεΐνη 3AB, την ιική πρωτεάση 3C^{pro} και την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol}.

Οι κλασσικές μέθοδοι για την ανίχνευση και τον χαρακτηρισμό των εντεροϊών, βασίζονται στην απομόνωση του ιού μέσω κυτταροκαλλιέργειας, και στην εξουδετέρωση της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών με ειδικούς ως προς τον κάθε ορότυπο αντι-ορούς. Η ορολογική διάγνωση των λοιμώξεων από εντεροϊούς, είναι αρκετά πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών, ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου και του μεγάλου αριθμού οροτύπων. Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής-Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (RT-PCR) παρέχει ένα άμεσο και ευαίσθητο μέσο για την ανίχνευση γενετικού υλικού των εντεροϊών σε κλινικά δείγματα και χρησιμοποιείται επιτυχώς για να ανιχνεύσει και αυτούς τους οροτύπους που δεν μπορούν να πολλαπλασιαστούν

σε κυτταρικές σειρές, όπως επίσης και για τα μη ταυτοποιήσιμα με τις συμβατικές μεθόδους στελέχη.

Σκοπός της παρούσας μελέτης υπήρξε, αρχικά, η ανάλυση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος των Echo ιών (προτύπων και κλινικών στελεχών) από άποψη καταλληλότητας για τη διάγνωση αυτών. Στη συνέχεια, κάποιες από τις περιοχές των κλινικών στελεχών, που πολλαπλασιάστηκαν με την χρήση ειδικών εκκινήτων, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως προς την πρωτοταγή τους διάταξη. Με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής, επιχειρήθηκε η νουκλεοτιδική και φυλογενετική μελέτη των αλληλουχημένων γενετικών περιοχών, με στόχο τη διερεύνηση των σχέσεων, που επικρατούν τόσο μεταξύ των κλινικών όσο και μεταξύ κλινικών και προτύπων στελεχών σε δομικές (VP1) και λειτουργικές (2A, 2B, 2C, 3D) περιοχές του γενώματος του ιού. Αποδείχθηκε ότι υπάρχει άμεση συσχέτιση του γονότυπου με τον ορότυπο τόσο στο 5' όσο και στο 3' άκρο του γονιδίου VP1 η οποία διακόπτεται στα γειτονικά μη-δομικά γονίδια, ενώ όσο η αλληλούχιση προχωρά προς το 3' τμήμα του γενώματος των Echo ιών, τόσο τα κλινικά στελέχη απομακρύνονται εξελικτικά από τα πρότυπα και παρουσιάζουν ενδείξεις ανασυνδυασμού με άλλα κλινικά τα οποία έχουν απομονωθεί ανεξάρτητα τοπολογικά και χρονικά.