



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ  
πρόγραμμα για την ανάπτυξη

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

## **Μοριακή διάγνωση ιών**

### 1. Βασικές αρχές Μοριακής Ιολογίας - Η πολυπλοκότητα των ιικών γενομάτων

#### **( 1 ώρα) (Μαρκουλάτος)**

- Σχηματισμός Ιϊκών Σωματιδίων.
- Συμμετρία Καψιδίων και Αρχιτεκτονική Ιών.
- Ελυτροφόροι ιοί.
- Τροπισμός.
- Υποδοχείς, Διείσδυση ιών στον ξενιστή.
- Συναρμολόγηση ιϊκού σωματιδίου, απελευθέρωση, ωρίμανση.

### 2. DNA ιοί (1 ώρα) (Μαρκουλάτος)

- Ιοί με δίκλωνο DNA.
- Ιοί με μονόκλωνο DNA.
- Ιοί με δίκλωνο DNA και ενδιάμεσο RNA.
- Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση, Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή.

### 3. RNA ιοί (1 ώρα) (Μαρκουλάτος)

- Ιοί με δίκλωνο RNA.
- Ιοί με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας.
- Ιοί με μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας.
- Ιοί με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και ενδιάμεσο DNA.
- Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή

### 4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ιών (1 ώρα) (Μαρκουλάτος)

- Τεχνικές: Κυτταροκαλλιέργειες, ανίχνευση ιών, ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ιών
- Real Time PCR, NASBA, LCR, bDNA



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

# Μοριακή διάγνωση ιών

## 1. Βασικές αρχές Μοριακής Ιολογίας - Η πολυπλοκότητα των ιικών γενωμάτων

Σχηματισμός Ιικών Σωματιδίων.

Συμμετρία Καψιδίων και Αρχιτεκτονική Ιών.

Ελυτροφόροι ιοί.

Τροπισμός.

Υποδοχείς. Διείσδυση ιών στον ξενιστή.

Συναρμολόγηση ιικού σωματιδίου, απελευθέρωση, ωρίμανση.

## 2. DNA ιοί

Ιοί με δίκλωνο DNA.

Ιοί με μονόκλωνο DNA.

Ιοί με δίκλωνο DNA και ενδιάμεσο RNA.

Αντιγραφή, Μεταγραφή, Μετάφραση, Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή.

## 3. RNA ιοί

Ιοί με δίκλωνο RNA.

Ιοί με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας.

Ιοί με μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας.

Ιοί με μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας και ενδιάμεσο DNA.

Έλεγχος της γονιδιακής έκφρασης του ξενιστή

## 4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ιών

Τεχνικές: Κυτταροκαλλιέργειες, ανίχνευση ιών, ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ιών  
Real Time PCR, NASBA, LCR, bDNA

## ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

Η βασική λειτουργία του εξωτερικού περιβλήματος του στελέχους ενός ιού είναι να προστατεύει το εύθραυστο γένωμα νουκλεϊκού οξέως από την φυσική, χημική ή ενζυμική καταστροφή. Ο ιός μόλις αφήσει το κύτταρο ξενιστή εισέρχεται σε ένα εχθρικό περιβάλλον το οποίο μπορεί γρήγορα να αδρανοποιήσει το απροστάτευτο γένωμα του . Τα νουκλεϊκά οξέα είναι ευπαθή σε φυσικούς παράγοντες καθώς επίσης και στην χημική τροποποίηση μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας ( ηλιακή ακτινοβολία).

Το φυσικό περιβάλλον των ιών είναι πολύ φορτωμένο με νουκλεάσες προερχόμενες από νεκρά κύτταρα ή εκκρινόμενες από τα σπονδυλωτά ως άμυνα ενάντια στην λοίμωξη .

Οι υπομονάδες των πρωτεϊνών στο καψίδιο ενός ιού υπάρχουν σε πολλαπλά αντίγραφα. Η καταστροφή σε μια ή σε περισσότερες υπομονάδες ίσως να καθιστά αυτή την συγκεκριμένη υπομονάδα μη- λειτουργική , αλλά σπάνια περιορισμένη καταστροφή οδηγεί στην απώλεια της ικανότητας λοίμωξης του συγκεκριμένου στελέχους. Η εξωτερική επιφάνεια του ιού είναι επίσης υπεύθυνη για την αναγνώριση και για την πρώτη αλληλεπίδραση με το κύτταρο ξενιστή μέσω του κατάλληλου υποδοχέα του. Το καψίδιο έχει επίσης συμμετοχή στην έναρξη της μόλυνσης μέσω κατάλληλης παρουσίασης του γενώματος σε τέτοια μορφή ώστε να είναι αναγνωρίσιμη από το κύτταρο ξενιστή.

Για να σχηματισθούν μεταδοτικά στελέχη, οι ιοί πρέπει να ξεπεράσουν δυο βασικά προβλήματα. Πρώτον, πρέπει να συναρμολογήσουν το ιικό σωματίδιο σωστά χρησιμοποιώντας την διαθέσιμη γενετική πληροφορία και δεύτερον, να σχηματίσουν κανονικά γεωμετρικά σχήματα, παρόλο που οι πρωτεΐνες από τις οποίες συνίστανται οι πρωτεϊνικές υπομονάδες έχουν ακανόνιστα σχήματα. Οι λύσεις και στα δυο ανωτέρω προβλήματα βασίζονται στους κανόνες της συμμετρίας.

## ΣΥΜΜΕΤΡΙΑ ΚΑΨΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΥ ΙΟΥ

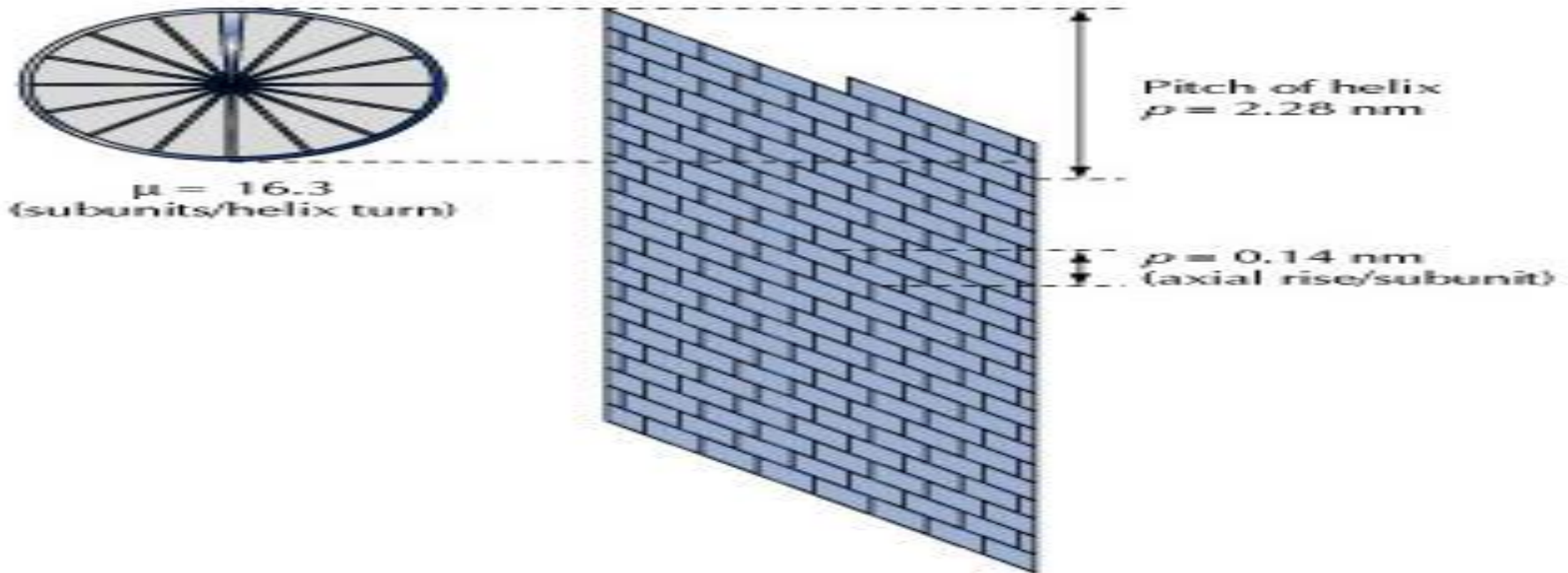
Η τριπλή φύση του γενετικού κώδικα σημαίνει ότι τρία νουκλεοτίδια (ή τρία ζεύγη βάσεων στην περίπτωση των ιών με δίκλινα γενώματα) είναι απαραίτητα για την κωδικοποίηση ενός αμινοξέως. Οι ιοί δεν μπορούν, βέβαια, να χρησιμοποιήσουν κάποιον εναλλακτικό, πιο οικονομικό, γενετικό κώδικα διότι αυτός δεν θα μπορούσε να αποκρυπτογραφηθεί από το κύτταρο ξενιστή. Αφού το κατά προσέγγιση μοριακό βάρος ενός τριπλού νουκλεοτιδίου είναι 1000 και ο μέσος όρος του μοριακού βάρους ενός αμινοξέως είναι 150, ένα νουκλεϊκό οξύ μπορεί μόνο να κωδικοποιήσει μια πρωτεΐνη που είναι κατά μέγιστο το 15% του δικού του βάρους. Επομένως, τα καψίδια του ιού πρέπει να φτιάχνονται από πολλαπλά αντίγραφα πρωτεϊνικών μορίων (δομική υπομονάδα κατασκευής).

Οι δυνάμεις οι οποίες καθορίζουν την συναρμολόγηση των πρωτεϊνικών υπομονάδων και συμβάλλουν στο να κρατήσουν μαζί τις πολλαπλές υπομονάδες περιλαμβάνουν υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές έλξεις και σπανίως δεσμούς σθένους. Τα ιικά σωματίδια παρουσιάζουν ένα σύνολο έλξεων, πρωτεΐνης-πρωτεΐνης, πρωτεΐνης-νουκλεϊκού οξέως και πρωτεΐνης-λιπιδίων.

## ΕΛΙΚΟΕΙΔΗ ΚΑΨΙΔΙΑ

Ο ιός Tobacco mosaic (TMV) είναι αντιπροσωπευτικός μιας από τις δυο βασικές δομικές τάξεις που έχουν παρατηρηθεί σε ιούς, σε αυτούς με ελικοειδή συμμετρία. Ο απλούστερος τρόπος να τακτοποιήσει τις πολλαπλές όμοιες πρωτεϊνικές υπομονάδες του είναι να χρησιμοποιηθεί η περιστρεφόμενη συμμετρία και να τακτοποιήσει τις ακανόνιστες ως προς το σχήμα πρωτεΐνες του γύρω από την περιφέρεια ενός κύκλου σχηματίζοντας έναν δίσκο. Πολλαπλοί δίσκοι μπορούν τότε να τοποθετηθούν ο ένας πάνω στον άλλο και να σχηματίσουν έναν κύλινδρο, με το γένωμα του ιού να καλύπτει το εσωτερικό του κυλίνδρου.

Μια έλικα μπορεί να ορισθεί μαθηματικά από δυο παραμέτρους: την διάμετρο και το ύψος (την απόσταση που καλύπτει μια ολοκληρωμένη περιστροφή κάθε γύρου της



Στα πλαίσια των πρωτεϊνικών υπομονάδων, οι έλικες περιγράφονται από τον αριθμό υπομονάδων ανά πλήρους περιστροφής της έλικας, ως  $\mu$ , και η αύξηση ύψους ανά υπομονάδα ως  $\rho$ .

Το ύψος μιας πλήρους περιστροφής της έλικας,  $P$ , είναι επομένως ισοδύναμο με:  
$$P = \mu \times \rho$$

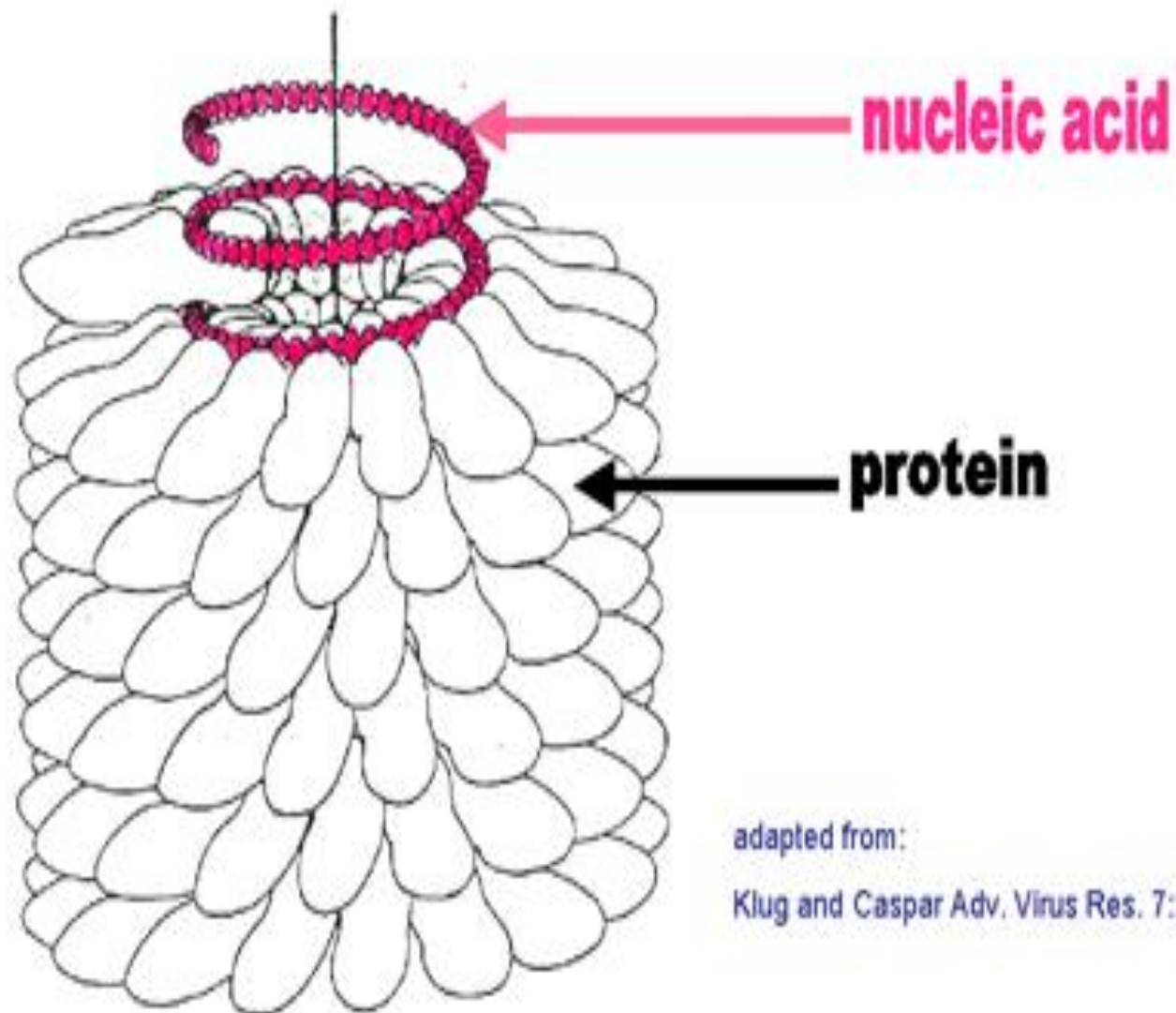
Για τον TMV,  $\mu = 16.3$ , δηλ. υπάρχουν 16.3 πρωτεϊνικές υπομονάδες ανά γύρο έλικας, και  $\rho = 0.14$  nm. Επομένως, το ύψος του TMV ανά έλικα είναι  $16.3 \times 0.14 = 2.28$  nm. Τα TMV ιικά σωματίδια είναι άκαμπτες, ραβδοειδείς δομές και αποτελούν ένα εξαιρετικά απλό τρόπο συναρμολόγησης μιας απλής πρωτεϊνικής υπομονάδας για να σχηματισθεί ένα ιικό σωματίδιο.

Πολλοί ιοί φυτών παρουσιάζουν ελικοειδή συμμετρία το μήκος των οποίων σωματιδίων ποικίλλει από 100 nm (Tobravirus) έως 1000 nm (Closterovirus).

Υπάρχουν πολυάριθμοι ιοί ζώων που παρουσιάζουν επίσης ελικοειδή συμμετρία, αλλά όλοι επιπλέον έχουν την προσθήκη ενός εξωτερικού λιπιδικού περιβλήματος.



# TOBACCO MOSAIC VIRUS



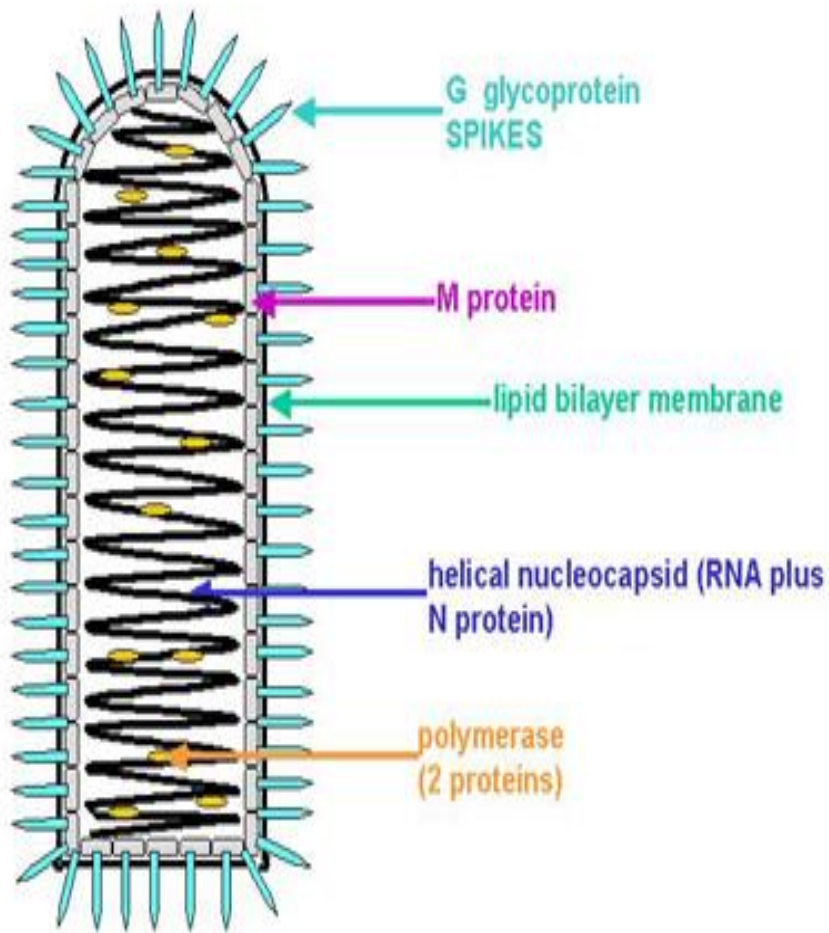
adapted from:

Klug and Caspar Adv. Virus Res. 7:225

Στην κατηγορία των ιικών σωματιδίων με ελικοειδή δομή κατατάσσονται ο ιός της Γρίππης (influenza-Orthomyxoviridae), οι ιοί της Παρωτίτιδας ( mumps ) και της Ιλαράς ( measles-Paramyxoviridae) και ο ιός της Λύσας (Rabies-Rhabdoviridae). Όλοι έχουν μονόκλινα, αρνητικής πολικότητας (negative-sense ) RNA γενώματα.

Το νουκλεϊκό οξύ του ιού συνδέεται με μια βασική πρωτεΐνη και σχηματίζει το ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο. Το σύμπλοκο πρωτεΐνης-RNA εξυπηρετεί την προστασία του εύθραστου γενώματος του ιού από φυσικούς και χημικούς παράγοντες.

Το περίβλημα του ιού και οι συσχετιζόμενες με αυτό πρωτεΐνες προέρχονται από τις μεμβράνες του κυττάρου ξενιστή και προσθέτονται στο νουκλεοκαψίδιο του ιού.



Τα ιικά σωματίδια των ραβδοϊών ( Rhabdovirus ), έχουν ένα εσωτερικό ελικοειδές νουκλεοκαψίδιο που περιβάλλεται από ένα εξωτερικό λιπιδικό περίβλημα και από γλυκοπρωτεΐνες.

Το γένωμα των ραβδοϊών ( rhabdoviruses ) είναι περίπου 11000 νουκλεοτίδια (11 kilobases, 11 kb) . Το RNA γένωμα και η βασική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου (N)

αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν μια ελικοειδή δομή ύψους περίπου 5 nm, τα οποία, μαζί με δυο μη-δομικές πρωτεΐνες, L και NS (οι οποίες σχηματίζουν την πολυμεράση του ιού) σχηματίζουν τον πυρήνα του ιού. Δημιουργούνται περίπου 30-35 περιστροφές της νουκλεοπρωτεϊνικής έλικας στον πυρήνα του σωματιδίου , το οποίο είναι μήκους 180 nm και διαμέτρου 80 nm . Τα πρωτεϊνικά μονομερή N είναι κατά προσέγγιση  $9 \times 5 \times 3$  nm και καθένα καλύπτει περίπου εννιά νουκλεοτίδια του RNA γενώματος.

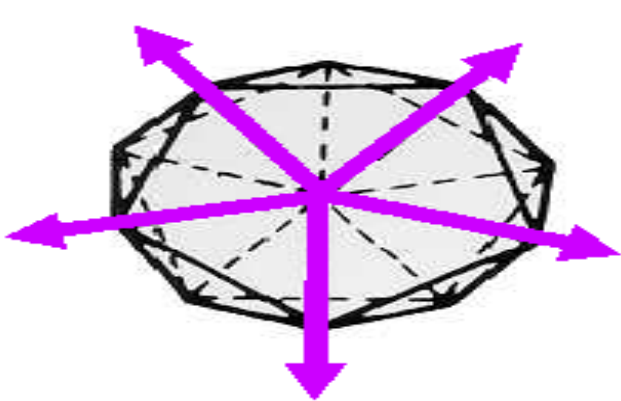
**Ο ρόλος της N πρωτεΐνης είναι να σταθεροποιεί το RNA και να το προστατεύει από χημική, φυσική και ενζυμική καταστροφή. Όπως με τους περισσότερους ιούς με εξωτερικό περίβλημα, το νουκλεοκαψίδιο περιβάλλεται από ένα άμορφο επίστρωμα το οποίο αλληλεπιδρά τόσο με τον πυρήνα του ιικού σωματιδίου όσο και με το υπερκείμενο λιπιδό-πρωτεϊνικό εξωτερικό περίβλημα. Η δομή αυτή είναι γνωστή και ως μήτρα. Η πρωτεΐνη της μήτρας (M) είναι συνήθως η πιο άφθονη πρωτεΐνη στο στέλεχος του ιού: για παράδειγμα, υπάρχουν περίπου 1800 αντίγραφα της M πρωτεΐνης και περίπου 1250 αντίγραφα της N πρωτεΐνης στον ιό VSV.**

**Ιοί με μικρά γενώματα χρησιμοποιούν αυτήν την αρχιτεκτονική για να προστατεύσουν το γένωμα χωρίς την ανάγκη κωδικοποίησης πολλαπλών καψιδιακών πρωτεϊνών**

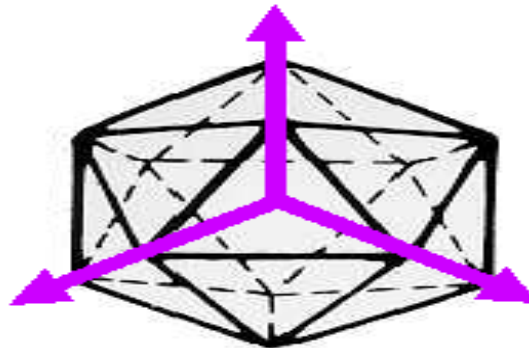
## ΕΙΚΟΣΑΕΔΡΙΚΑ ΚΑΨΙΔΙΑ

Ένας εναλλακτικός τρόπος για να κατασκευαστεί ένα καψίδιο ιού είναι να συναρμολογηθούν οι πρωτεΐνες των υπομονάδων υπό μορφής μιας σχεδόν σφαιρικής δομής στο κέντρο της οποίας θα , περικλείεται το γένωμα. Θεωρητικά, πολλά σταθερά σχήματα μπορούν να κατασκευασθούν από επαναλαμβανόμενες υπομονάδες, όπως π,χ. ένα τετράεδρο (τέσσερις τριγωνικές επιφάνειες), ένας κύβος (έξι τετράγωνες επιφάνειες), ένα οχτάεδρο (οχτώ τριγωνικές επιφάνειες) κ.λ.π.. Ένα εικοσάεδρο αποτελείται από 20 τριγωνικές επιφάνειες οι οποίες τοποθετούνται γύρω από την επιφάνεια μιας σφαίρας .

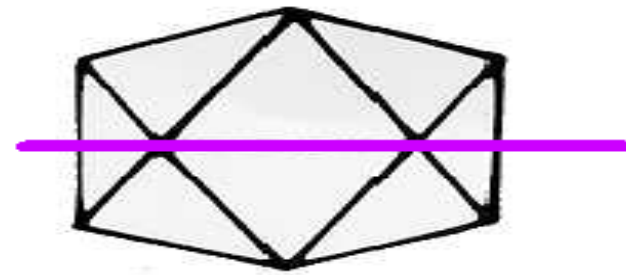
## ICOSAHEDRAL SYMMETRY



**5-FOLD**



**3-FOLD**



**2-FOLD**

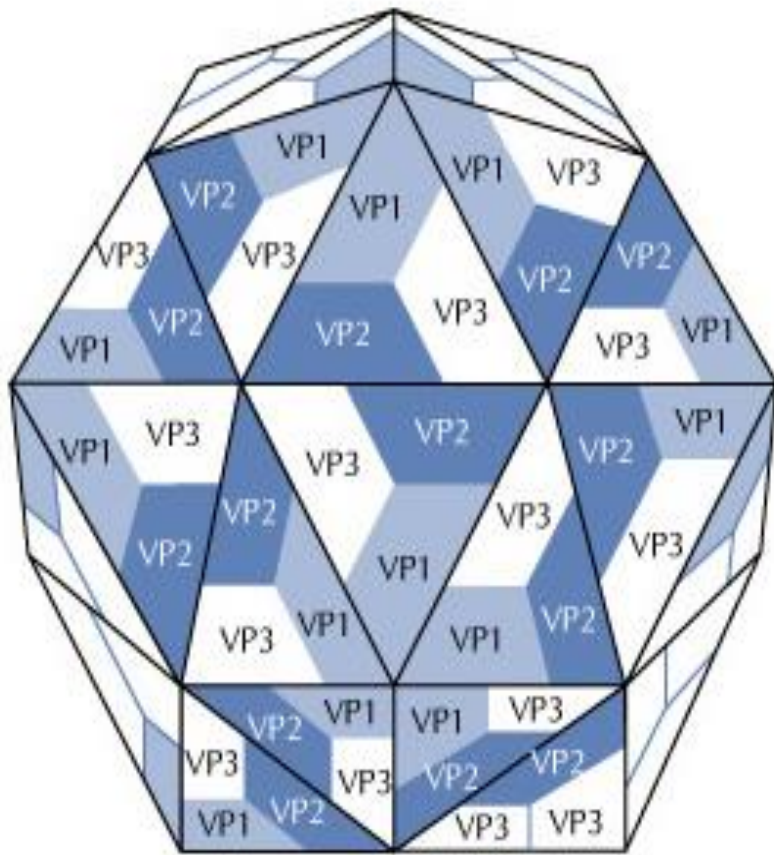
Σε αρκετές περιπτώσεις, η ανάλυση αποκαλύπτει ότι τα εικοσάεδρα καψίδια περιέχουν περισσότερα από 60 υπομονάδες. Ένα κανονικό εικοσάεδρο που αποτελείται από 60 όμοιες υπομονάδες είναι μια πολύ σταθερή δομή επειδή όλες οι υπομονάδες κατέχουν τον ίδιο χώρο και καθεμία ευρίσκεται στην κατάσταση της ελάχιστης ελεύθερης ενέργειας. Όταν το καψίδιο έχει περισσότερες από 60 υπομονάδες είναι δύσκολο να τοποθετηθούν οι υπομονάδες με απόλυτα συμμετρικό τρόπο και στην περίπτωση αυτή δημιουργούνται υψηλότερης τάξης εικοσάεδρα και η συμμετρία του ιικού σωματιδίου ορίζεται από τον αριθμό  $T$  ( triangulation number ) του εικοσάεδρου .

Ο αριθμός,  $T$ , ορίζεται ως

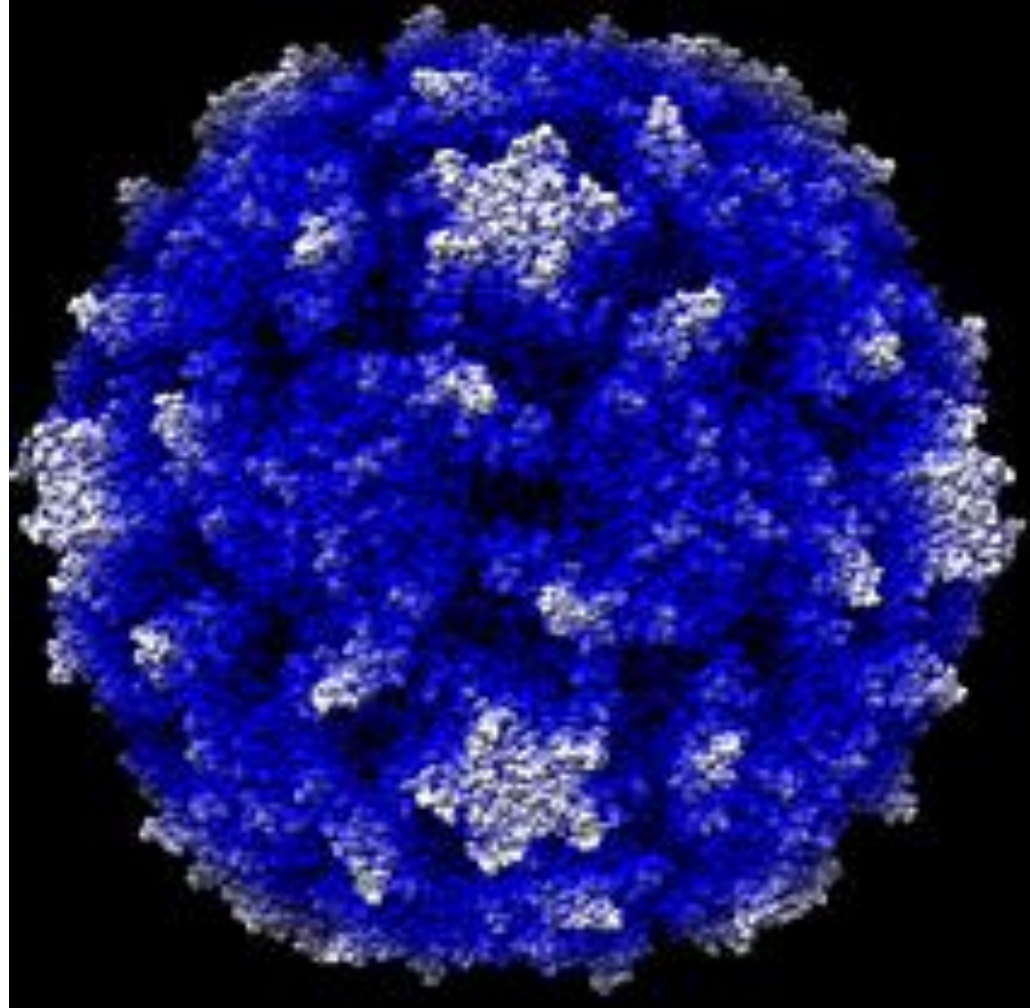
$$T = f_2 \times P$$

Το  $f_2$  είναι επομένως ο αριθμός των υπο-τριγώνων σε κάθε επιφάνεια και το  $T$  παίρνει τιμές 1, 3, 4, 7, 9, κτλ. Όταν  $P = 1$  ή 3 σχηματίζεται ένα κανονικό εικοσάεδρο. Όλες οι άλλες τιμές του  $P$  δηλώνουν ότι τα υπο- τρίγωνα που συνιστούν το εικοσάεδρο δεν είναι ισοσκελή .

Τα καψίδια των picorna ιών (Picornaviridae) παρέχουν μια καλή απεικόνιση της κατασκευής του εικοσάεδρου . Τα τελευταία έτη κρυσταλλογραφικές απεικονίσεις της δομής των καψιδίων πολλών διαφορετικών picorna ιών έχουν προσδιορισθεί. Αυτές περιλαμβάνουν τους τύπους 1 και 3 των Πολιοιών ( Poliovirus , PV1 και PV3), του ιού της νόσου του στόματος και του ποδός (FMDV) και του ρινοϊού 14 (Human rhinovirus 14 ,HRV-14) . Όλες αυτές οι ομάδες ιών έχουν εικοσάεδρα καψίδια διαμέτρου περίπου 30 nm με triangulation number  $T = 3$  .



© Academic Press, 2000.



Η ατομική δομή του πολιοϊού τύπου 2 σε κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Είναι εμφανής οι αυλακώσεις (canyons) που περιβάλλουν τις επιφανειακές προεξοχές (star-like) στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας

Το καψίδιό τους αποτελείται από 60 αντίγραφα κάθε μιας από τις τέσσερις δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι προϊόντα πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης.

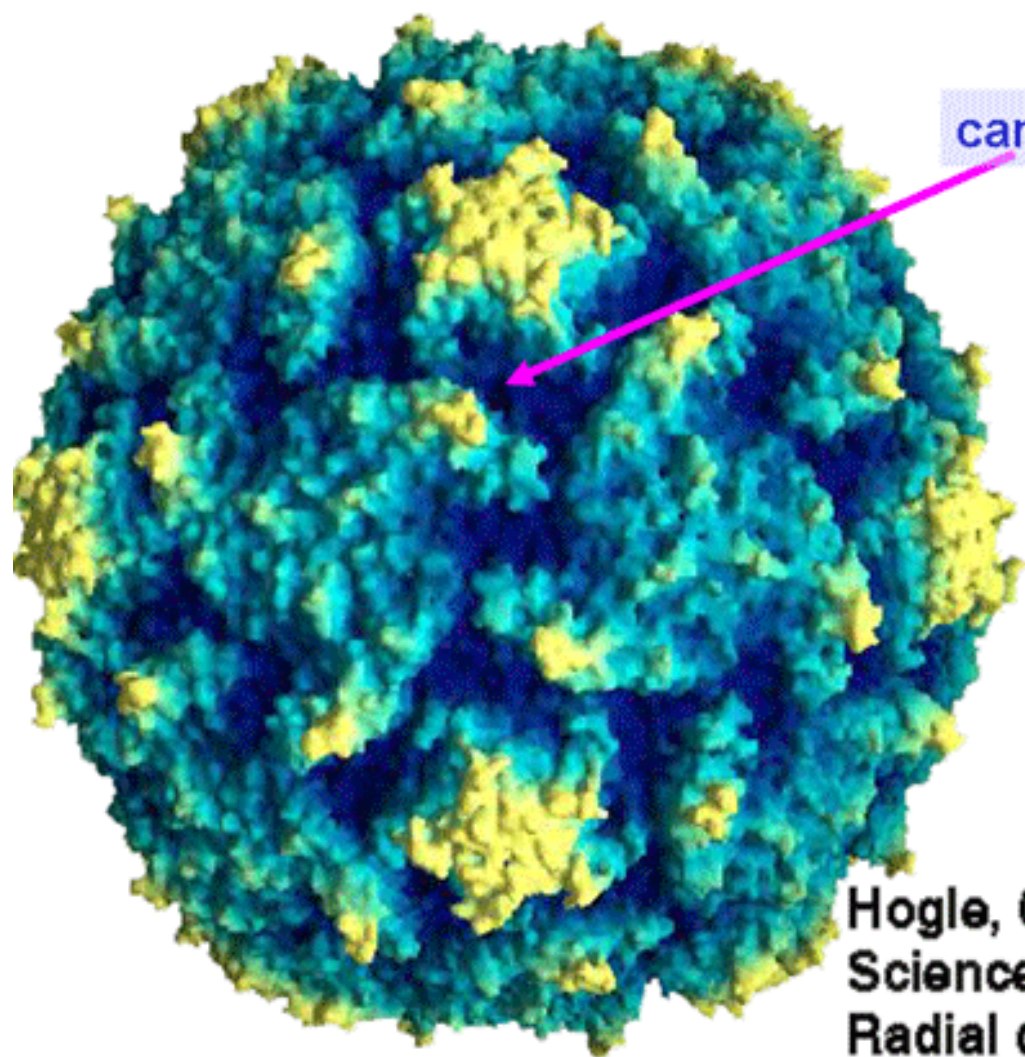
Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3,VP1). Κατόπιν τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)<sub>5</sub>]. Τέλος τα πενταμερή συναρμολογούνται ώστε να σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3,VP1)<sub>5</sub>]<sub>12</sub>.

Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA “πακετάρεται” στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2.

Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου

.

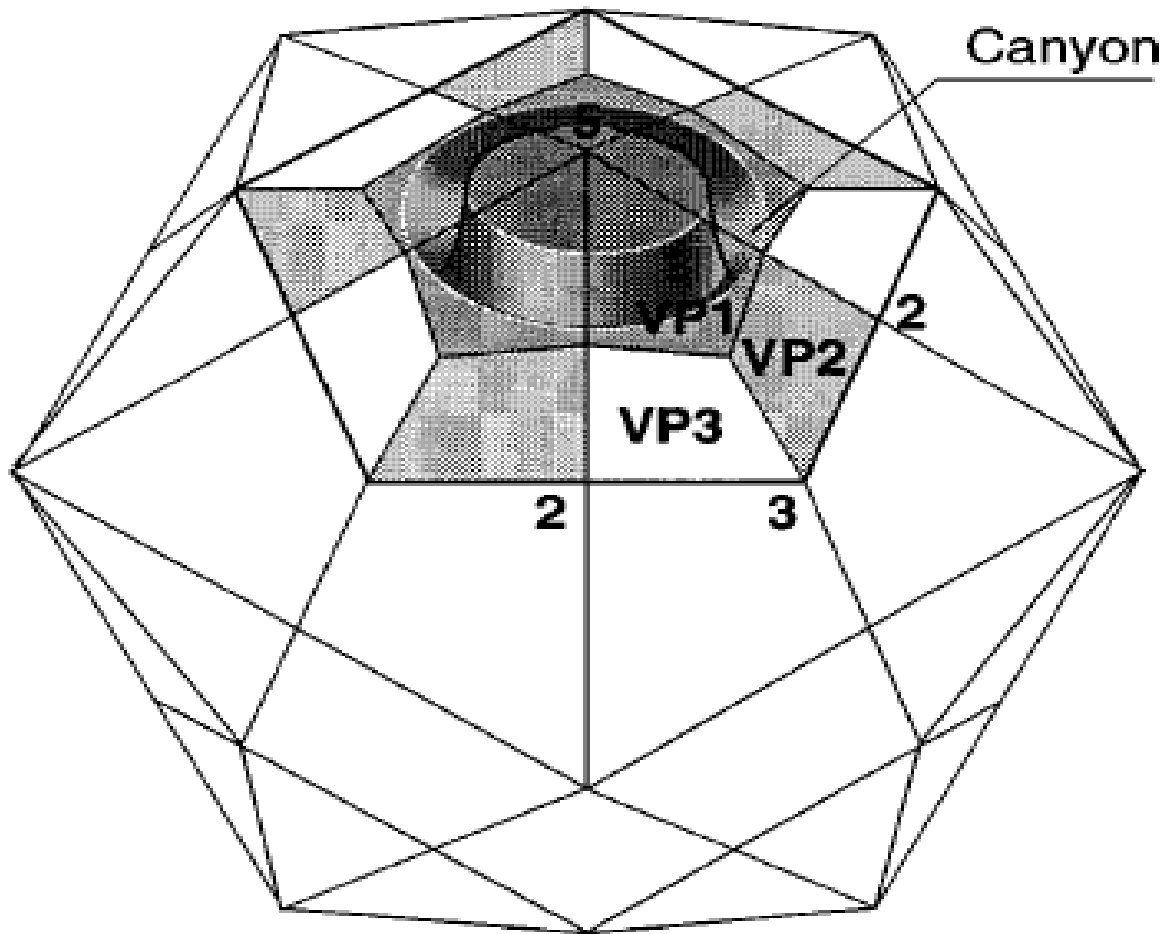




canyon

**Poliovirus type 1**

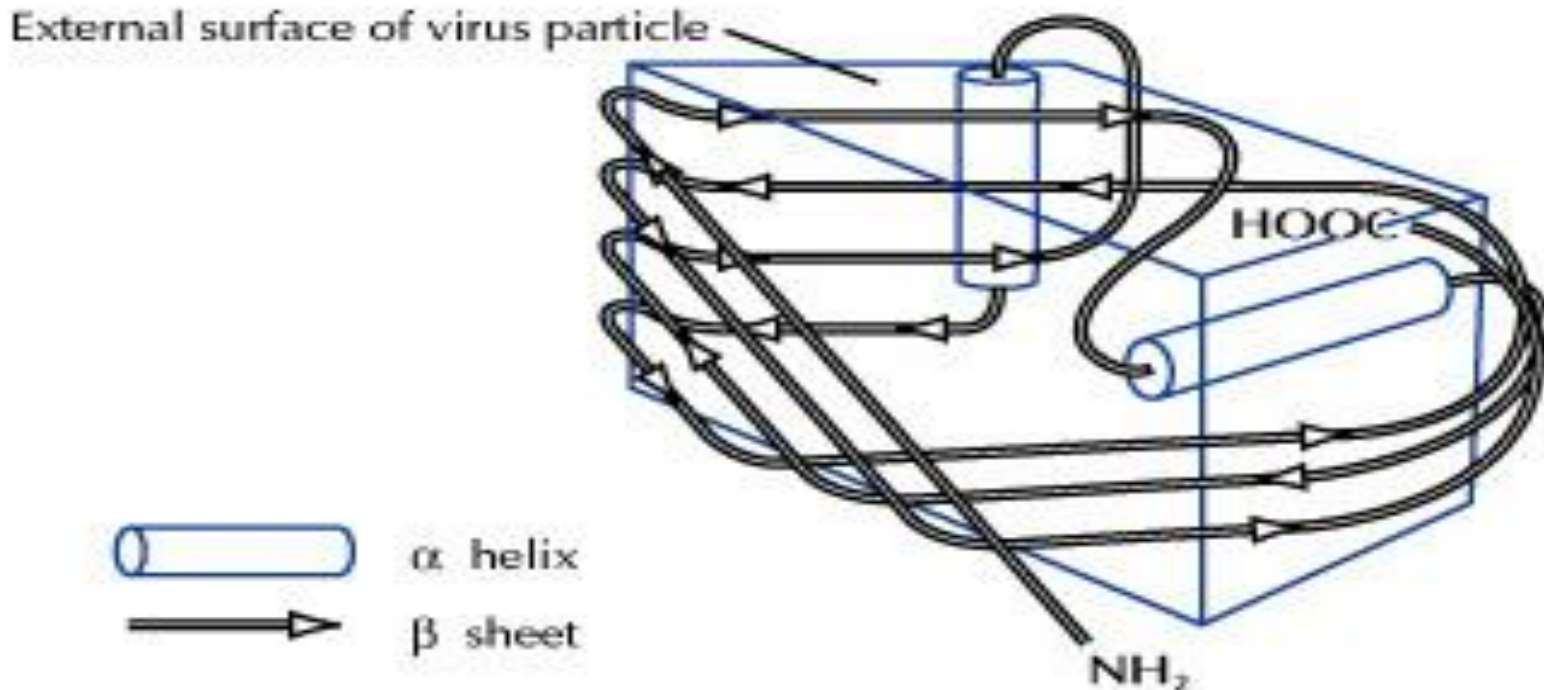
**Hogle, Chow and Filman  
Science 229:1358  
Radial depth cue rendering  
J.Y.Sgro**



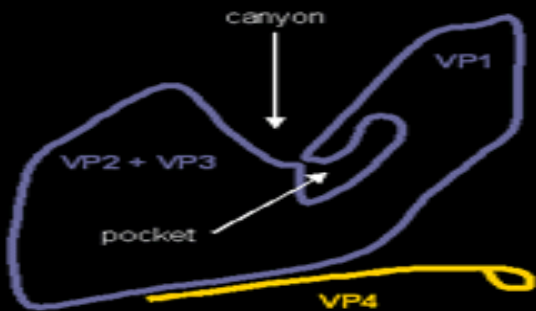
Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Παρουσιάζονται οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς και η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας .

Η επιφάνεια του καψιδίου αποτελείται από 60 επαναλαμβανόμενα πρωτεϊνικά μόρια, που το καθένα περιέχει τρεις βασικές υπομονάδες, VP1, VP2 και VP3 υπάρχουν δηλ.  $60 \times 3 = 180$  μονομερή στην επιφάνεια του ιικού σωματιδίου των ρικορνά ιών.

Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αποτελούνται από 150-200 υπολείμματα αμινοξέων και παρουσιάζουν την δομή που έχει περιγραφεί ως '8- strand anti-parallel  $\beta$ -barrel'

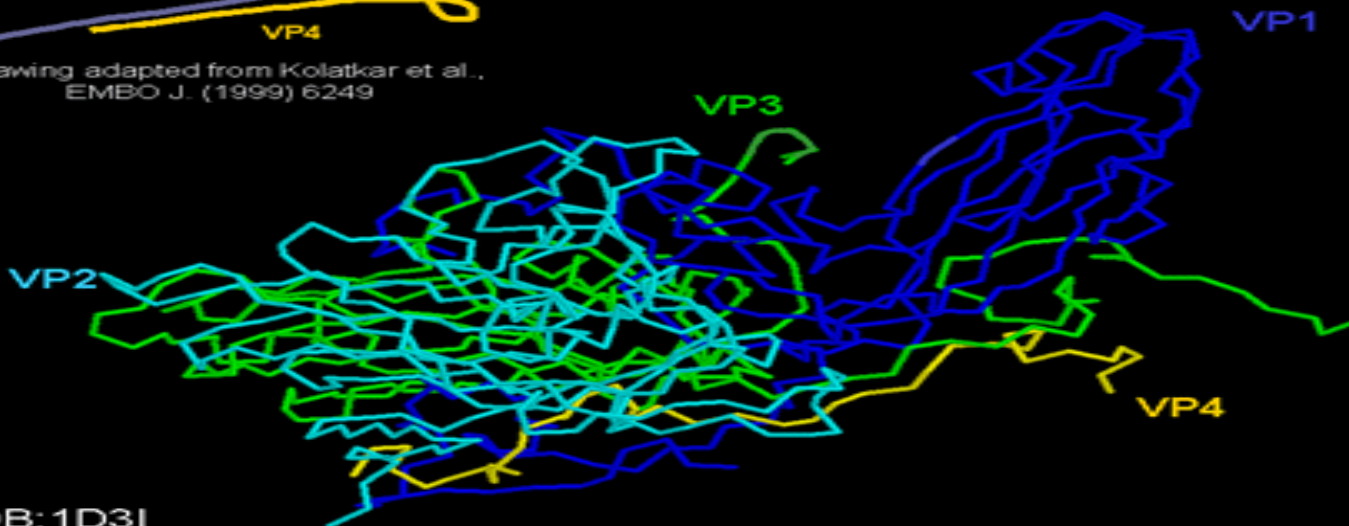


Αυτή η δομή της υπομονάδας έχει βρεθεί σε όλα τα  $T = 3$  εικοσάεδρα καψίδια των RNA ιών. Επιπρόσθετα στις τρεις βασικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, υπάρχει και μια μικρή τέταρτη πρωτεΐνη, η VP4. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου και δεν εκτίθεται στην επιφάνεια του σωματιδίου. Η VP4 σχηματίζεται από την διάσπαση του VP0 πρόδρομου πρωτεϊνικού μορίου σε VP2 + VP4 η οποία τροποποιείται μετά την μετάφραση με την σύνδεση του μυριστικού οξέως (μη κορεσμένο λιπαρό οξύ 14 ατόμων άνθρακα). Πέντε VP4 μονομερή σχηματίζουν στο εσωτερικό του σωματιδίου ένα υδρόφοβο περιβάλλον, που καθοδηγεί την συναρμολόγηση ενός πενταμερούς.



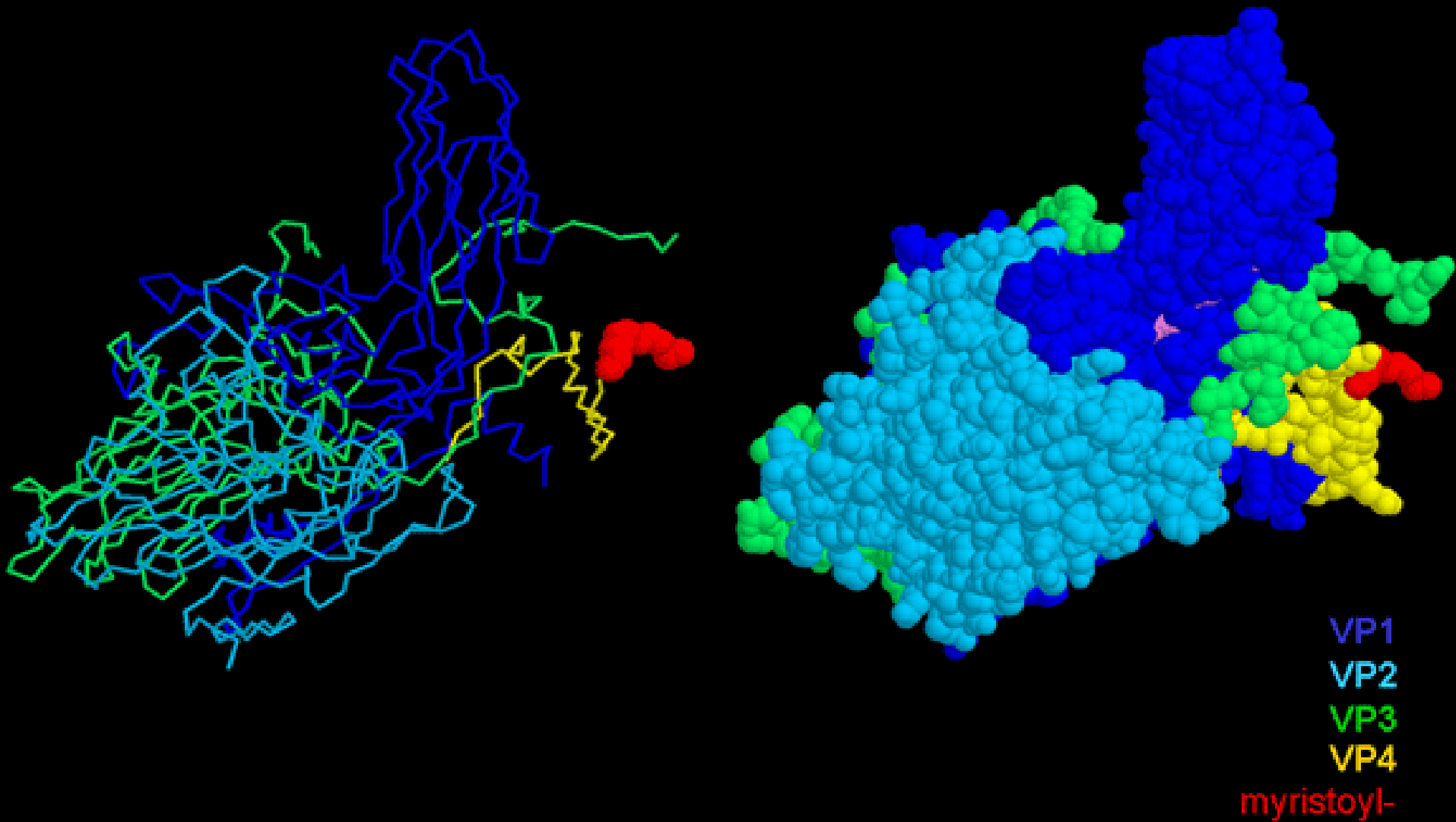
drawing adapted from Kolatkar et al.,  
EMBO J. (1999) 6249

## Rhinovirus (HRV14)



PDB: 1D3I

# Rhinovirus (HRV16)



PDB:1QJX

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

**Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1.  
Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.**

**Η N-AgIIIA αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3 και τέλος η N-AgIIIB από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.**

**Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ. Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας και αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα .**

## ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

### Καψίδια των Picorna ιών

Οι ατομικές δομές των καψιδίων πολλών διαφορετικών picorna ιών έχουν προσδιορισθεί, συμπεριλαμβανομένων των πολιοιών 1 και 3, του ιού της νόσου του στόματος και του ποδός (FMDV), και του ρινοϊού 14 του ανθρώπου.

Όλες αυτές οι ομάδες ιών έχουν εικοσάεδρα καψίδια διαμέτρου ~30 nm με triangulation number  $T = 3$ .

Τα καψίδια αποτελούνται από 60 επαναλαμβανόμενες υπομονάδες πρωτεϊνών, η καθεμία των οποίων περιέχει τρεις βασικές δομικές πρωτεΐνες τις, VP1, VP2 και VP3, δηλαδή  $60 \times 3 = 180$  μονομερή στην επιφάνεια του σωματιδίου.

Όλες αυτές οι τρεις πρωτεΐνες βασίζονται σε μια παρόμοια πρωτεϊνική δομή, η οποία αποτελείται από 150-200 υπολείμματα αμινοξέων, δομή που έχει περιγραφεί ως '8-strand anti-parallel  $\beta$ -barrel' και η οποία συναντάται σε όλα τα  $T = 3$  RNA εικοσαεδρικά καψίδια.

Τα καψίδια των Picorna ιών επιπροσθέτα στις τρεις βασικές πρωτεΐνες VP1-3, περιέχουν και μια μικρή πρωτεΐνη την VP4 η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Η VP4 σχηματίζεται από την διάσπαση της VP0 σε VP2+VP4 και τροποποιείται μετά την μετάφραση με την προσκόλληση του μυριστικού οψέως. Πέντε VP4 μονομερή σχηματίζουν ένα υδρόφοβο περιβάλλον που καθοδηγεί την συναρμολόγηση ενός πενταμερούς.

**Ορισμένες αντιγονικές θέσεις αντιστοιχούν σε συνεχόμενα αμινοξέα (επίτοπους) ενώ άλλες, σε αμινοξέα που απέχουν μεταξύ τους αρκετά στην πρωτοταγή δομή αλλά ευρίσκονται πολύ κοντά κατά την διαμόρφωση τους στον χώρο (επίτοποι διαμόρφωσης).**

**Οι επίτοποι αυτοί αντιστοιχούν κυρίως σε υδρόφιλα αμινοξέα εκτιθέμενα στο χώρο, τα οποία επαναλαμβάνονται σε κάθε πενταμερές, και εύκολα προσβάσιμα από τα εξουδετερωτικά αντισώματα.**



## ΙΟΙ ΜΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑ

‘Γυμνά’ ιικά σωματίδια είναι εκείνα στα οποία οι πρωτεΐνες του καψιδίου εκτίθενται στο εξωτερικό περιβάλλον. Τέτοιοι ιοί , παράγονται από μολυσμένα κύτταρα στο τέλος του αναπαραγωγικού τους κύκλου, όταν το κύτταρο πεθάνει και λύεται , απελευθερώνοντας τα ιικά σωματίδια. Η διεργασία αυτή καταλήγει στον πρώιμο θάνατο του κυττάρου και μειώνει επίσης τις πιθανότητες για μόνιμες ή λανθάνουσες μολύνσεις.

Επομένως, πολλοί ιοί έχουν επινοήσει στρατηγικές για να επιτύχουν μια έξοδο από το μολυσμένο κύτταρο χωρίς την ολική καταστροφή του κυττάρου ξενιστή. Ολα τα ευκαρυωτικά κύτταρα καλύπτονται από μια μεμβράνη που αποτελείται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα και η επιβίωση του κυττάρου εξαρτάται από την ακεραιότητα αυτής της μεμβράνης. Οι ιοί που εγκαταλείπουν το κύτταρο θα πρέπει, επομένως, να επιτρέπουν σε αυτήν την μεμβράνη να παραμείνει ανέπαφη. Αυτό επιτυγχάνεται με την εκβλάστηση ( budding ,extrusion ) του σωματιδίου μέσω της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή , κατά την διάρκεια της οποίας διαδικασίας το σωματίδιο περιβάλλεται από ένα λιπιδικό εξωτερικό περίβλημα που προέρχεται από την μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή .

Η δομή που βρίσκεται κάτω από το εξωτερικό περίβλημα μπορεί να είναι είτε ελικοειδής είτε εικοσαεδρικής συμμετρίας και σχηματίζεται πριν ο ιός ή καθώς ο ιός εγκαταλείπει το κύτταρο.

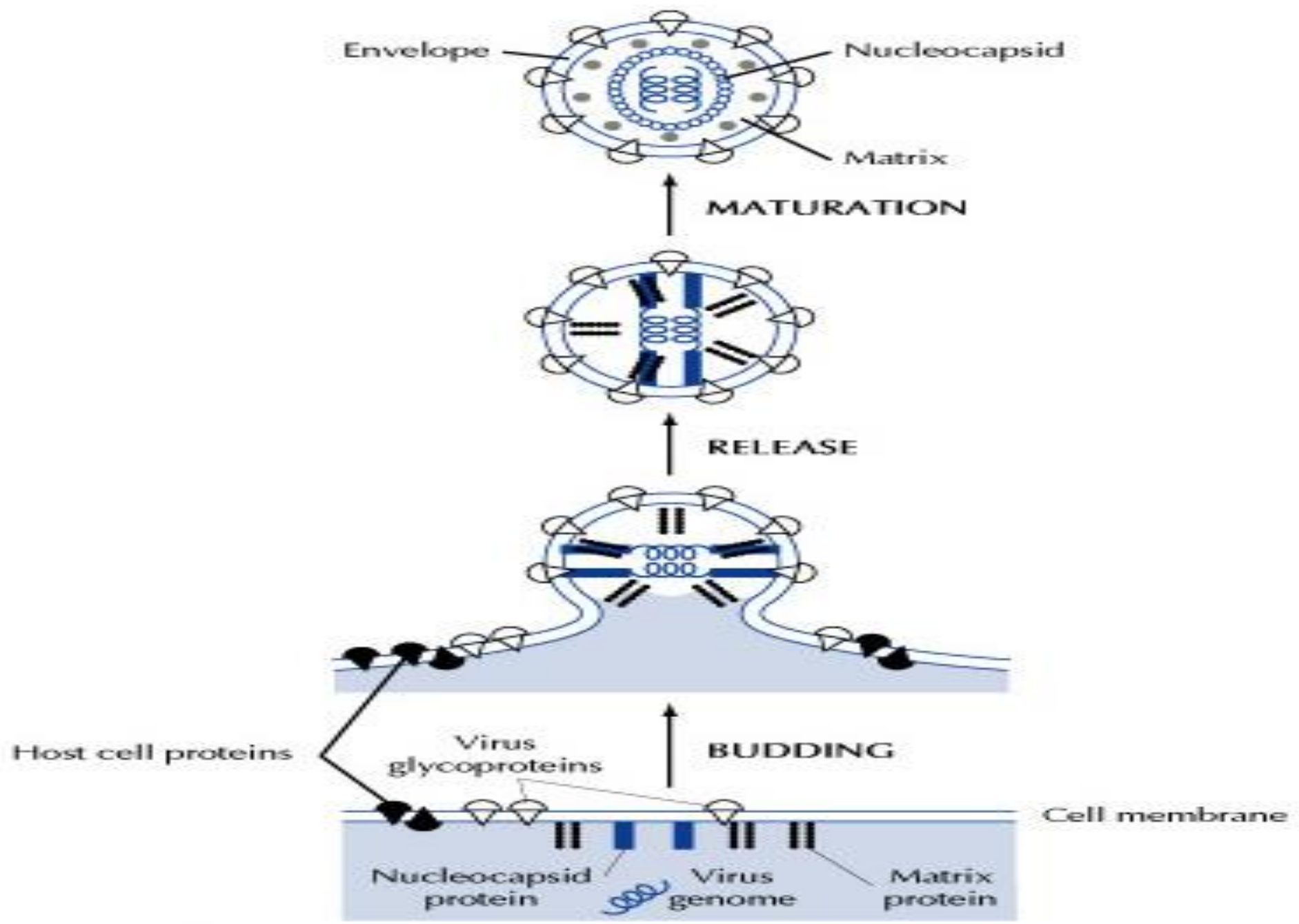
## ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ

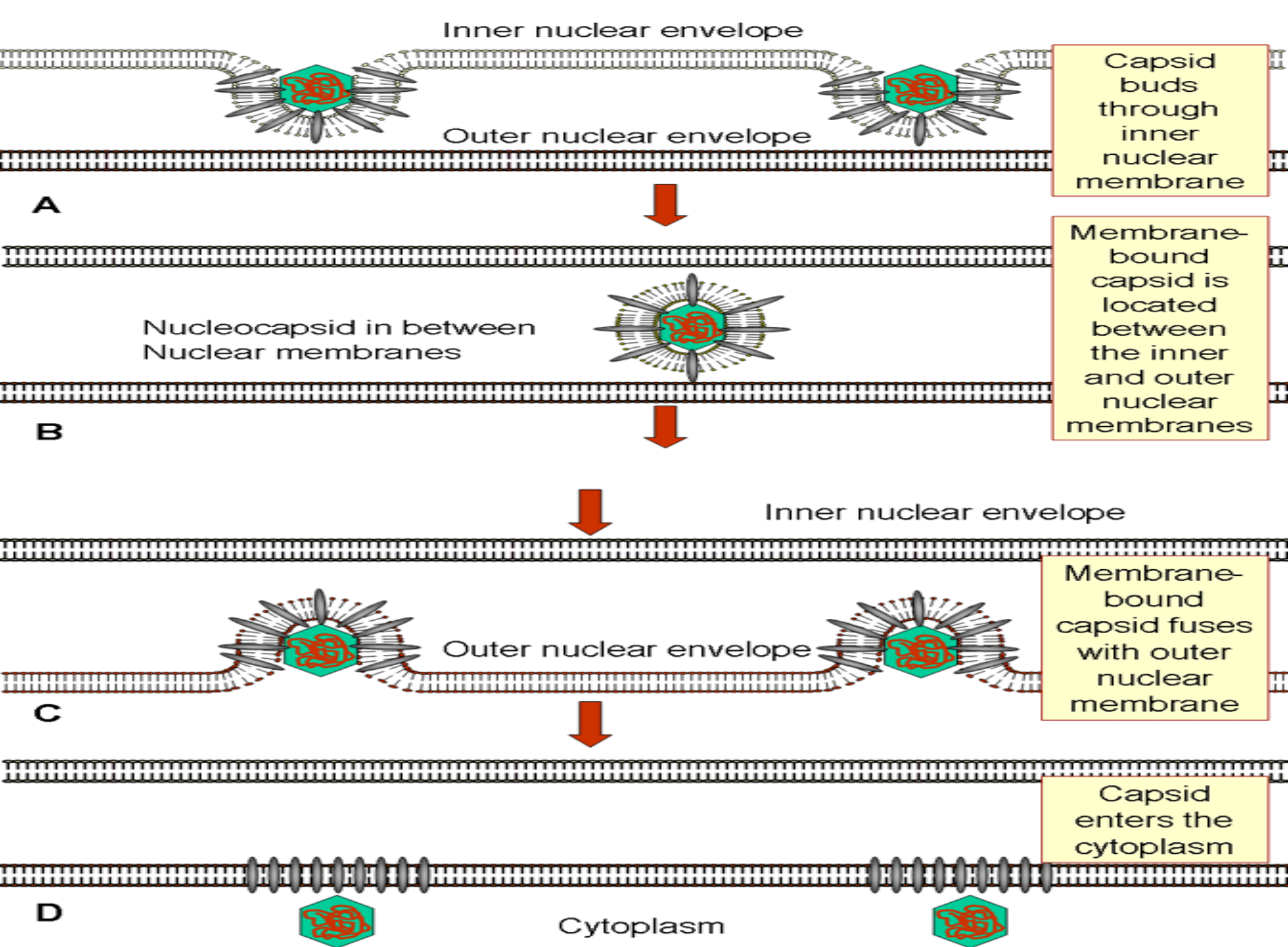
Τα στελέχη του ιού με εξωτερικό περίβλημα σχηματίζονται κατά την εκβλάστηση μέσω της μεμβράνης του κυττάρου ξενιστή κατά την διάρκεια της οποίας το στέλεχος περιβάλλεται από μια λιπιδική διπλοστοιβάδα που προέρχεται από την μεμβράνη του κυττάρου.

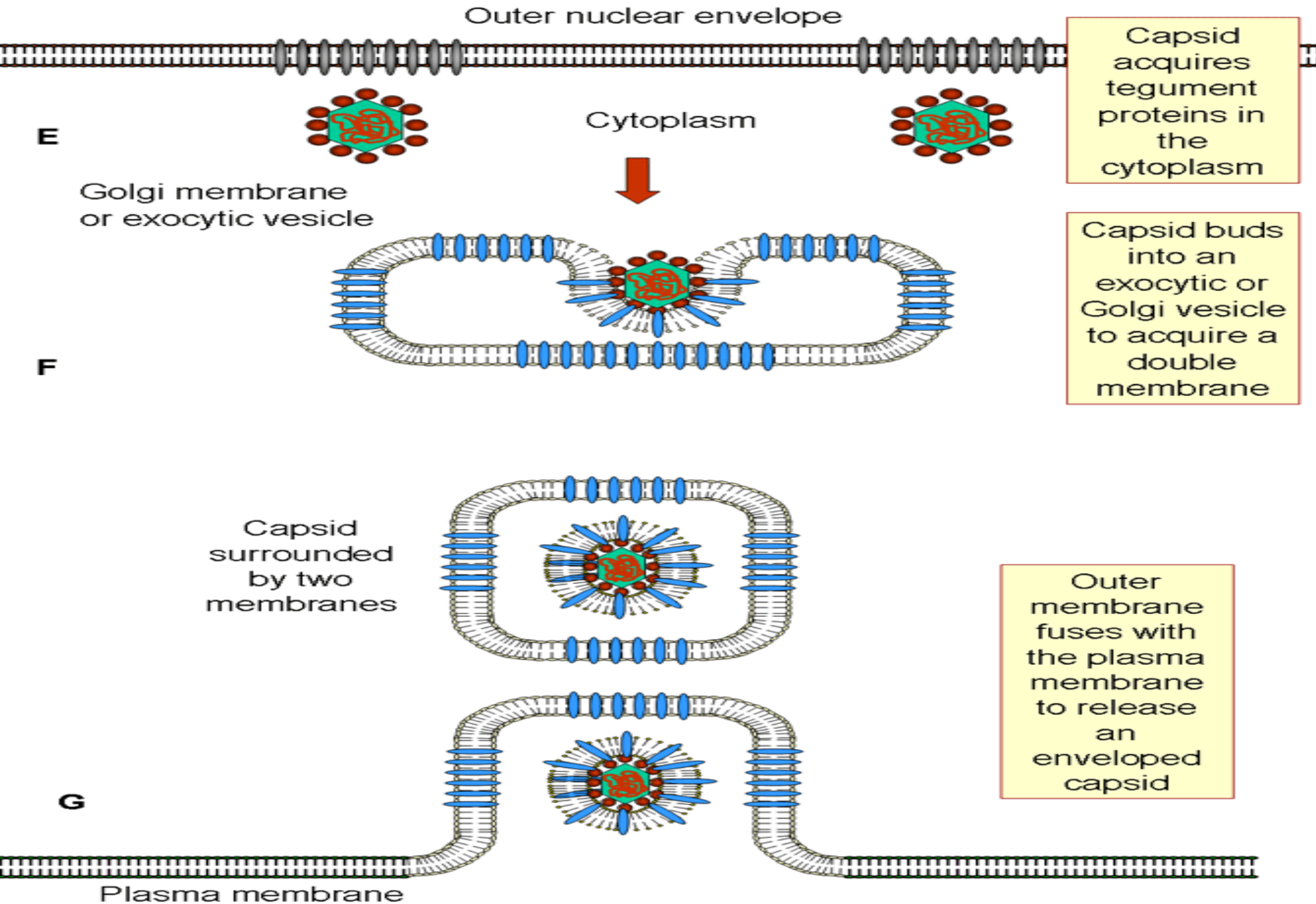
Για μερικούς ιούς, η συναρμολόγηση της δομής του σωματιδίου και η εκβλάστηση γίνονται ταυτόχρονα, ενώ σε άλλους ιούς ένα προσχηματισμένο νουκλεοκαψίδιο ( ή πυρήνας ) σπρώχνεται προς τα έξω μέσω της μεμβράνης.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι ιοί με εξωτερικό περίβλημα χρησιμοποιούν θέσεις στις κυτταρικές μεμβράνες για να κατευθύνουν την συναρμολόγηση τους. Ο σχηματισμός του σωματιδίου , η ωρίμανση και η απελευθέρωση είναι μια συνεχής διαδικασία. Η θέση της συναρμολόγησης διαφέρει μεταξύ των ιών. Δεν χρησιμοποιούν όλοι την μεμβράνη ως θέση συναρμολόγησης στην επιφάνεια του κυττάρου.

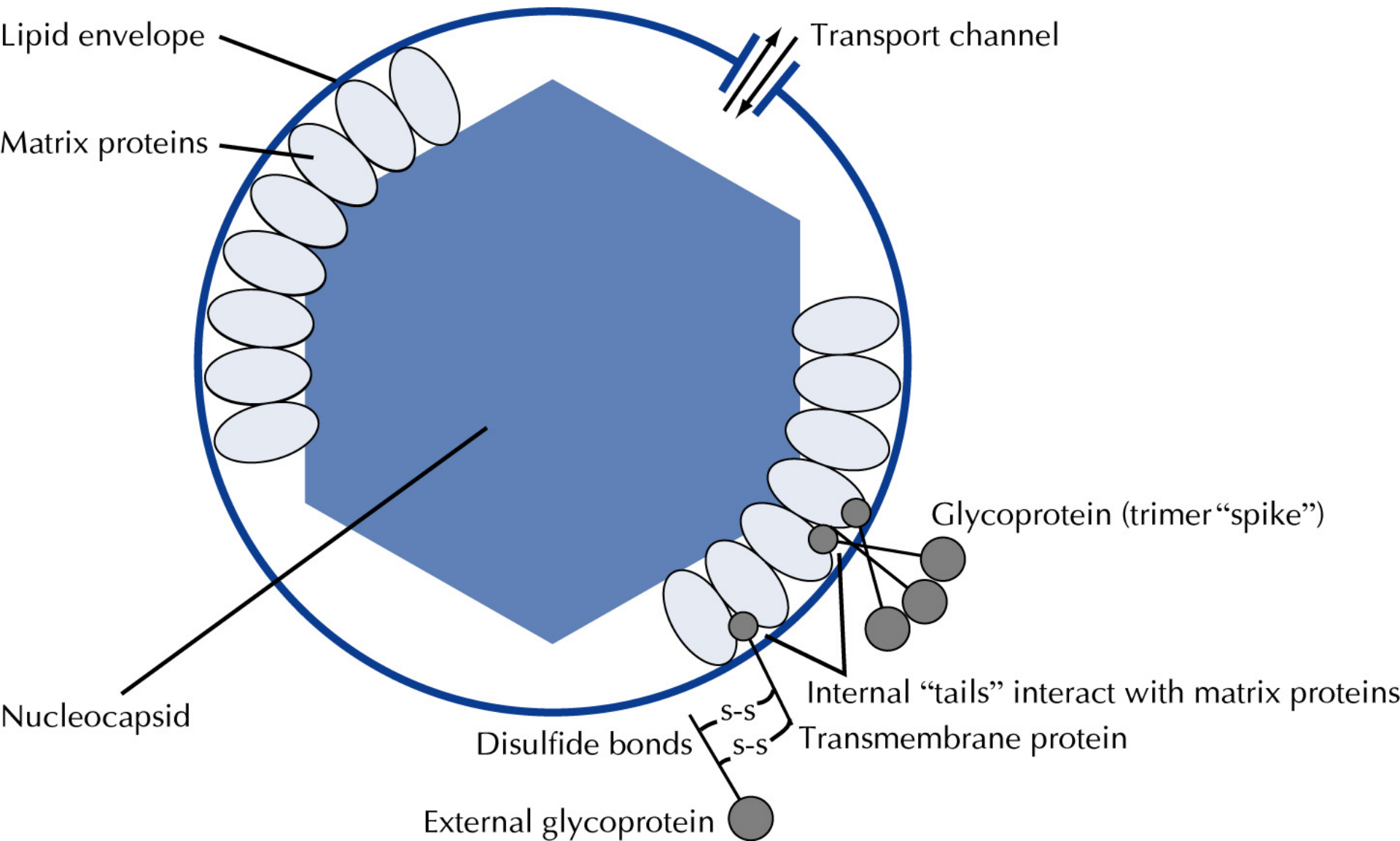
Πολλοί χρησιμοποιούν κυτταροπλασματικές μεμβράνες όπως το σύστημα Golgi και άλλοι, όπως οι Ερπητοιοί (Herpeviruses ), οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα χρησιμοποιούν και την μεμβράνη του πυρήνα. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο ιός συνήθως εξέρχεται του πυρήνα υπό μορφή έγκλειστου (vacuole), και το οποίο μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου από όπου και απελευθερώνεται.







Οι ιοί τροποποιούν τα εξωτερικά «κυτταρικά τους» περιβλήματα μέσω της σύνθεσης ιικών πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται με το εξωτερικό περίβλημα με έναν από τους ακόλουθους τρεις τρόπους



**Οι πρωτεΐνες της μήτρας συνδέουν το εξωτερικό περίβλημα του ιικού σωματιδίου με το νουκλεοκαψίδιο ( πυρήνα). Οι κωδικοποιούμενες από το ιικό γένωμα γλυκοπρωτεΐνες ενσωματώνονται στο εξωτερικό περίβλημα. Οι εξωτερικές γλυκοπρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για την αναγνώριση του υποδοχέα και την σύνδεση με αυτόν , ενώ οι δια-μεμβρανικές πρωτεΐνες δρουν ως κανάλια μεταφοράς κατά μήκος του περιβλήματος. Οι πρωτεΐνες που προέρχονται από το κύτταρο ξενιστή βρίσκονται επίσης συνδεδεμένες με το περίβλημα.**

**Πρωτεΐνες μήτρας (Matrix): Αυτές είναι εσωτερικές πρωτεΐνες των οποίων η λειτουργία είναι να συνδέουν το νουκλεοκαψίδιο με το εξωτερικό περίβλημα. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν είναι συνήθως γλυκοσυλιωμένες είναι πολύ άφθονες και συνδέονται με την μεμβράνη μέσω υδρόφοβων έλξεων ή μέσω αλληλεπιδράσεων με τις γλυκοπρωτεΐνες του περιβλήματος .**

**Γλυκοπρωτεΐνες:** Αυτές είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες που διαπερνούν την μεμβράνη μέσω μιας υδρόφοβης αμινοξικής αλληλουχίας (domain) και υποδιαιρούνται σε δυο τύπους βάσει των λειτουργιών τους:

- 1. Το μεγαλύτερο μέρος της γλυκοπρωτεΐνης βρίσκεται στο εξωτερικό της μεμβράνης, με μια σχετικά μικρή εσωτερική «ουρά». Συχνά, μονομερή συνδέονται για να σχηματίσουν τα 'καρφιά' (spikes) που είναι ορατά στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην επιφάνεια πολλών ιών με εξωτερικό περίβλημα. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι κατά κανόνα τα κύρια αντιγόνα των ιών με εξωτερικό περίβλημα. Οι πρωτεΐνες αυτές είναι γλυκοσυλιώμενες σε ποσοστό μέχρι και 75% του βάρους της πρωτεΐνης . Αυτές οι πρωτεΐνες είναι συνήθως τα βασικά αντιγόνα των ιών με εξωτερικό περίβλημα και προσφέρουν την επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον, συχνά προσφέροντας πολλές σημαντικές λειτουργίες όπως για παράδειγμα, την σύντηξη των μεμβρανών , την αναγνώριση του υποδοχέα κ.λ.π.**
- 2. Πρωτεΐνες μεταφοράς οι οποίες έχουν εκτενείς υδρόφοβες διαμεμβρανικές επικράτειες σχηματίζοντας ένα κανάλι μεταφοράς μέσω του περιβλήματος.**

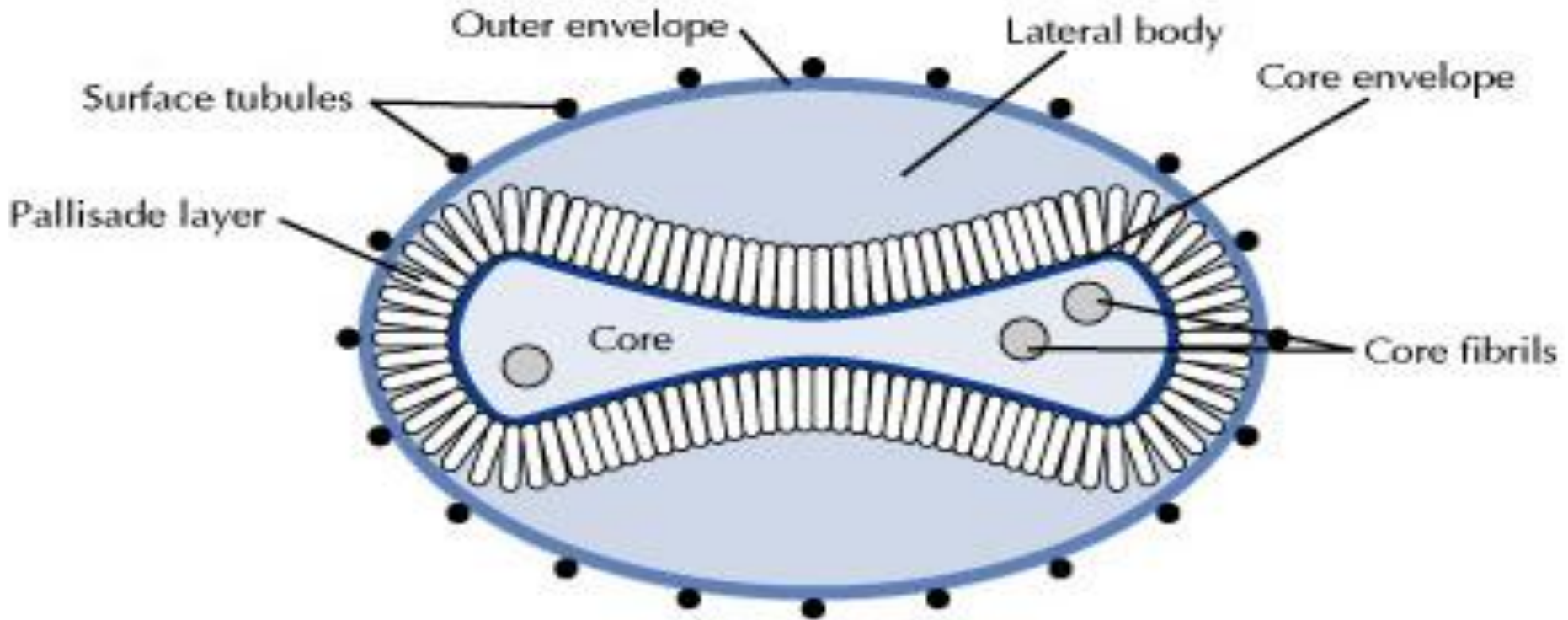


## ΠΕΡΙΠΛΟΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΙΩΝ

Οι δομές αυτών των ιών δεν μπορούν να περιγραφούν με μια απλή μαθηματική εξίσωση όπως οι ιοί ελικοειδούς ή εικοσαεδρικής συμμετρίας .

Ένα παράδειγμα μιας τέτοιας ομάδας ιών είναι οι Ροχ ιοί.

Αυτοί οι ιοί έχουν ωοειδές σχήμα μήκους 200-400 nm και είναι δυνατόν να παρατηρηθούν σε φωτονικό μικροσκόπιο υψηλής ανάλυσης .Τα σωματίδια αυτά είναι εξαιρετικά σύνθετα και περιέχουν περισσότερες από 100 διαφορετικές πρωτεΐνες .



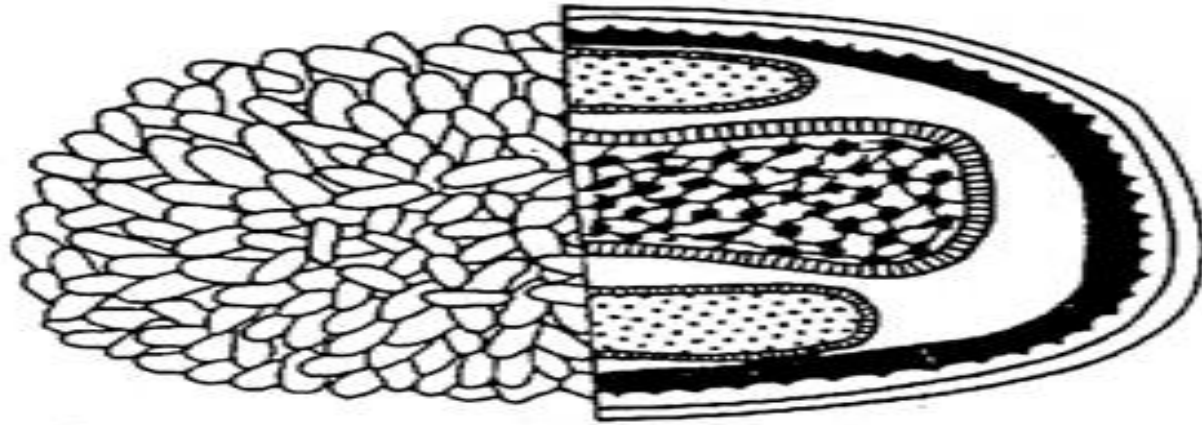
Κατά την διάρκεια της αντιγραφής παρατηρούνται δυο μορφές του στελέχους:

- εξω-κυτταρικές μορφές, οι οποίες περιέχουν δυο μεμβράνες,
- και ενδοκυτταρικά στελέχη, τα οποία έχουν μόνο μια εσωτερική μεμβράνη.

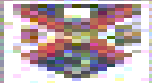
Οι ροχιοί αποκτούν τις μεμβράνες τους με διαφορετικό τρόπο από τους 'απλούς' ιούς με εξωτερικό περίβλημα διότι κατά την εκβλάστηση αυτοί οι σύνθετοι ιοί είναι ήδη περιτυλιγμένοι με το ενδοπλασματικό δίκτυο αποκτώντας έτσι δύο στρώματα μεμβράνης .

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο φαίνεται ότι η εξωτερική επιφάνεια των ροχιών αποτελείται από λιπίδια και πρωτεΐνες τα οποία περιβάλλουν τον πυρήνα του ιικού σωματιδίου . Ο πυρήνας αποτελείται από μια «συμπιεσμένη» νουκλεοπρωτεΐνη η οποία τυλίγεται γύρω από το δίκλωνο DNA. Οι ροχιοί φέρουν στο ιικό σωματίδιο τους τουλάχιστον 10 διαφορετικά ένζυμα εμπλεκόμενα στον μεταβολισμό και στην αντιγραφή του ιικού γενώματος .

# COMPLEX SYMMETRY



POXVIRUS FAMILY



**Budding through cytoplasmic membrane**

Modified Cytoplasmic membrane

Cytoplasmic membrane

**Infectious Intracellular virus**

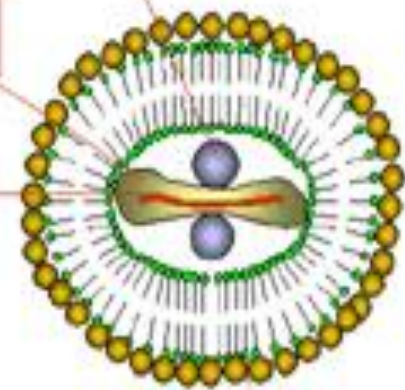
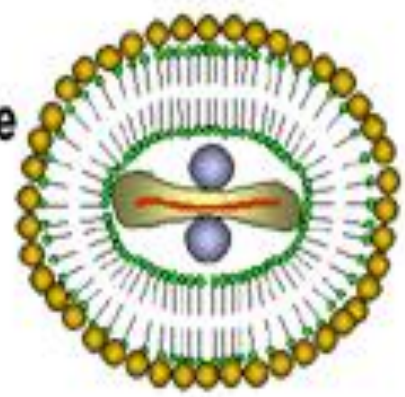
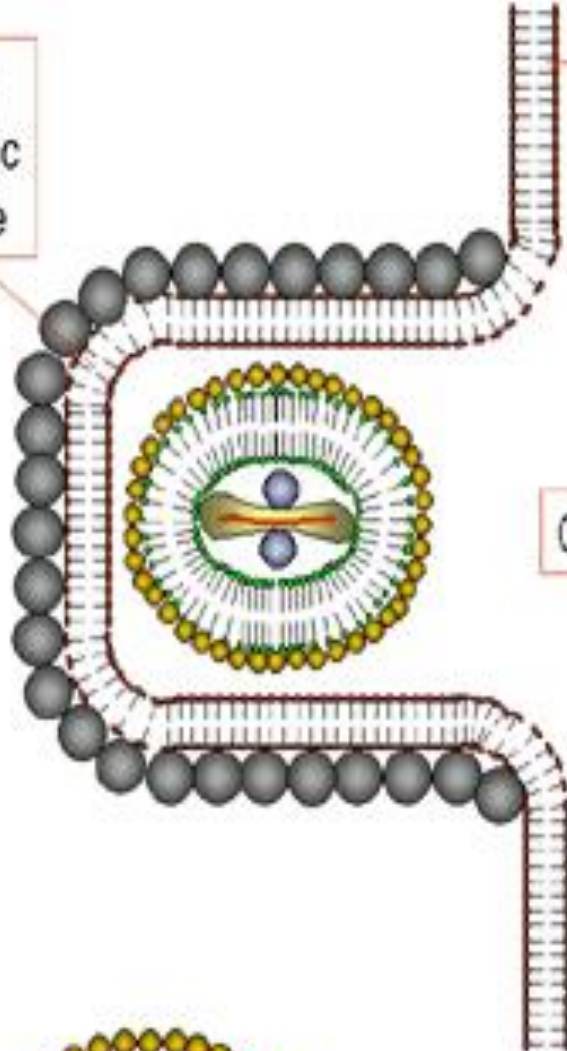
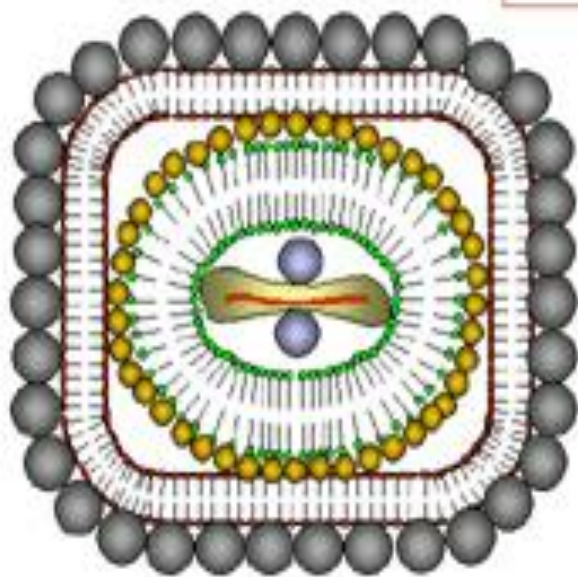
Lateral body

Core

Genome

Inner membrane with neutralization sites ●

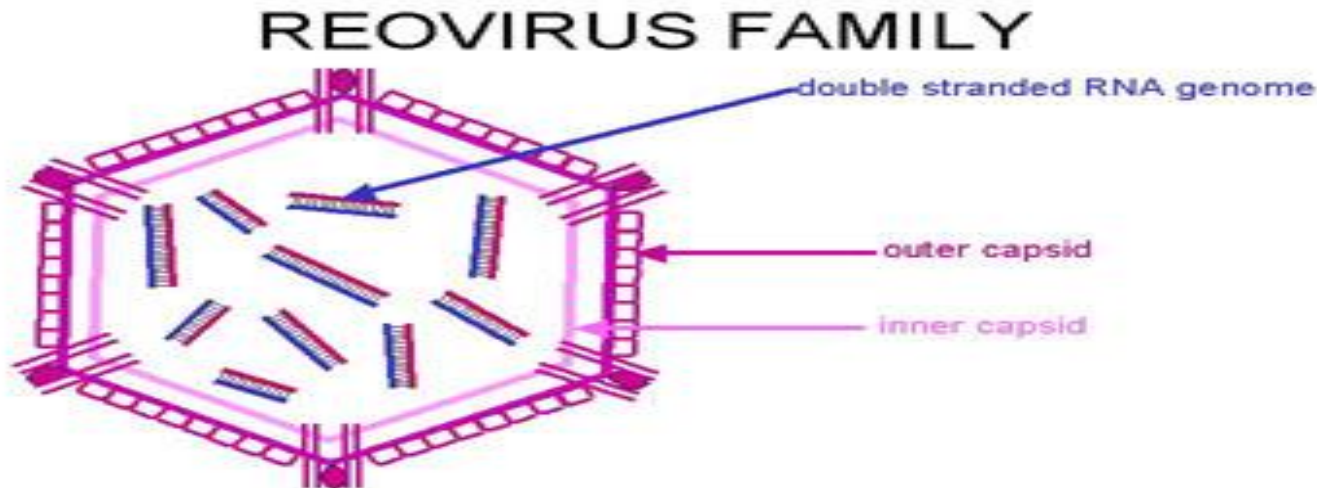
**Release via hole in cytoplasmic membrane**



## ΙΟΙ ΜΕ ΕΞΩΤΕΡΙΚΟ ΠΕΡΙΒΛΗΜΑ

- A) Οι 'απλοί' ιοί με εξωτερικό περίβλημα αποκτούν ένα μόνο στρώμα περιβλήματος κυρίως μέσω της εκβλάστησης στην επιφάνεια του κυττάρου ή από κάποια ενδοκυτταρικά συστατικά.
- B) Οι 'σύνθετοι' ιοί με εξωτερικό περίβλημα αποκτούν πολλαπλά στρώματα μεμβράνης μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου ή και άλλων κυτταρικών μεμβρανών .

Τα μέλη του γένους των reo ιών δεν έχουν εξωτερικό περίβλημα αλλά σχηματίζουν ένα «περίβλημα» πρωτεϊνικής φύσης διπλού τοιχώματος με σύνθετη δομή . Το εξωτερικό περίβλημα του ιού έχει διάμετρο περίπου 80 nm και το εσωτερικό (πυρήνας) έχει περίπου 60 nm. Το δίκλωνο RNA γένωμα του ιού είναι συμπιεσμένο στο εσωτερικό του πυρήνα.



# ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ- ΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΥΣ ΚΑΙ ΠΑΚΕΤΑΡΙΣΜΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Η αρχική λειτουργία του ιικού σωματιδίου είναι να περιέχει και να προστατεύει το γένωμα πριν την προσβολή του κατάλληλου κυττάρου ξενιστή. Επομένως, είναι αναγκαίο οι πρωτεΐνες του καψιδίου να αλληλεπιδράσουν με το γένωμα του νουκλεϊκού οξέως. Για άλλη μια φορά οι φυσικοί περιορισμοί της ενσωμάτωσης ενός σχετικά μεγάλου μορίου νουκλεϊκού οξέως σε ένα σχετικά μικρό καψίδιο παρουσιάζουν σημαντικά προβλήματα που πρέπει να ξεπεραστούν. Όταν το γραμμικό γένωμα του ιού ξεδιπλωθεί σε ένα υδατικό διάλυμα είναι κατά κανόνα τουλάχιστον μιας τάξης μεγέθους μεγαλύτερο από την διάμετρο του νουκλεοκαψιδίου.

Οι ιοί ξεπερνούν αυτήν την δυσκολία μέσω του πακεταρίσματος του γενώματος τους μέσω θετικών φορτισμένων μορίων (Na, Mg, K, πολυαμινών και ποικίλων πρωτεΐνων που προσδένονται στο νουκλεϊκό οξύ) και τα οποία εξουδετερώνουν την αρνητικά φορτισμένη απώθηση των φωσφορικών ομάδων.

Μερικές από αυτές τις τελευταίες πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από τον ιό και περιέχουν αμινοξέα με βασικές πλευρικές αλυσίδες όπως αργινίνη και λυσίνη οι οποίες αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δεσμών με το ιικό γένωμα (οι πρωτεΐνες αυτές είναι συνήθως οι αποκαλούμενες ως νουκλεοπρωτεΐνες -NP) .

Πολλοί ιοί με δίκλινα DNA γενώματα έχουν βασικά μόρια που μοιάζουν με ιστόνες και είναι στενά συνδεδεμένα με το DNA. Σε άλλες περιπτώσεις ο ιός χρησιμοποιεί κυτταρικές πρωτεΐνες: για παράδειγμα, το γένωμα του ιού polyoma υιοθετεί μια δομή που μοιάζει με χρωματίνη σε συνεργασία με τέσσερις κυτταρικές ιστόνες τις H2A, H2B, H3 και H4, παρόμοιες με αυτές του γενώματος του ξενιστή.

**Το δεύτερο πρόβλημα που ο ιός πρέπει να ξεπεράσει είναι πώς θα επιτύχει την εξειδίκευση που απαιτείται για να επιλέξει το δικό του μόνο γένωμα και να το πακετάρει σωστά στο νουκλεοκαψίδιο του και αυτό μεταξύ των κυτταρικών νουκλεϊκών οξέων.**

**Επομένως, μια ειδική πρωτεΐνη του νουκλεοκαψιδίου απαιτείται για να επιτευχθεί το σωστό πακετάρισμα του ιού και πολλοί ιοί, ακόμα και αυτοί με σχετικώς μικρό γένωμα, κωδικοποιούν αυτό τον τύπο πρωτεΐνης.**

**Οι ιοί με τεμαχισμένα γενώματα αντιμετωπίζουν επιπλέον προβλήματα: δεν πρέπει να μπει στο καψίδιο, μόνο, το νουκλεϊκό οξύ του ιού και να αποκλείσει το νουκλεϊκό οξύ του κυττάρου ξενιστή, αλλά και κάθε τεμάχιο θα πρέπει να πακεταρισθεί με την σωστή φορά που απαιτείται ώστε να μην γίνει λάθος συναρμολόγηση.**

**Αν μετρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα ιικά σωματίδια και εν συνεχεία μετρηθούν μέσω της τεχνικής των οριακών αραιώσεων ή του σχηματισμού «πλακών» τότε διαπιστώνεται ότι σπανίως ισχύει η αναλογία είναι 1/1 δηλ. ότι κάθε ιικό σωματίδιο μπορεί να προσβάλλει ένα κύτταρο ξενιστή (multiplicity of infection-moi). Αυτή η τιμή συνήθως είναι μεταξύ 10-100 ιικών σωματιδίων / ανά κύτταρο ξενιστή.**

## Σήμα πακεταρίσματος

Είναι σαφές από αρκετές μελέτες ότι ακριβές και αποτελεσματικό πακετάρισμα του γενώματος απαιτεί πληροφορίες όχι μόνο από τις γραμμικές αλληλουχίες του γενώματος, αλλά επίσης από περιοχές του γενωμάτος όπου οι αναδιπλώσεις δημιουργούν δευτεροταγείς δομές.

Κατά συνέπεια, το κλειδί για το πακετάρισμα του γενώματος σε πολλούς ιούς είναι η δευτεροταγής δομή του γενωμάτος.

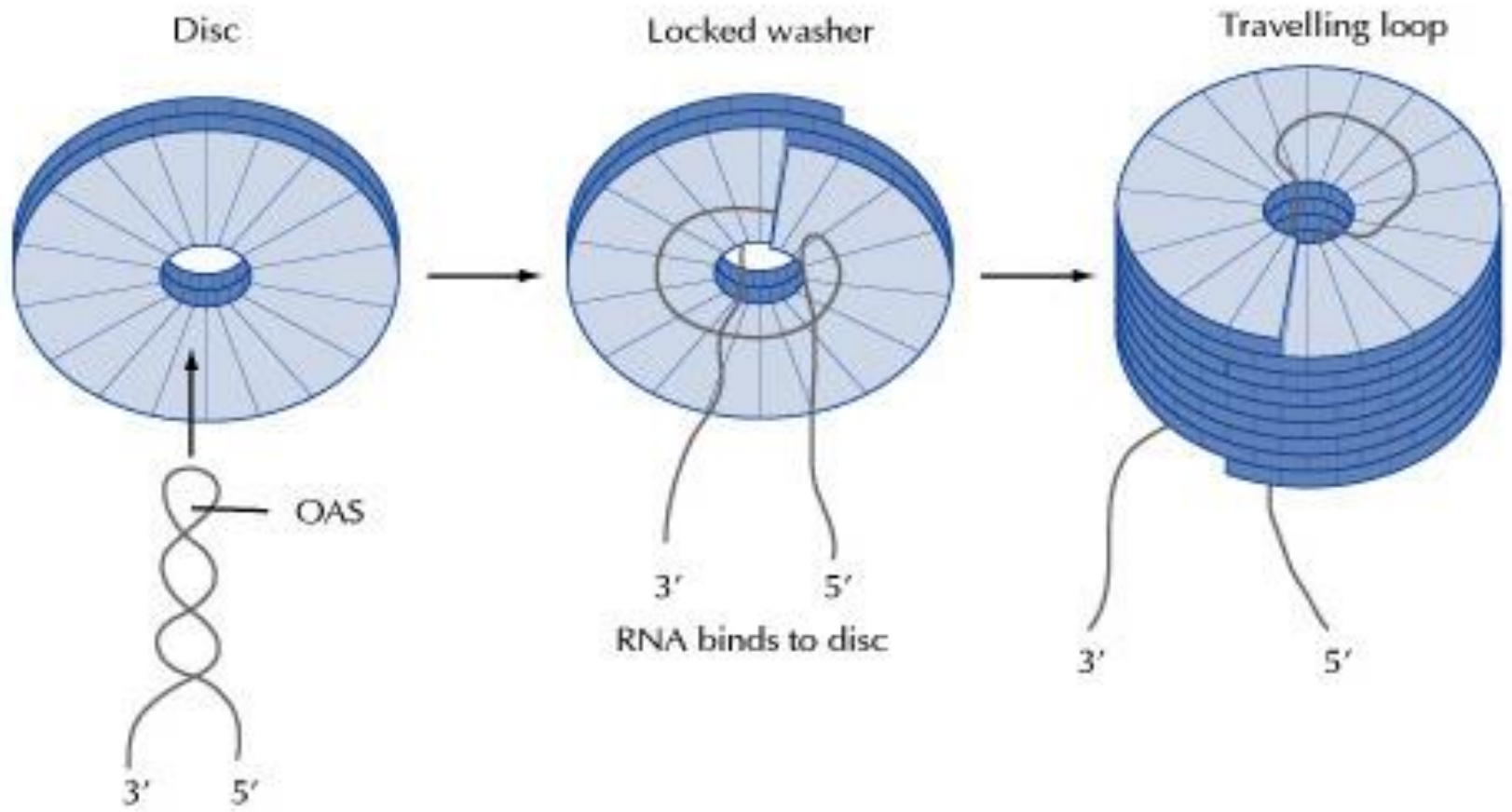
Ένα από τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα μηχανισμού πακεταρίσματος είναι ο ιός RNA θετικής πολικότητας των φυτών, Tobacco mosaic virus (TMV) και αυτό λόγω της σχετικής απλής δομής του ιού, ο οποίος έχει μόνο μια κύρια πρωτεΐνη περιβλήματος.

Στην περίπτωση του ιού TMV, το ιικό σωματίδιο σχηματίζεται από ήδη σχηματισμένα σύμπλοκα πρωτεϊνών υπό μορφή δίσκων γύρω από το RNA του ιού.

Το RNA του ιού μεταξύ των νουκλεοτιδίων 5440-5518 έχει την αλληλουχία OAS (origin of assembly sequence) και η συναρμολόγηση ξεκινά όταν ένας δίσκος έρθει σε επαφή με την συγκεκριμένη αλληλουχία.

Το ιικό RNA (vRNA) «παγιδεύεται» από τους δίσκους οι οποίοι προστίθενται ο ένας πάνω στον άλλον σχηματίζοντας μια έλικα η οποία καθώς αυξάνεται φέρει το RNA στο εσωτερικό της.





© Academic Press, 2000.

## ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΙΩΝ- ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ

Η αναγνώριση στην εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή των κατάλληλων υποδοχέων για την κάθε ομάδα ιών είναι καθοριστικής σημασίας για την είσοδο και τον πολλαπλασιασμό του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Ο ρόλος του καψιδίου για την κάθε ομάδα ιών δεν είναι μόνο να προστατεύει το ιικό γένωμα, αλλά επίσης να φέρει σε επαφή το ιικό σωματίδιο με τους υποδοχείς ώστε ο ιός να εισέλθει στο κυτταρόπλασμα και να ξεκινήσει η διαδικασία του πολλαπλασιασμού του. Οι ομάδες ιών, οι οποίες αναδιπλασιάζονται στον πυρήνα, φέρουν στο καψίδιο τους αλληλουχίες αμινοξέων οι οποίες αναγνωρίζουν σήματα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή, ώστε να οδηγήσουν το νουκλεοκαψίδιο προς τον πυρήνα, όπου ο αναδιπλασιασμός θα λάβει χώρα.

Τα ιικά σωματίδια δεν είναι αδρανείς δομές. Τα ιικά σωματίδια περιέχουν ένα ή περισσότερα ένζυμα τα οποία ενεργοποιούνται μόλις το ιικό σωματίδιο εισέλθει στο κύτταρο ξενιστή.

Παραδείγματος χάριν, όλα τα ιικά σωματίδια με αρνητικής πολικότητας RNA γένωμα, φέρουν μαζί τους μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση, μια που τα ευκαρυωτικά κύτταρα δεν διαθέτουν μηχανισμό για πολυμερισμό RNA από μήτρα RNA και κατά συνέπεια ο αναδιπλασιασμός του γενώματος δεν μπορεί να λάβει χώρα, αν αυτό το ένζυμο δεν περιέχεται στο ιικό σωματίδιο. Το σύμπλοκο της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιικού γενώματος αποτελεί επίσης ένα ακόμη παράδειγμα μεταφοράς ενζυμικού συμπλόκου από το ιικό σωματίδιο.

Οι μεγάλοι DNA ιοί (ερπητοιοί και ροχ ιοί) φέρουν μια πληθώρα ενζύμων στο ιικό σωματίδιο τους.

## ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

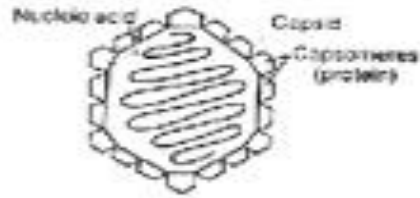
Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συμμετρία των ιικών σωματιδίων είναι είτε ελικοειδής είτε εικοσαεδρική και αποτελείται από επαναλαμβανόμενες μονάδες πρωτεϊνών.

- Η πλέον συνήθης δομή των πρωτεϊνών που περιβάλλουν το ιικό γένωμα είναι η αντιπαράλληλη δομή β-βαρελιού, η οποία συναντάται συνήθως στα εικοσαεδρικά καψίδια.
- Τα ιικά σωματίδια δεν είναι αδρανή. Τα περισσότερα ιικά σωματίδια φέρουν μαζί τους ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό του ιού στο κύτταρο ξενιστή.
  - Ένας βασικός ρόλος του περιβλήματος του ιού είναι να προστατεύει το ευαίσθητο γένωμα νουκλεϊκού οξέος από φυσικούς, χημικούς και ενζυμικούς παράγοντες. Το εξωτερικό περίβλημα του ιού παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αναγνώριση του κυττάρου ξενιστή μέσω των υποδοχέων του.
  - Οι πρωτεϊνικές μονάδες οι οποίες αποτελούν το καψίδιο του ιού αποτελούνται από πολλαπλά αντίγραφα μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών.
  - Ένα ιικό σωματίδιο για να είναι μολυσματικό θα πρέπει να είναι σωστά συναρμολογημένο.
- Λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι ένα κωδικόνιο έχει μοριακό βάρος περίπου 1000 και ότι κάθε αμινοξύ κατά μέσο όρο έχει μοριακό βάρος 150, δηλαδή, κάθε κωδικόνιο μπορεί να κωδικοποιεί μόνο το 15% και ότι το γένωμα των ιών είναι κατά κανόνα μερικές χιλιάδες νουκλεοτίδια, ο ιός για λόγους οικονομίας δεν έχει άλλη επιλογή από το να κατασκευάσει το καψίδιο του από πολλαπλά αντίγραφα μίας ή περισσότερων πρωτεϊνών.

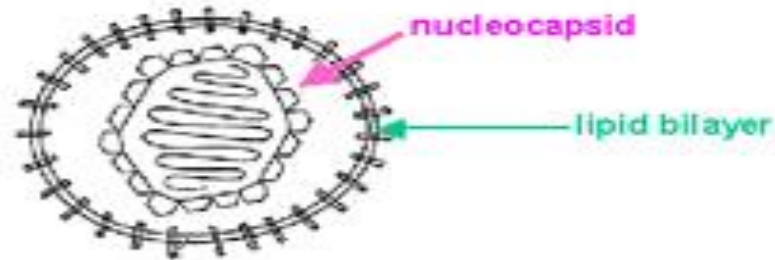
•Οι ιοί στο εκτός κυττάρου περιβάλλον είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι και μπορούν να επιζήσουν μόνο για λίγες ώρες, εκτός και αν προστατεύονται από ένα πρωτεϊνικό περιβάλλον, όπως ολικό αίμα

## 5 BASIC TYPES OF VIRAL SYMMETRY

icosahedral nucleocapsid

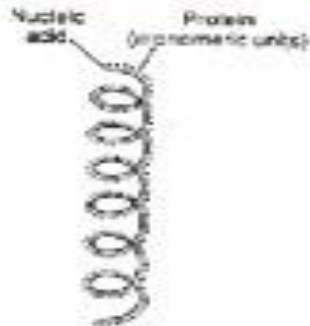


ICOSAHEDRAL

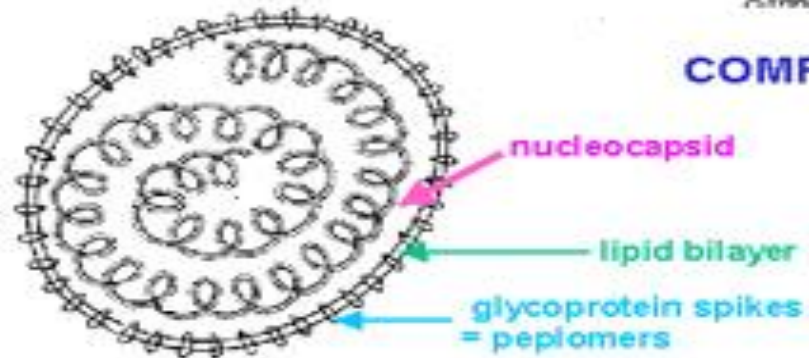


ENVELOPED ICOSAHEDRAL

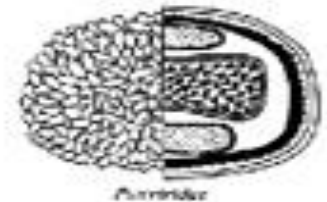
helical nucleocapsid



HELICAL

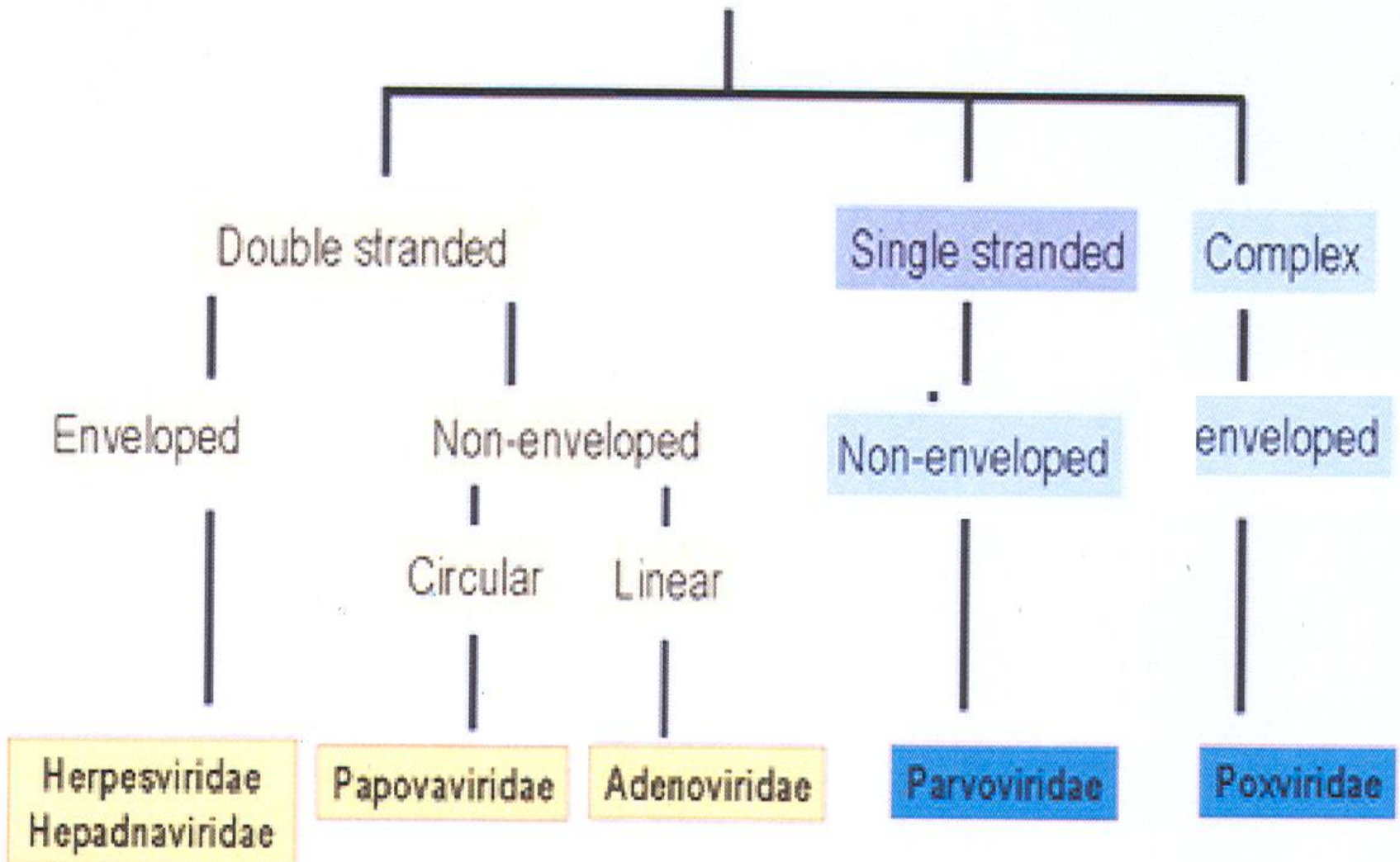


ENVELOPED HELICAL



COMPLEX

# DNA VIRUSES



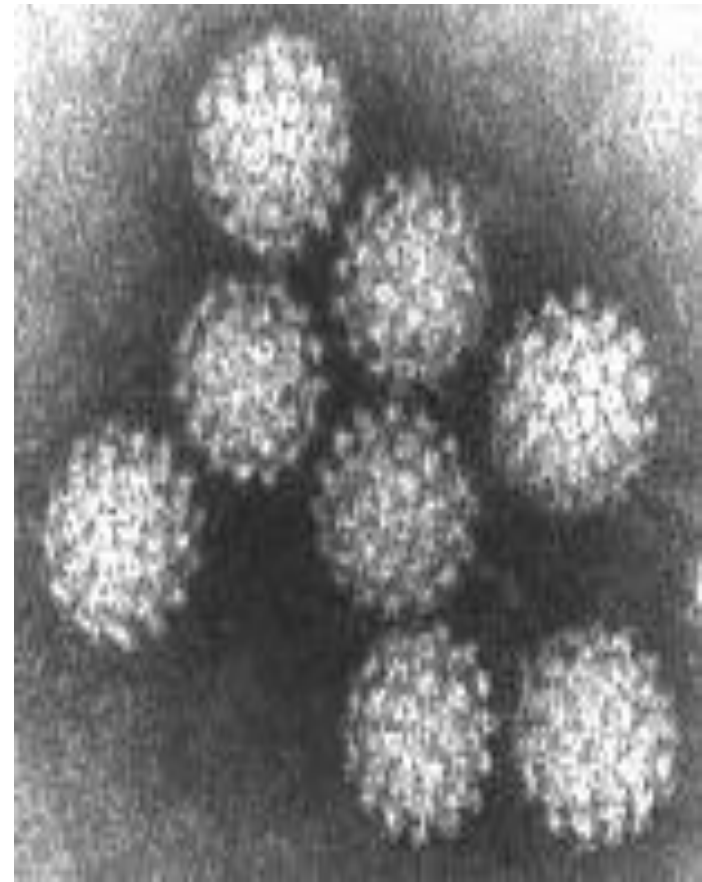
ADENOVIRUS



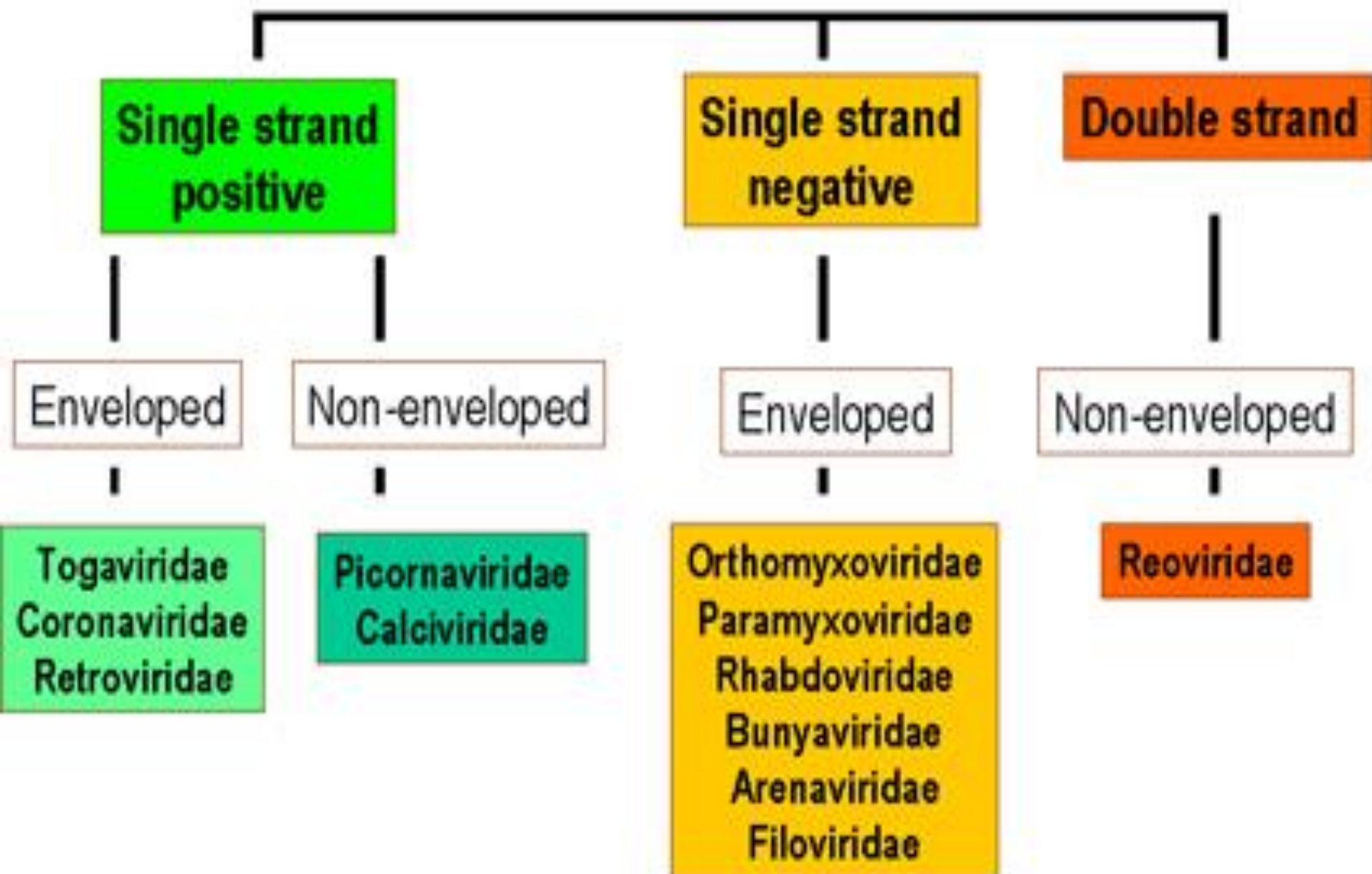
HSV-2



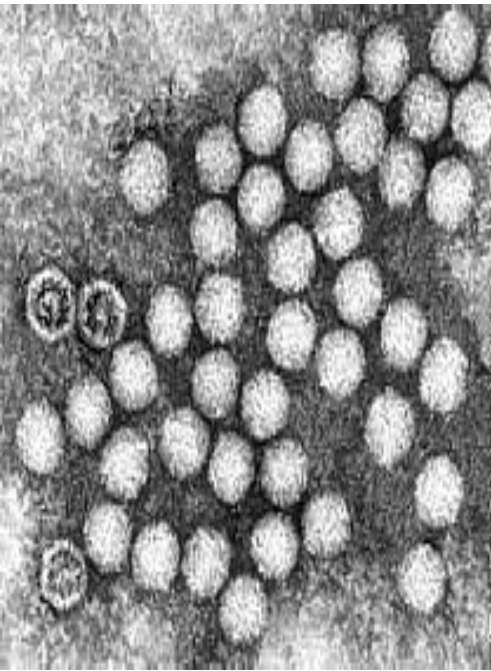
PAPILLOMA



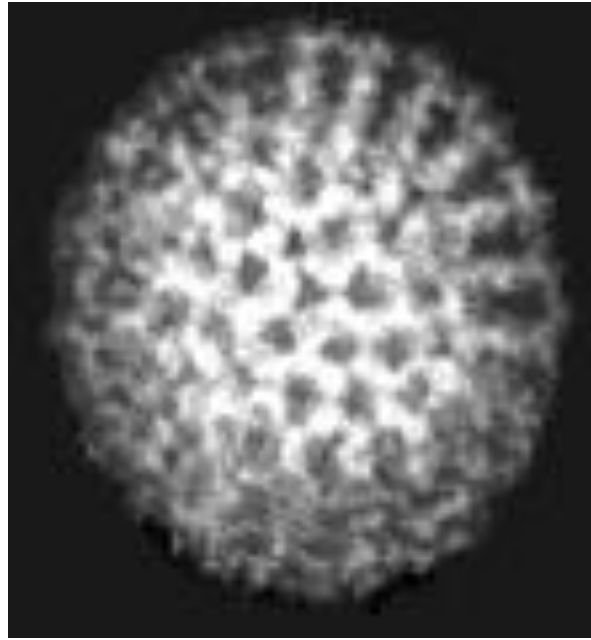
# RNA VIRUSES



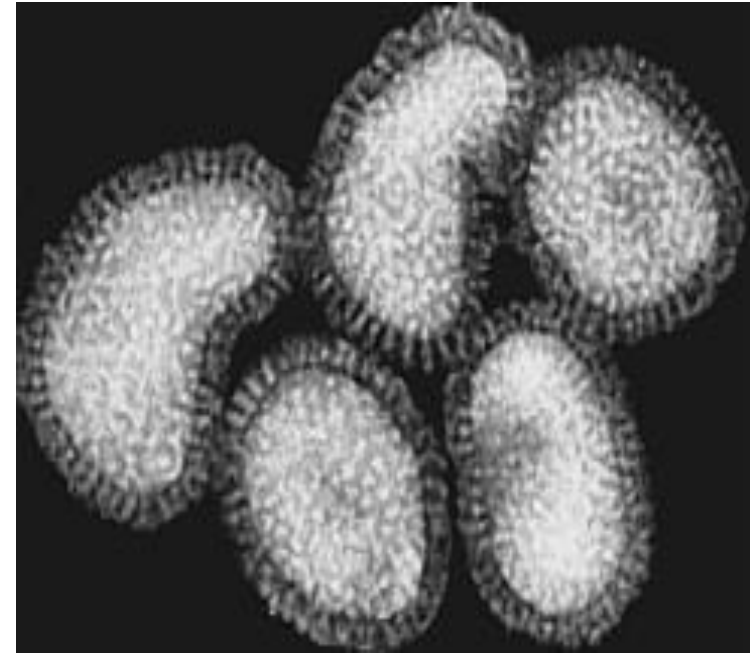
**ENTEROVIRUSES**



**ROTAVIRUS**

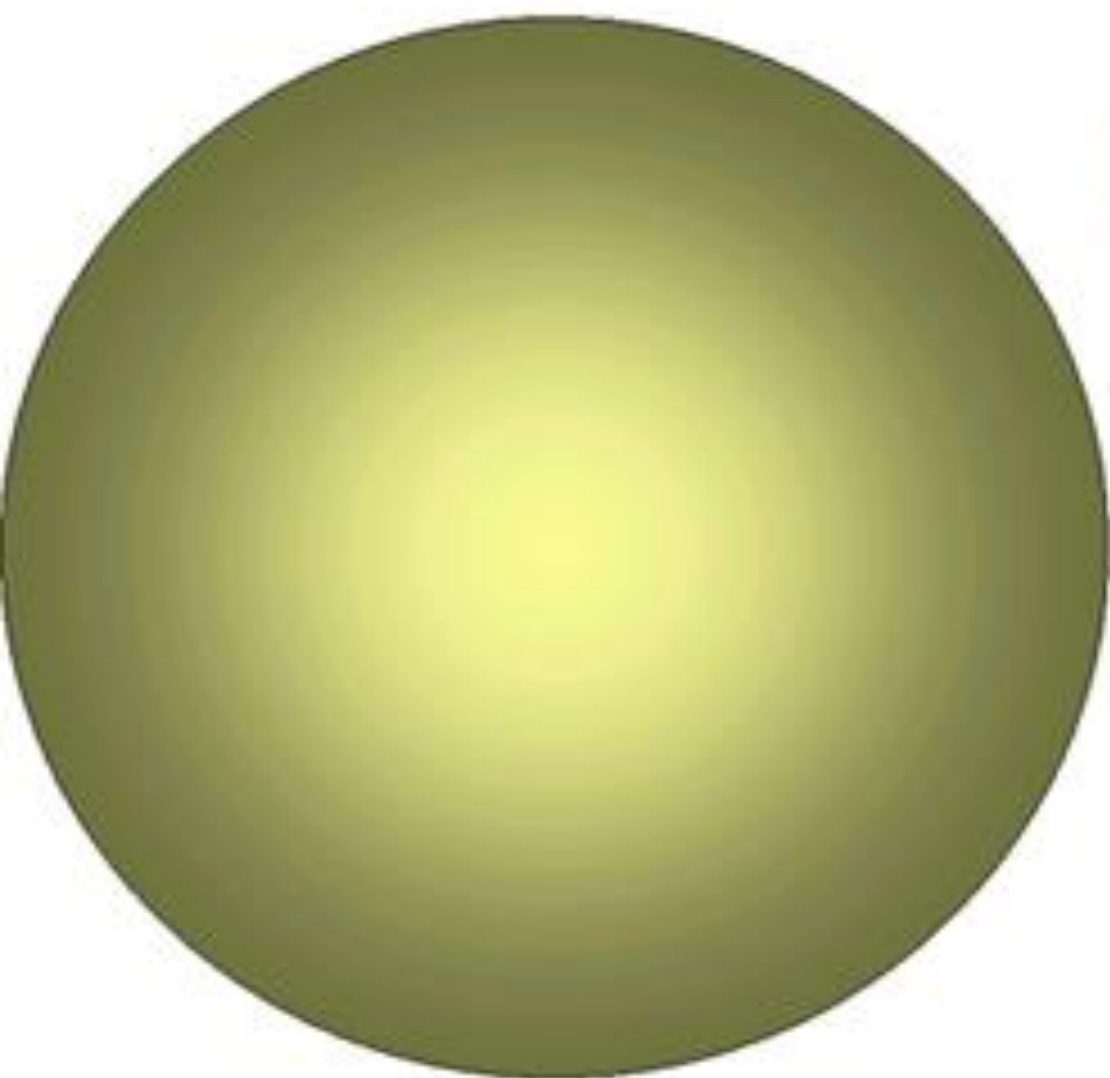


**INFLUENZA**





1 micron



Bacterium (Staphylococcus aureus)



Chlamydia



Pox virus



Herpes virus



Influenza virus



Picornavirus (polio)

# VIRAL CLASSIFICATION

**RNA or DNA**

**single-stranded or double-stranded**

**non-segmented or segmented**

**Nucleic acid**

**linear or circular**

**if genome is single stranded RNA, can it function as mRNA?**

**whether genome is diploid (it is in retroviruses)**

**Virion structure**

**symmetry (icosahedral, helical, complex)**

**enveloped or not**

**number of capsomers**

	Symmetry	Envelope	Size	Virion polymerase	Comments and some examples
PARVOVIRIDAE	I	-	20nm		Include adeno-associated virus, human parvovirus B19.
HEPADNAVIRIDAE	I	+	42nm	+	DNA replicates via an RNA intermediate. Includes hepatitis B virus which may increase risk of hepatocarcinoma.
PAPILLOMA-VIRIDAE *	I	-	40-60nm	-	some members cause warts, some associated with increased risk of cervical cancer
POLYOMA-VIRIDAE *	I	-	40-60nm	-	SV40, some members cause PML.
ADENOVIRIDAE	I	-	80nm	-	More than 40 human serotypes
HERPESVIRIDAE	I	+	190nm	-	Latency common. Includes herpes simplex type 1 and 2, varicella zoster virus (chicken pox, shingles), Epstein Barr virus (infectious mononucleosis), cytomegalovirus.
POXVIRIDAE	C	+	200nm x 350nm	+	Vaccinia, smallpox, cowpox viruses Cytoplasmic, very complex.

## RNA VIRUSES - POSITIVE SENSE

	Symmetry	Envelope	Size	Virion polymerase	Comments and some examples
PICORNAVIRIDAE	I	-	30nm	-	Includes enteroviruses, rhinoviruses, coxsackie virus, poliovirus, hepatitis A virus
CALICIVIRIDAE	I	-	35nm	-	gastroenteritis, Norwalk agent probably a member
TOGAVIRIDAE	I	+	60-70nm	-	<i>Alphavirus genus</i> : includes western equine encephalitis virus (WEE), eastern equine encephalitis virus (EEE), Venezuelan equine encephalitis virus, Chikungunya virus, Sindbis virus, Semliki Forest virus <i>Rubrivirus genus</i> : contains only rubella virus
FLAVIVIRIDAE	I	+	40-55nm	-	Include yellow fever, dengue, Japanese encephalitis, St. Louis encephalitis viruses, etc. Have only recently been given family status (formerly classed with Togaviridae).
CORONAVIRIDAE	H	+	75-160nm	-	Estimated responsible for 10-30% of common colds
RETROVIRIDAE	I	+	100nm	+	Have reverse transcriptase, some members oncogenic in animals. HIV is a member. Diploid genome.

## RNA VIRUSES - NEGATIVE SENSE

	Symmetry	Envelope	Size	Virion polymerase	Comments and some examples
RHABDOVIRIDAE	H	+	60 x 180nm	+	These include rabies virus, vesicular stomatitis virus, Mokola virus, Duvenhage virus
PARAMYXOVIRIDAE	H	+	150-300nm	+	Includes Newcastle disease virus, parainfluenza viruses, mumps virus, measles virus, respiratory syncytial virus
ORTHOMYXOVIRIDAE	H	+	80-120nm	+	Influenza type A and B viruses have segmented genome. They steal mRNA caps
BUNYAVIRIDAE	H	+	95nm	+	Over 86 members, most have arthropod vectors. Members include California encephalitis, LaCrosse, Crimean-Congo hemorrhagic fever, and Rift Valley fever viruses. Members of the hantavirus genus (includes agents of Korean hemorrhagic fever, human pulmonary syndrome in USA) seem to have rodent vectors. Segmented genome.
					Includes lymphocytic choriomeningitis, Lassa, dengue

## RNA VIRUSES - DOUBLE STRANDED

	Symmetry	Envelope	Size	Virion polymerase	Comments and some examples
REOVIRIDAE	I	-	75nm	+	The reoviridae include the reovirus, rotavirus and orbivirus genera. Human reovirus infections are apparently asymptomatic. Members of this group that affect humans include Colorado tick fever virus (orbivirus) and human rotaviruses (can cause gastroenteritis). All of these viruses have segmented genomes.

## ΓΕΝΩΜΑΤΑ

### ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΛΟΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΓΕΝΩΜΑΤΩΝ

Το νουκλεϊκό οξύ από το οποίο αποτελείται το ιικό γένωμα μπορεί να είναι RNA ή DNA μονόκλωνο ή δίκλωνο, ευθύγραμμο, κυκλικό ή τεμαχισμένο.

Τα μονόκλινα ιικά γενώματα μπορεί να είναι:

θετικής πολικότητας (+), δηλαδή της ίδιας πολικότητας με το mRNA, αρνητικής πολικότητας (-),

ή αμφοτερόσημο (ambisense) δηλ. ένα μείγμα αυτών των δύο.

Δεδομένου ότι οι ιοί αποτελούν ενδοκυτταρικά παράσιτα ικανά να αντιγράφονται μέσα στα κατάλληλα κύτταρα ξενιστές, το γένωμα τους θα πρέπει να περιέχει πληροφορίες κωδικοποιημένες σε τέτοια μορφή ώστε να μπορεί να αναγνωρισθεί και να αποκωδικοποιηθεί από τον συγκεκριμένο τύπο του κυττάρου ξενιστή τον οποίο παρασιτεί ο ιός. Ο γενετικός κώδικας που χρησιμοποιείται από τον ιό θα πρέπει να ταιριάζει ή τουλάχιστον να αναγνωρίζεται από το κύτταρο ξενιστή.

Ομοίως, τα σημεία ελέγχου τα οποία κατευθύνουν την έκφραση των γονιδίων του ιού θα πρέπει επίσης να αναγνωρίζονται από τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή.

**Η έρευνα του γενώματος ενός ιού θα πρέπει να απαντήσει στα ακόλουθα ερωτήματα :**

**Σύνθεση - δηλ. DNA ή RNA, μονόκλωνο ή δίκλωνο, γραμμικό ή κυκλικό.**

**Μέγεθος και αριθμός των τεμαχίων (segments)**

**Τελικές δομές του DNA ή RNA**

**Νουκλεοτιδική αλληλουχία**

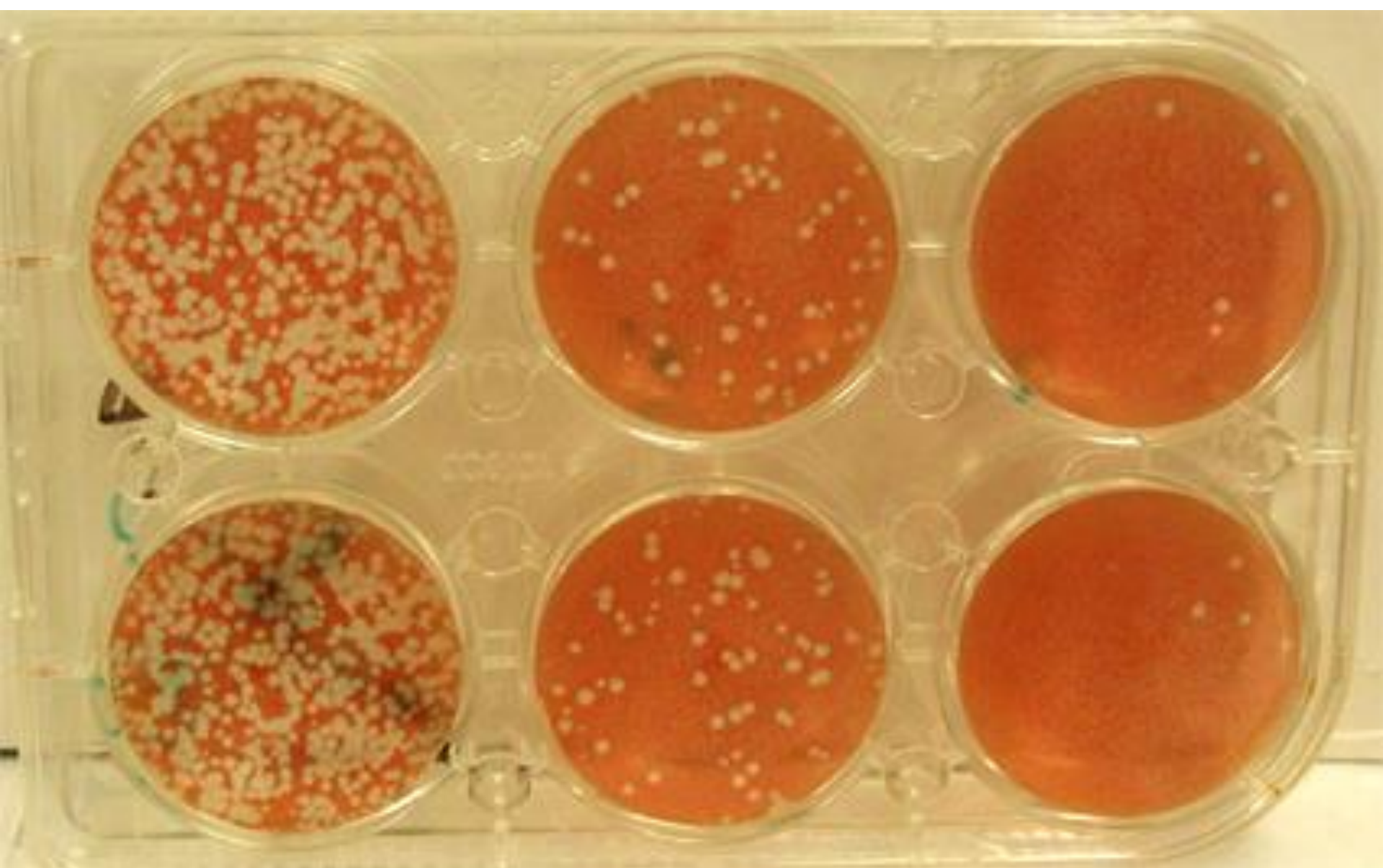
**Ικανότητα κωδικοποίησης- ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης**

**Ρυθμιστικά σημεία της γονιδιακής έκφρασης - μεταγραφή, επαγωγείς , επαυξητές , δομές κατάληξης της μεταγραφής κλπ.**

**Η άμεση ανάλυση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, εάν είναι βαθμονημένο με γνωστά πρότυπα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκτιμηθεί το μέγεθος του μορίων του νουκλεϊκού οξέος. Οι ηλεκτροφορήσεις του τύπου pulse-field gel electrophoresis (PFGE) και polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση ιών με τεμαχισμένα γενώματα.**

**Η κλασική γενετική ανάλυση των ιών των ζώων βασίζεται κατά μεγάλο μέρος στην απομόνωση και στην ανάλυση μεταλλαγμένων στελεχών , και επιτυγχάνεται συνήθως χρησιμοποιώντας την τεχνική «του καθαρισμού των πλακών» (βιολογική κλωνοποίηση).**





**Στην περίπτωση των ιών για τους οποίους δεν υπάρχουν κατάλληλα κυτταρικά συστήματα ανάπτυξης διότι δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις η γενετική ανάλυση πραγματοποιείται μέσω της μοριακής γενετικής.**

**Βιοχημική ανάλυση: Αναστολείς της μετάφρασης (όπως puromycin και cycloheximide) και της μεταγραφής (actinomycin D) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκρυπτογραφηθούν οι ρυθμιστικοί γενετικοί μηχανισμοί.**

**‘Εστιακές ανοσοδοκιμές – Focal immunoassays’ :εφαρμόζονται για την ανίχνευση ιών με την βοήθεια αντισωμάτων όταν οι ιοί αυτοί δεν προκαλούν εμφανείς κυτταρολογικές αλλοιώσεις .**

**Μοριακή βιολογία: κυρίως μέσω της ανεύρεσης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας**  
**Φυσική ανάλυση: Η χρήση διαφόρων μεθόδων ηλεκτροφόρησης υψηλής ευκρίνειας για την ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών (SSCP, PFGE, DGGE , TGGE κλπ).**

**Ανίχνευση εστιών μετασχηματισμού ( transformed foci): παραγωγή εστιών μετασχηματισμού σε κύτταρα από ιούς που δεν προκαλούν κυτταρικές αλλοιώσεις όπως DNA και RNA ογκογόνοι ιοί.**

## Γενετικός Χάρτης :

**Ανασυνδυασμός** μεταξύ δυο γενετικών τόπων (για ιούς των οποίων το γένωμα δεν είναι τεμαχισμένο) .

**Ανακατανομή (Reassortment)** στους ιούς των οποίων το γένωμα είναι τεμαχισμένο .

**Χάρτες περιορισμού** με την βοήθεια ενζύμων περιορισμού ειδικών για συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες του ιικού γενώματος.

Τα RNA γενώματα μπορούν να αναλυθούν με αυτόν τον τρόπο επίσης μετά από την δημιουργία cDNA.

**Χάρτες μεταγραφής:** χάρτες περιοχών οι οποίες κωδικοποιούν για mRNAs μπορούν να δημιουργηθούν μετά από υβριδισμό των παραγόμενων mRNAs.

**Χάρτες μετάφρασης:** με την χορήγηση π.χ. ραδιενεργού <sup>35</sup>S πριν και μετά την χορήγηση αναστολέων της έναρξης της μετάφρασης όπως της Puromycin έχει χρησιμοποιηθεί για την χαρτογράφηση πρωτεϊνών.

## Ορολογία σχετική με τα στελέχη ιών :

**Στέλεχος :** Διαφορετικές απομονώσεις του ίδιου ιού, π.χ. από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές ή από διαφορετικούς ασθενείς

**Τύποι:** Διαφορετικοί ορότυποι του ίδιου ιού (π.χ. διαφορετικοί «φαινότυποι» εξουδετερωτικών αντισωμάτων).

**Παραλλαγή (variant) :** Ένας ιός του οποίου ο φαινότυπος διαφέρει από το αρχικό στέλεχος άγριου-τύπου.

## ΤΥΠΟΙ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΕ ΕΝΑΝ ΙΟ

Οι κατωτέρω μεταλλάξεις μπορούν να προκληθούν είτε μέσω φυσικής οδού είτε να προκληθούν πειραματικά :

- **Απαλείψεις :** οι αυθόρμητες απαλείψεις συχνά συσσωρεύονται σε πληθυσμούς ελαττωματικών στελεχών ( defective- interfering -D.I.- particles ).

Αυτά τα μη μεταδοτικά αλλά όχι απαραίτητως γενετικώς αδρανή γενώματα πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση της παθογένεσης συγκεκριμένων λοιμώξεων . Οι γενετικές απαλείψεις μπορούν μόνο να επανέλθουν στο στέλεχος «αγρίου τύπου» μέσω ανασυνδυασμού, ο οποίος συνήθως συμβαίνει σε χαμηλές συχνότητες.

- **Ανερμηνεύσιμες (Nonsense):** Αυτές οι μεταλλάξεις προέρχονται από την αλλαγή της αλληλουχίας ενός κωδικονίου με αποτέλεσμα την μετατροπή του κωδικονίου σε ένα από τα ακόλουθα τρία τερματισμού της μετάφρασης μιας πρωτεΐνης (UAG, UAA, UGA).

- **Μορφολογία «της πλάκας λύσης των κυττάρων»:** Οι μεταλλάξεις μπορούν να δημιουργούν στελέχη που σχηματίζουν μεγάλες πλάκες ( άρα αντιγράφονται πιο γρήγορα από ότι ο άγριος- τύπος) , είτε να σχηματίζουν μικρότερες πλάκες σε σχέση με τον άγριο τύπο ( άρα αντιγράφονται πιο αργά ).

Το μέγεθος της πλάκας συχνά συνδέεται με την ευαισθησία στην θερμοκρασία (t.s. phenotype ).

- **Ευαισθησία στην θερμοκρασία (t.s.):** Οι μεταλλάξεις που είναι ευαίσθητες συνήθως προέρχονται από mis- sense μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες (δηλαδή υποκαταστάσεις αμινοξέων), που καταλήγουν σε πρωτεΐνες με τροποποιημένη στερεοδιαμόρφωση οι οποίες λειτουργούν σε χαμηλές θερμοκρασίες (permissive) αλλά όχι σε υψηλότερες θερμοκρασίες (non-permissive).

Συνήθως ο άγριος- τύπος του ιού αντιγράφεται γρηγορότερα από ότι ο μεταλλαγμένος .

•Cold-sensitive (c.s.): Αυτές οι μεταλλάξεις είναι οι αντίθετες των t.s. μεταλλάξεων και είναι χρήσιμες για την μελέτη των βακτηριοφάγων και των ιών των φυτών των οποίων τα κύτταρα ξενιστές μπορούν να αναπαραχθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα είναι πολύ λιγότερο χρήσιμες για τους ιούς των ζώων διότι τα κύτταρα των ξενιστών τους γενικά δεν αναπτύσσονται σε σημαντικά χαμηλότερες θερμοκρασίες από ότι τα φυσιολογικά κύτταρα.

•Αντίστροφες μεταλλάξεις ( Revertants): Οι περισσότεροι από τους παραπάνω τύπους μεταλλάξεων μπορούν να οδηγήσουν σε διόρθωση της αρχικής μετάλλαξης μέσω μιας δεύτερης μετάλλαξης η οποία αντισταθμίζει τα αποτελέσματα της πρώτης μετάλλαξης.

## ΚΑΤΑΣΤΟΛΗ

Η καταστολή είναι η αναστολή ενός μεταλλαγμένου φαινότυπου από μια δεύτερη μετάλλαξη καταστολής, η οποία μπορεί να συμβεί στο γένωμα του ιού.

Η καταστολή μπορεί επίσης να είναι βιολογικώς σημαντική, επιτρέποντας στους ιούς να ξεπεράσουν τα αρνητικά αποτελέσματα ορισμένων μεταλλάξεων.

Οι μεταλλαγμένοι ιοί μπορούν επομένως να επιστρέψουν στον αρχικό τους φαινότυπο μέσω τριών τρόπων:

- Μιας νέας μετάλλαξης η οποία ακυρώνει την προηγούμενη (back mutation) και επαναφέρει τον ιό στον γενότυπο/φαινότυπο (genotype/phenotype) του αγρίου τύπου (αληθινή αντιστροφή).
- Μια δεύτερη, αντισταθμιστική μετάλλαξη μπορεί να συμβεί στο ίδιο γονίδιο όπως και η αρχική μετάλλαξη και η οποία διορθώνει και αποκαθιστά τις συνέπειες της πρώτης μετάλλαξης .
- Μια μετάλλαξη που καταστέλλει τις αρχικές επιπτώσεις της πρώτης σε ένα διαφορετικό γονίδιο του ιού.

Πειραματικώς, οι γενετικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αναλυθούν με μια μεικτή μόλυνση ( υπερμόλυνση ) κυττάρων σε καλλιέργεια.

Δυο τύποι πληροφόρησης μπορούν να αποκτηθούν από τέτοια πειράματα: Την κατάταξη των μεταλλάξεων σε λειτουργικές ομάδες γνωστές ως ομάδες συμπλήρωσης

Η διάταξη των μεταλλάξεων σε ένα γενετικό χάρτη μέσω ανάλυσης των συχνοτήτων ανασυνδυασμού.

## ΣΥΜΠΛΗΡΩΣΗ

Σε μια μεικτή μόλυνση ένας ιός προμηθεύει ένα λειτουργικό γονίδιο σε κάποιον άλλον ιό ο οποίος είναι ελαττωματικός για αυτό ακριβώς το γονίδιο (λειτουργία).

Εάν και οι δυο μεταλλάξεις είναι ελαττωματικές για την ίδια λειτουργία, αύξηση του ρυθμού αντιγραφής δεν συμβαίνει και οι δυο μεταλλάξεις λέγεται ότι βρίσκονται στην ίδια ομάδα συμπλήρωσης (complementation).

Θεωρητικά, ο αριθμός των ομάδων συμπλήρωσης είναι ίσος με τον αριθμό των γονιδίων του γενώματός του ιού.

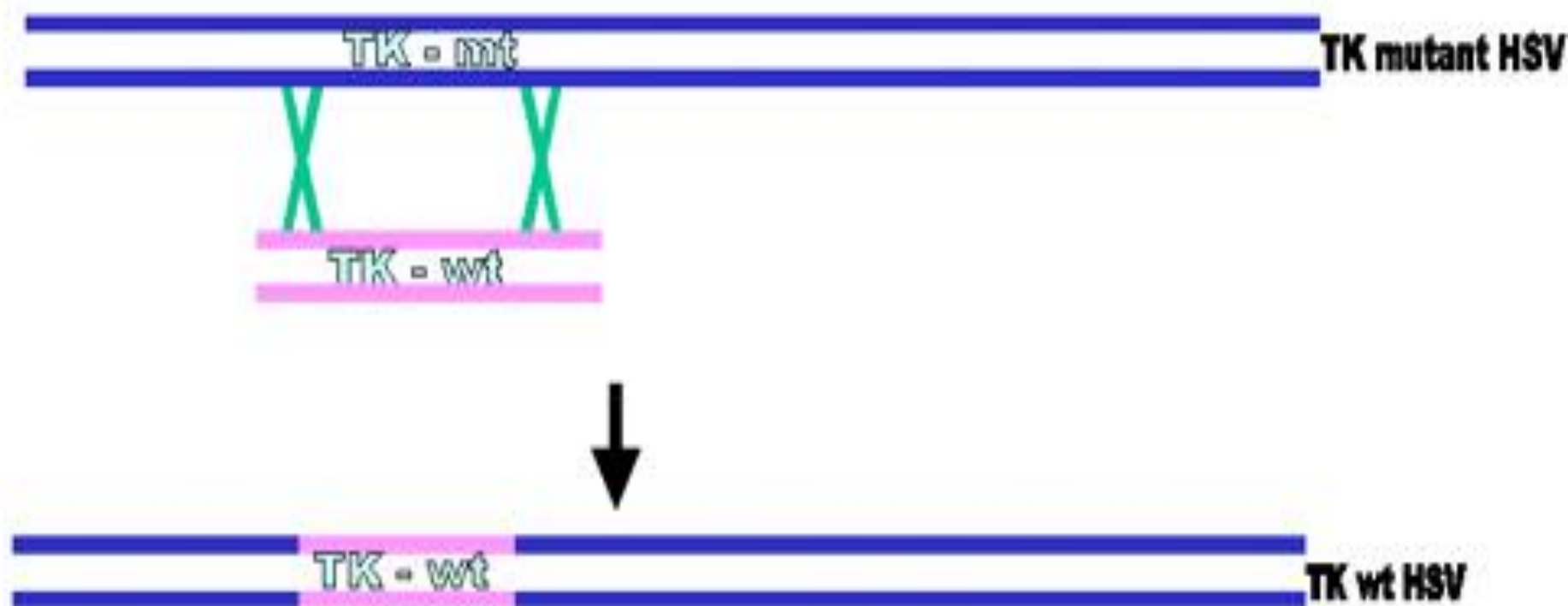
Υπάρχουν δυο πιθανοί τύποι συμπλήρωσης:

- Αλληλόμορφη ενδογονιδιακή συμπλήρωση (Allelic intragenic): όταν διαφορετικές μεταλλάξεις έχουν συμπληρωματικά ελαττώματα για την ίδια πρωτεΐνη, όπως π.χ. σε διαφορετικές υπομονάδες μιας πολυμερούς πρωτεΐνης.
- Μη αλληλόμορφη ενδογονιδιακή συμπλήρωση (Non-allelic intergenic) : συμπλήρωση όταν οι μεταλλάξεις με ελαττώματα τοποθετούνται σε διαφορετικά γονίδια. Αυτός είναι ο πιο συνηθισμένος τύπος.

Όταν η συμπλήρωση συμβαίνει στη φύση πρόκειται συνήθως για την περίπτωση ενός ιού αγρίου τύπου ικανού για αντιγραφή, ο οποίος 'σώζει' έναν ελαττωματικό ιό μη δυνάμενο να αντιγραφεί δηλ. ο ελαττωματικός ιός αντιγράφεται.

Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο ιός αγρίου τύπου αναφέρεται ως βοηθητικός ιός.

## marker rescue





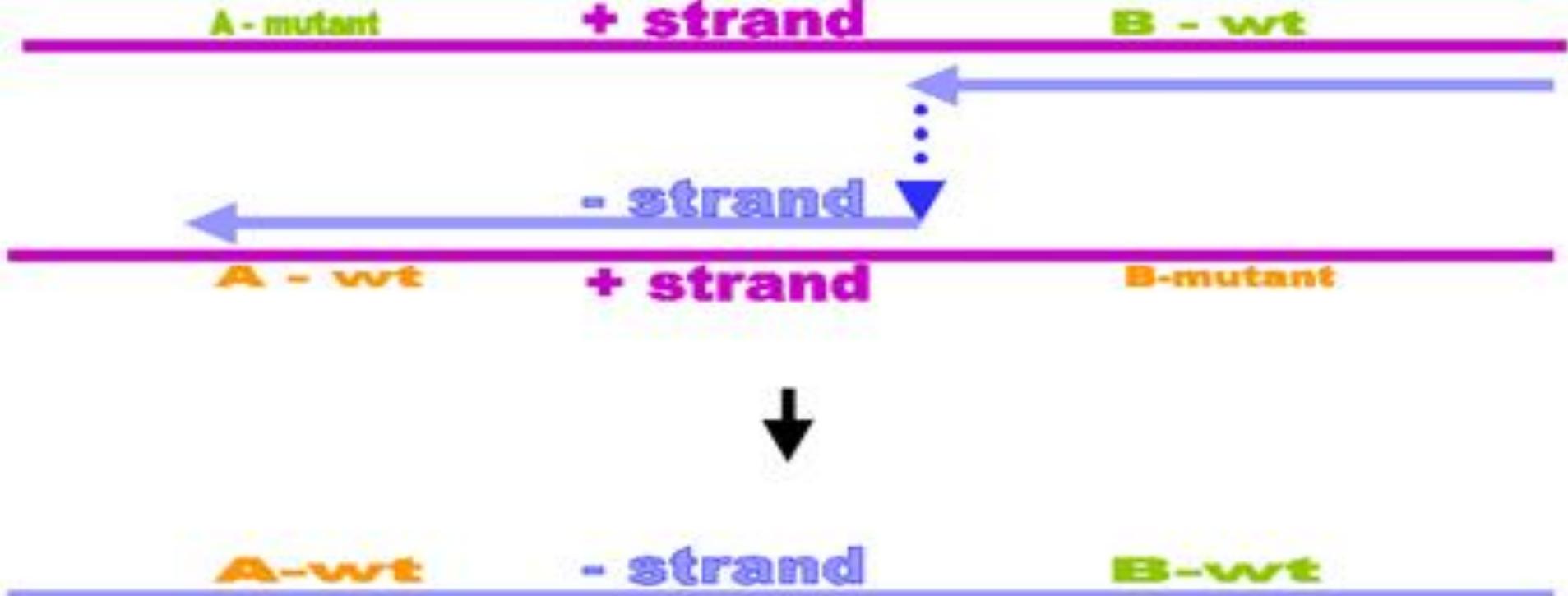
## ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ

Ο ανασυνδυασμός είναι η φυσική αλληλεπίδραση των γενωμάτων ιών κατά την διάρκεια της υπερμόλυνσης, καταλήγοντας σε συνδυασμούς γονιδίων που δεν υπάρχουν σε κανένα από τους «γονείς».

Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί με τους οποίους αυτό μπορεί να συμβεί και οι οποίοι εξαρτώνται από την οργάνωση του γενώματος του ιού:

- Ενδομοριακός ανασυνδυασμός μέσω θραύσης και επανασύνδεσης του ιικού γενώματος (Intramolecular recombination by strand breakage and re-ligation): Αυτή η διαδικασία συμβαίνει σε όλους τους DNA και RNA ιούς των οποίων η αντιγραφή επιτυγχάνεται με ενδιάμεσο το DNA. Πιστεύεται ότι μεσολαβούν κυτταρικά ένζυμα.
- Ενδομοριακός ανασυνδυασμός μέσω «επιλογής αντιγράφου» (Intramolecular recombination by 'copy-choice'): συμβαίνει σε RNA ιούς, πιθανώς μέσω ενός μηχανισμού κατά τον οποίο η RNA πολυμεράση του ιού αλλάζει μήτρα κατά την διάρκεια της σύνθεσης του γενώματος. Οι μοριακές λεπτομέρειες αυτής της διαδικασίας δεν είναι γνωστές.

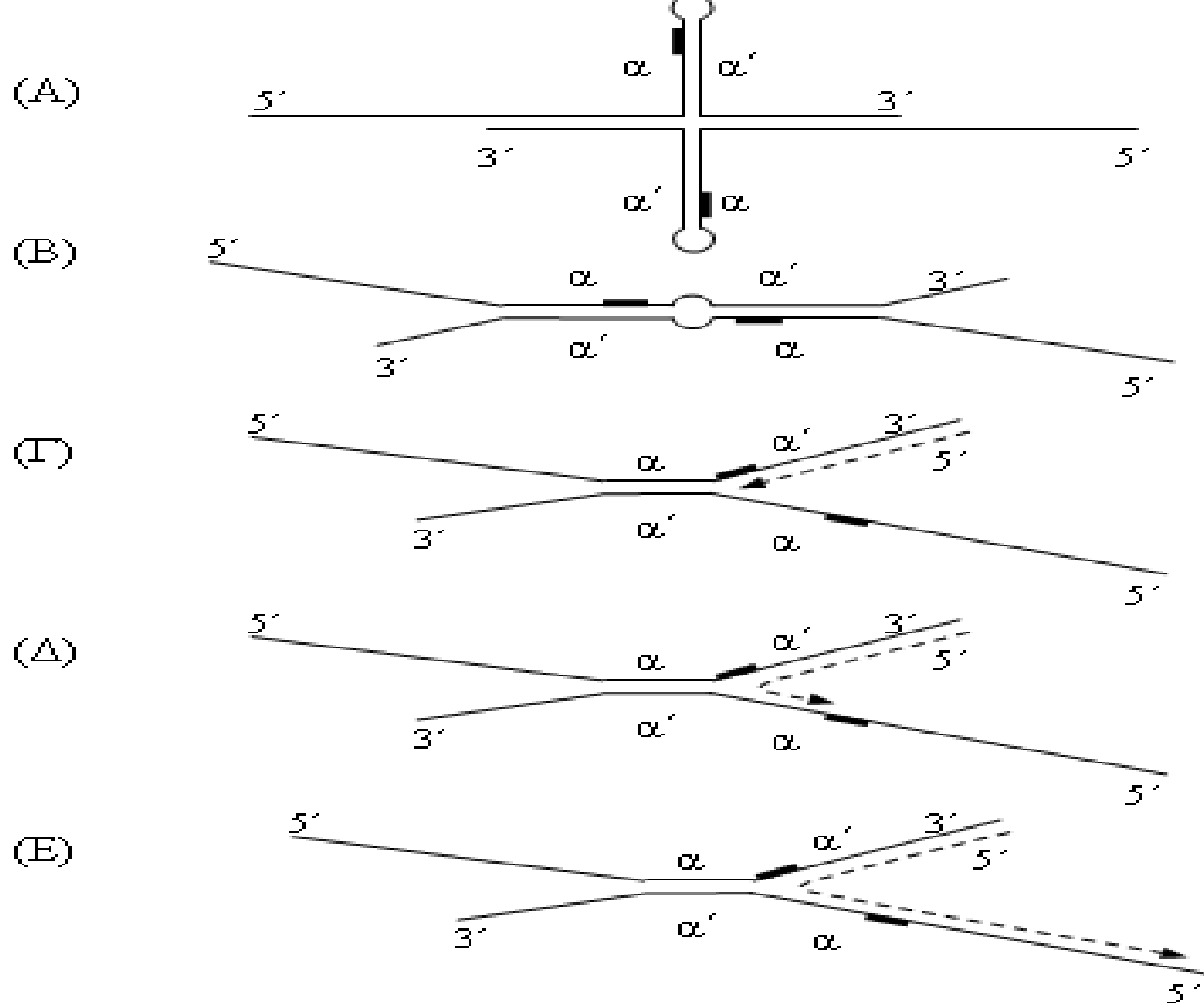
Ελλατωματικά ιικά σωματίδια (Defective Interfering particles) πιστεύεται ότι δημιουργούνται συνήθως μέσω της διαδικασίας αυτής.



Ο ευρύτερα αποδεκτός μηχανισμός για τον ανασυνδυασμό του RNA των πολιοϊών είναι ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism) από την 3D πολυμεράση κατά την διάρκεια της (-) σύνθεσης νέου RNA . Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου RNA (γι αυτό αναφέρεται και ως ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου). Αναλυτικότερα, η 3D πολυμεράση, κατά την σύνθεση του RNA, συναντά κάποιο εμπόδιο, με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας, ως μήτρα, ένα εναλλακτικό ιϊκό RNA. Έχει προταθεί, ότι το εμπόδιο, που συναντά η ιϊκή πολυμεράση, μπορεί να είναι μια δευτεροταγής δομή φουρκέτας, η οποία σχηματίζεται από την παρουσία αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα .

Το αποτέλεσμα είναι να μεταπηδά η 3D πολυμεράση από το ένα μόριο στο άλλο. Η άποψη αυτή ενισχύθηκε από την παρατήρηση, ότι ο ανασυνδυασμός προάγεται στα πλαίσια των μεικτών συμπλόκων αντιγραφής, τα οποία είναι πολύπλοκα συστήματα αντιγραφής με περισσότερα από ένα μόρια RNA.

Το αποτέλεσμα μπορεί να είναι η δημιουργία ενός χιμαιρικού μορίου S2/S1 , S2/S3, S3/S2 , S3/S1 και πολύ σπανιότερα S1/S2 , S1/S3 ή ακόμη και διπλά ανασυνδυασμένα χιμαιρικά μόρια όπως όπως π.χ. S3/S2/S1.



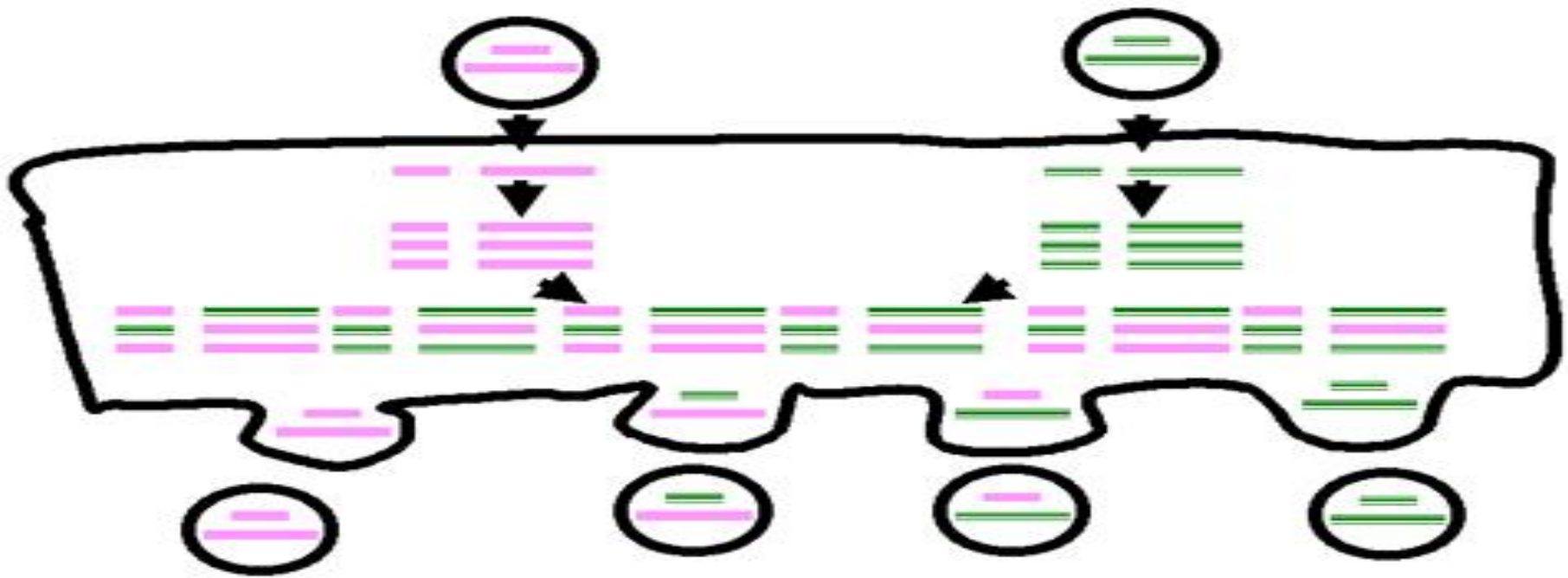
Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού . Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που, χρησιμεύουν ως μήτρες ανασυνδυασμού. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι  $\alpha$  και  $\alpha'$ , ενώ οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις, όπου πραγματοποιείται ο ανασυνδυασμός. Η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA π.χ. τύπου S2/S3.

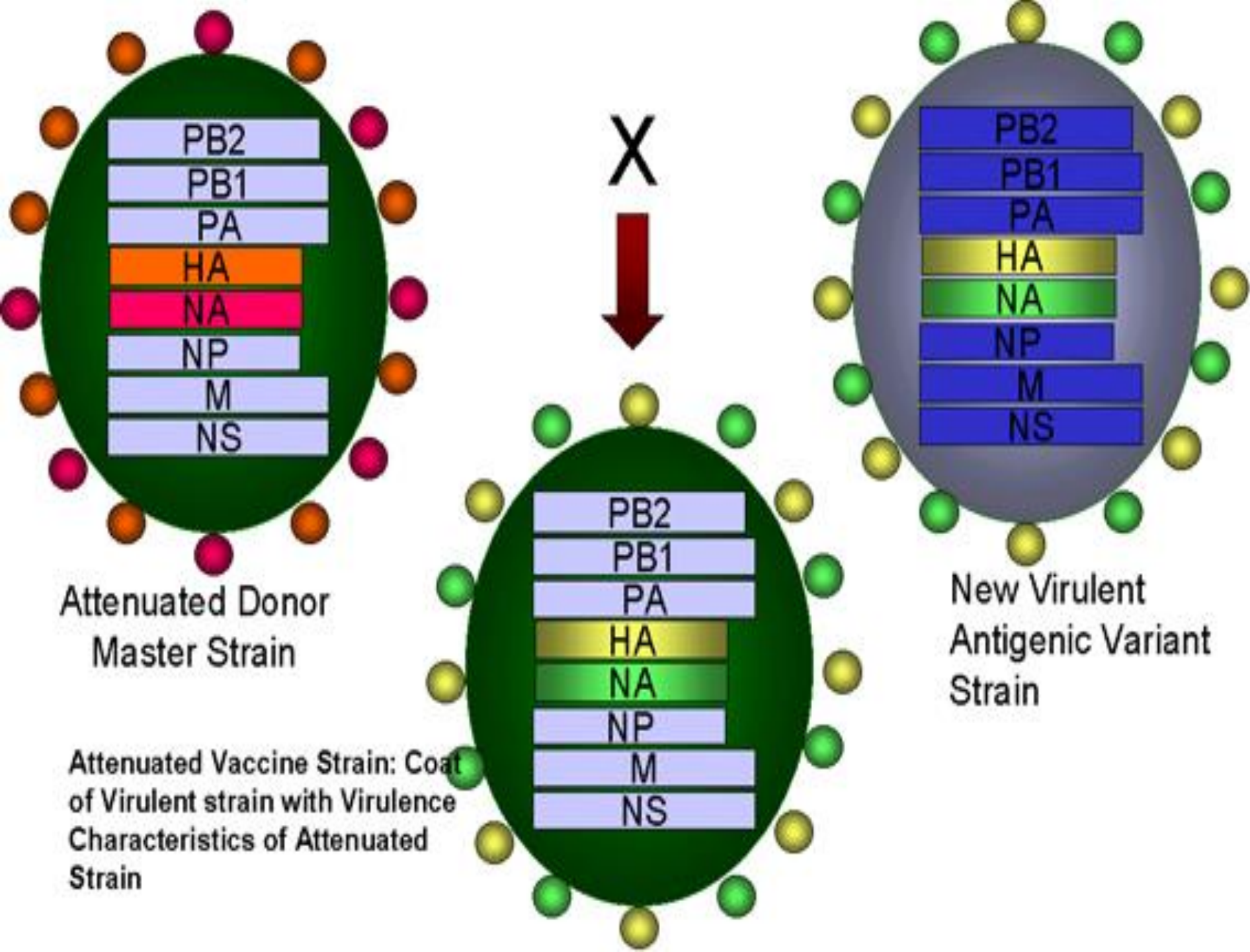
**Ανακατανομή (Reassortment) :** σε ιούς των οποίων το γένωμα είναι τεμαχισμένο , τα τεμάχια του γενώματος μπορούν «να ανακατεύονται τυχαία» κατά την διάρκεια της υπερμόλυνσης.

Οι απόγονοι ιοί λαμβάνουν (τουλάχιστον) ένα από κάθε τεμάχιο του γενώματος, αλλά πιθανώς όχι από έναν μόνο γονέα. Για παράδειγμα, ο ιός της Γρίπης A (influenza virus) έχει οχτώ τεμάχια (genome segments), επομένως σε μια μεικτή μόλυνση, μπορούν να υπάρχουν  $2^8 = 256$  πιθανοί απόγονοι ιοί.

Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν στην δημιουργία γονιδιακών ανακατανομών (reassortants).

## REASSORTMENT





Attenuated Donor  
Master Strain

Attenuated Vaccine Strain: Coat  
of Virulent strain with Virulence  
Characteristics of Attenuated  
Strain

New Virulent  
Antigenic Variant  
Strain

Στο ανωτέρω παράδειγμα ένα εμβολιακό εξασθενημένο ζωντανό στέλεχος γρίπης A ( στο αριστερό άκρο με τους αντιγονικούς καθοριστές HA και NA με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα ) μολύνει το ίδιο κύτταρο με ένα στέλεχος αγρίου τύπου ( στο δεξιό άκρο με τους αντιγονικούς καθοριστές HA και NA με κίτρινο και πράσινο χρώμα αντίστοιχα). Μετά την ανακατανομή των 8 γονιδίων προκύπτει ένα νέο στέλεχος γρίπης A με 6 γονίδια από το εμβολιακό εξασθενημένο ζωντανό στέλεχος ( με θαλασσί χρώμα ) αλλά με τους αντιγονικούς καθοριστές αγρίου τύπου HA και NA με πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα.

Οι ανακατανομές των γονιδίων στον ιό της Γρίπης A έχουν οδηγήσει σε παγκόσμιες επιδημίες ή και πανδημίες οι οποίες έχουν επιφέρει τον θάνατο σε εκατομμύρια ανθρώπους.

ΟΝΟΜΑ	ΕΤΟΣ	ΘΑΝΑΤΟΙ ΣΕ ΕΚΑΤΟΜΜΥΡΙΑ	ΥΠΟΤΥΠΟΙ
ΡΩΣΙΚΗ Η ΑΣΙΑΤΙΚΗ ΓΡΙΠΗ	1889-90	1	πιθανώς <a href="#">H2N2</a>
ΙΣΠΑΝΙΚΗ	1918-20	40	<a href="#">H1N1</a>
ΑΣΙΑΤΙΚΗ	1957-58	1-1.5	<a href="#">H2N2</a>
ΓΡΙΠΗ ΤΟΥ <a href="#">Hong Kong</a>	1968-69	0.75	<a href="#">H3N2</a>

**ΠΑΝΔΗΜΙΕΣ ΟΙ ΟΠΟΙΕΣ ΠΡΟΚΛΗΘΗΚΑΝ ΑΠΟ ΣΤΕΛΕΧΗ ΙΩΝ ΓΡΙΠΗΣ A**

# Ορθομυξοϊοί

Γένος

Ορότυποι ή υπότυποι

Ξενιστές

Influenzavirus A

H1N1, H1N2, H2N2, H3N1, H3N2, H3N8, H5N1, H5N2,  
H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7,  
H9N2, H10N7

Άνθρωπος ,  
χοίρος, πτηνά,  
άλογο

Influenzavirus B

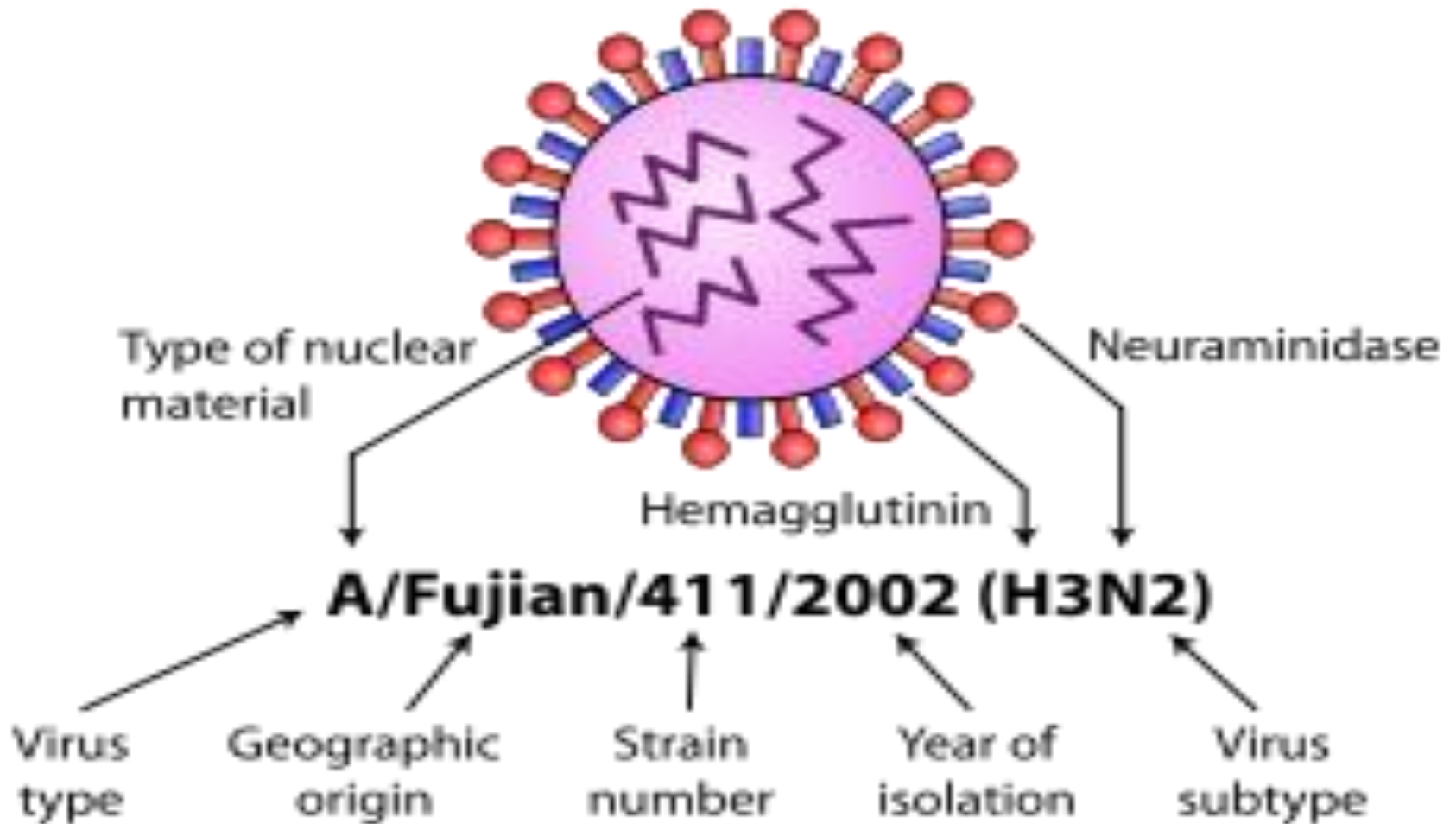
Κυρίως  
άνθρωπος

Influenzavirus C

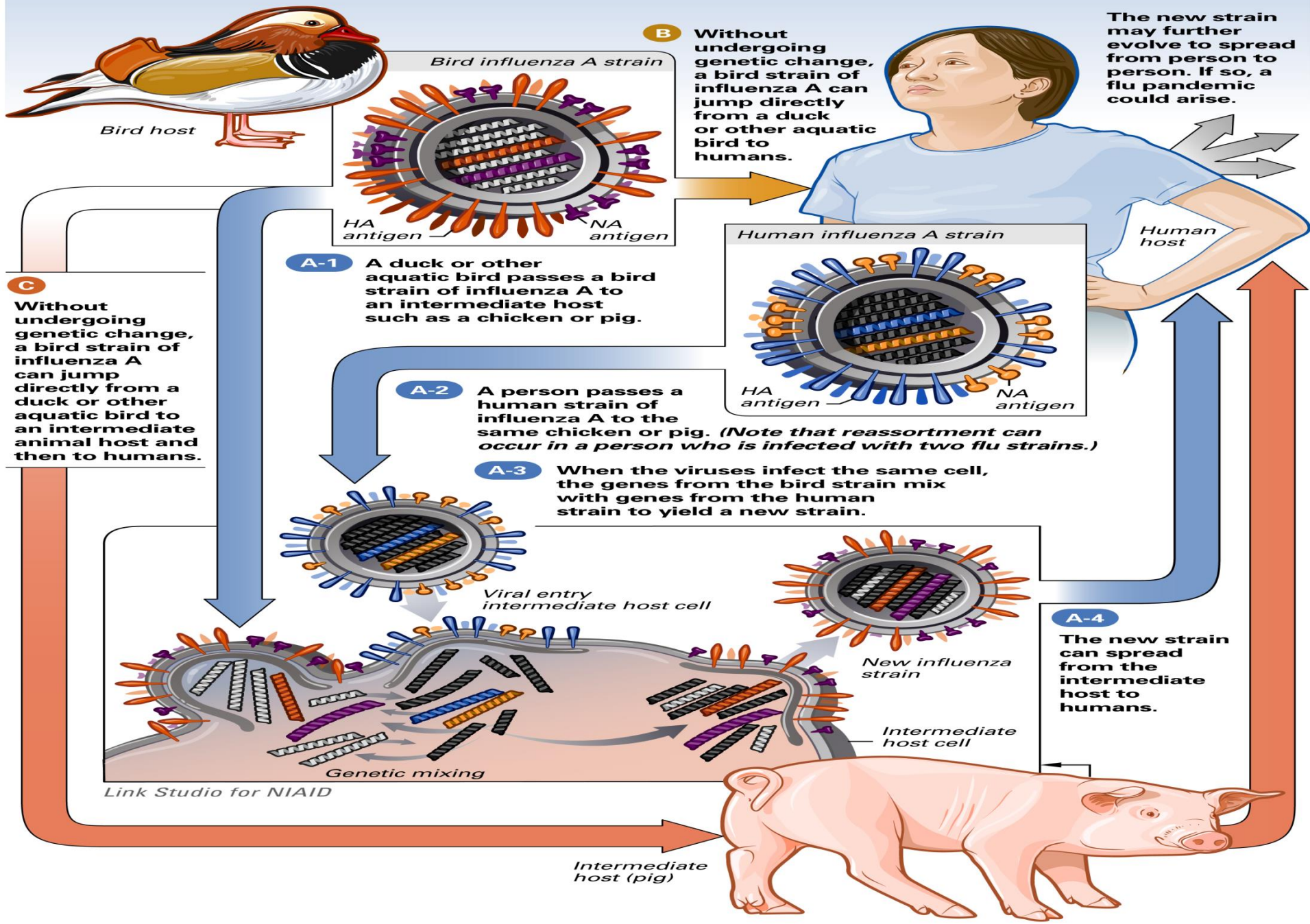
Άνθρωπος , χοίρος



# ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ Η ΟΠΟΙΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΓΡΙΠΠΗΣ Α



The genetic change that enables a flu strain to jump from one animal species to another, including humans, is called "ANTIGENIC SHIFT." Antigenic shift can happen in three ways:



The new strain may further evolve to spread from person to person. If so, a flu pandemic could arise.

The new strain can spread from the intermediate host to humans.

Intermediate host (pig)

Link Studio for NIAID

## **ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΤΗΣΙΟΥ ΕΜΒΟΛΙΟΥ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΤΗΣ ΓΡΙΠΗΣ Α&Β**

**Η σύνθεση του εμβολίου κατά το έτος 2008-2009 ( βόρειο ημισφαίριο) σύμφωνα με τις οδηγίες της Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας (ΠΟΥ) ήταν:**

A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus;

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like virus;

B/Florida/4/2006-like virus (B/Florida/4/2006 και B/Brisbane/3/2007 )

Η σύσταση του εμβολίου καθορίζεται κάθε από μεγάλο αριθμό εποχιακών στελεχών τα οποία απομονώθηκαν το προηγούμενο έτος και χαρακτηρίστηκαν αντιγονικά . Ετσι σε 947 εποχιακά στελέχη γρίπης Α ευρέθη ότι τα στελέχη αυτά προσομοίαζαν με το εμβολιακό στέλεχος influenza A (H1N1) (A/Brisbane/59/2007). Σε 162 εποχιακά στελέχη influenza A (H3N2) ευρέθη ομοίως ότι προσομοίαζαν με το εμβολιακό στέλεχος A (H3N2) (A/Brisbane/10/2007). Επιπλέον απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 84 στελέχη influenza A (H1N1) τα οποία προσομοίαζαν αντιγονικώς με το στέλεχος A/California/07/2009 (H1N1).

Σχετικά με την γρίπη Β τα στελέχη τα οποία απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν κατά την ίδια χρονική περίοδο ανήκαν στους υπότυπους B/Yamagata/16/88 and B/Victoria/02/87 . Εξ αυτών 61 στελέχη influenza Β ανήκαν στον υπότυπο B/Yamagata και προσομοίαζαν με το εμβολιακό στέλεχος B/Florida/04/2006 και για τον λόγο αυτό τα στελέχη B/Florida/4/2006 και B/Brisbane/3/2007 συμπεριλήφθηκαν στο εμβόλιο . Ομοίως ακολουθώντας την ίδια μεθοδολογία η ΠΟΥ και για το νότιο ημισφαίριο συνέστησε να συμπεριληφθούν τα ακόλουθα στελέχη κατά τα έτη 2008-2009.

A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus;

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like virus;

B/Florida/4/2006-like virus

**Κατά τα έτη 2009-2010 η ΠΟΥ είχε προτείνει την 12 Φεβρουαρίου του 2009 το εμβόλιο να περιλαμβάνει τα στελέχη :**

A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus;

A/Brisbane/10/2007 (H3N2)-like virus;

B/Brisbane/60/2008-like virus.

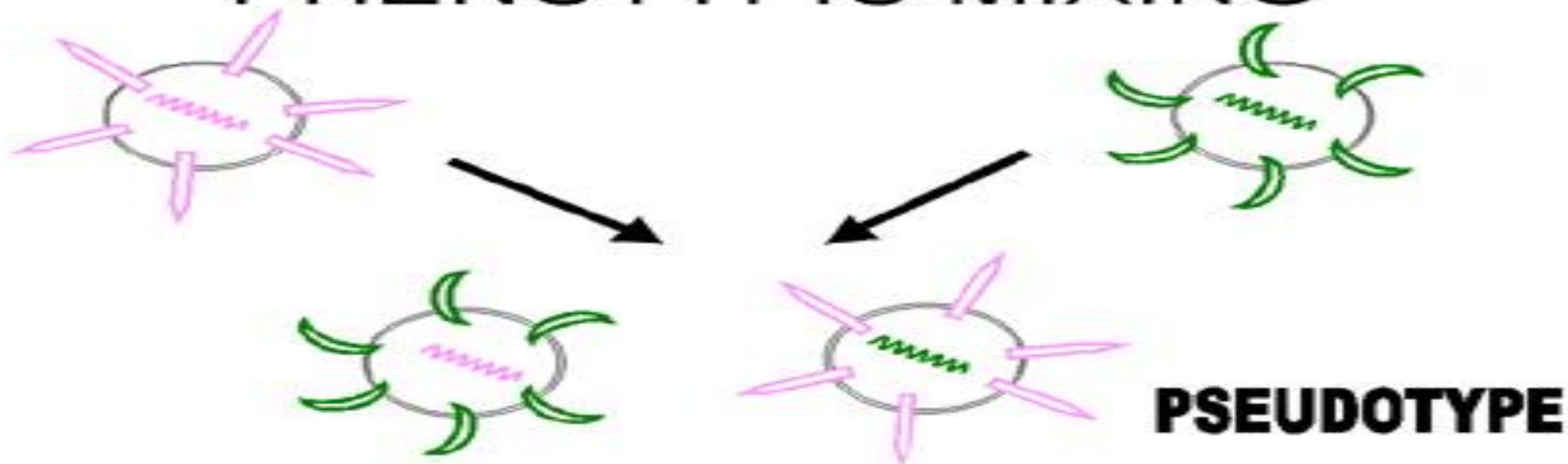
Δεδομένου ότι το στέλεχος A/Brisbane/59/2007 (H1N1)-like virus, δεν δημιουργεί ικανοποιητική ανοσία έναντι της νέας γρίπης των χοίρων, η οποία παρουσιάστηκε τον Μάρτιο του 2009 και έλαβε παγκόσμια εξάπλωση , ένα νέο εμβόλιο [influenza A νέου υπότυπου \( H1N1\)](#) παρασκευάστηκε το οποίο αναμένεται να παρέχει ικανοποιητική ανοσία.

## ΜΗ- ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΙΩΝ

Η μη- γενετική αλληλεπίδραση η οποία συνήθως παρατηρείται μεταξύ ιών είναι η παρεμπόδιση (interference). Αυτή η διαδικασία προέρχεται από την αντίσταση στην υπέρμολυνση από έναν ιό που παρατηρείται σε ήδη μολυσμένα κύτταρα από άλλον ιό. Ανάλογη παρεμπόδιση (δηλαδή, ενάντια στον ίδιο τον ιό) συχνά προέρχεται από την παρουσία των D.I στελεχών τα οποία ανταγωνίζονται για τα απαραίτητα κυτταρικά συστατικά και εμποδίζουν την αντιγραφή.

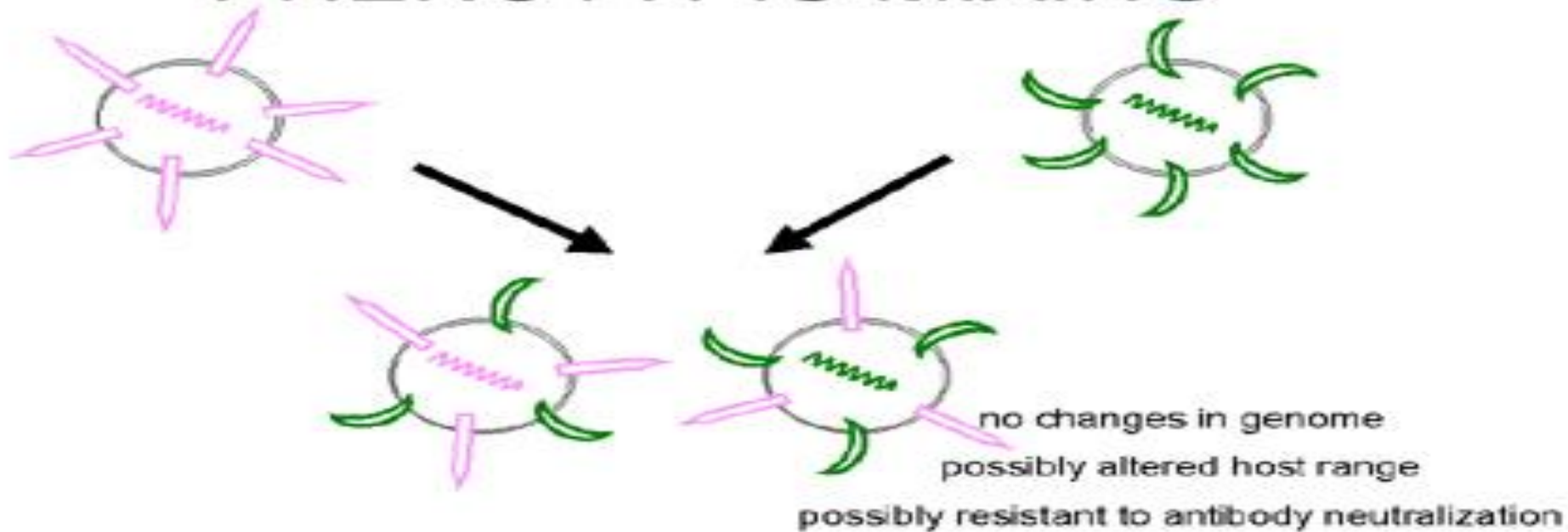
Τα φαινοτυπικά μείγματα (Phenotypic mixing) μπορεί να ποικίλουν από ακραίες περιπτώσεις, όπου το γένωμα ενός ιού είναι εντελώς εγκλωβισμένο μέσα στο καψίδιο ή στο εξωτερικό περίβλημα ενός άλλου ιού (pseudotyping),

### PHENOTYPIC MIXING



μέχρι σε πιο δυσδιάκριτες περιπτώσεις όπου το καψίδιο/ εξωτερικό περίβλημα των απογόνων (viral progeny) περιέχει ένα μείγμα πρωτεϊνών από τον κάθε ιό.

## PHENOTYPIC MIXING



Αυτό το μείγμα δίνει στους απογόνους ιούς τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως τον τροπισμό ο οποίος εξαρτάται από τις ενσωματωμένες στο ιικό σωματίδιο πρωτεΐνες. Αυτή η διαδικασία μπορεί να συμβεί εύκολα στους ιούς με « γυμνά καψίδια» (χωρίς εξωτερικό περίβλημα), τα οποία έχουν στενή φυλογενετική σχέση μεταξύ τους π.χ, διάφορα στελέχη εντεροϊών.

## ‘ΜΕΓΑΛΑ’ DNA ΓΕΝΩΜΑΤΑ

Αυτοί οι ιοί είναι γενετικώς πολύ όμοιοι με τα κύτταρα των ξενιστών τα οποία μολύνουν. Παράδειγμα αποτελούν τα μέλη των οικογενειών Adenoviridae και Herpesviridae.

### ΕΡΠΗΤΟΙΟΙ (Herpesviridae)

Herpesviridae είναι μια μεγάλη οικογένεια που περιέχει περισσότερα από 100 διαφορετικά μέλη. Υπάρχουν οχτώ ανθρώπινοι ερπητοιοί (herpesviruses), όλοι μοιράζονται μια κοινή γενική δομή γενώματος, η οποία διαφέρει σε «λεπτομέρειες» της οργάνωσης του γενώματος και σε επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η οικογένεια διαιρείται σε τρεις υπο-οικογένειες όσον αφορά τα βιολογικά της χαρακτηριστικά.

#### **Alphaherpesvirinae: Latent infections in sensory ganglia; genome size 120–180 kbp**

<i>Simplexvirus</i>	<i>Human herpesvirus 1, 2 (HSV-1, HSV-2)</i>
<i>Varicellovirus</i>	<i>Human herpesvirus 3 (VZV)</i>

#### **Betaherpesvirinae: Restricted host range; genome size 140–235 kbp**

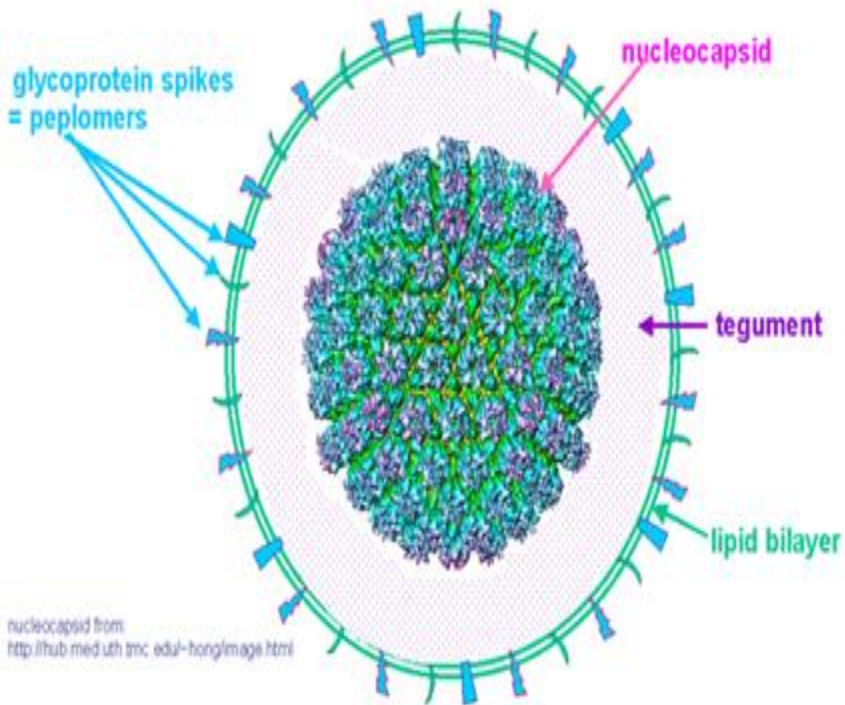
<i>Cytomegalovirus</i>	<i>Human herpesvirus 5 (HCMV)</i>
<i>Muromegalovirus</i>	<i>Mouse cytomegalovirus 1</i>
<i>Roseolovirus</i>	<i>Human herpesvirus 6, 7 (HHV-6, HHV-7)</i>

#### **Gammaherpesvirinae: Infection of lymphoblastoid cells; genome size 105–175 kbp**

<i>Lymphocryptovirus</i>	<i>Human herpesvirus 4 (EBV)</i>
<i>Rhadinovirus</i>	<i>Human herpesvirus 8 (HHV-8)</i>

Οι ερπητοϊοί (herpesviruses) έχουν πολύ μεγάλα γενώματα (μέχρι 235 kbp) γραμμικού, δίκλωνου DNA και αποτελούνται από μεγάλα και σύνθετα ιικά σωματίδια που περιέχουν περισσότερα από 35 ιικά πολυπεπτίδια. Όλα κωδικοποιούν μια ποικιλία ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στην αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση.

## HERPESVIRUSES





Μερικά αλλά όχι όλα τα γενώματα των ερπητοιών αποτελούνται από δυο γενωμικές περιοχές , μια «μοναδική μακριά (UL) και μια μοναδική κοντή (US) περιοχή». Καθεμία περιοχή περιβάλλεται από ανεστραμμένες νουκλεοτιδικές επαναλήψεις στα άκρα της . Οι επαναλήψεις επιτρέπουν δομικές ανακατατάξεις των μοναδικών περιοχών και, επομένως, αυτά τα γενώματα υπάρχουν ως ένα μείγμα των τεσσάρων ισομερών, τα οποία είναι όλα λειτουργικώς ισότιμα . Τα γενώματα των ερπητοιών επίσης περιέχουν πολλαπλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και, ανάλογα με τον αριθμό αυτών, το μέγεθος του γενώματος των ποικίλων απομονώσεων ενός συγκεκριμένου ιού μπορεί να ποικίλει μέχρι και 10 kbp.

## HERPES GROUP possible genome structures

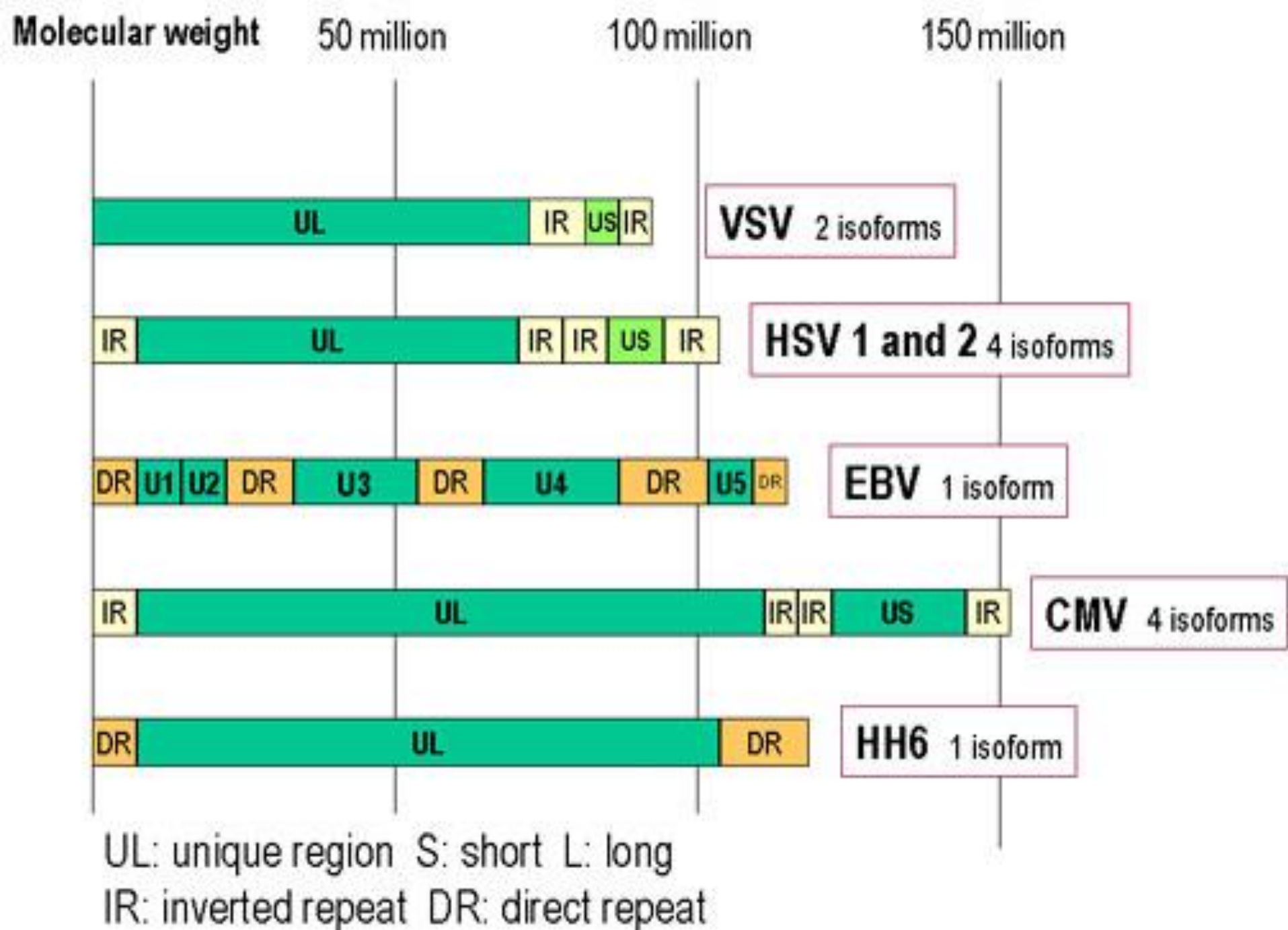
unique long -  $U_L$

unique short -  $U_S$



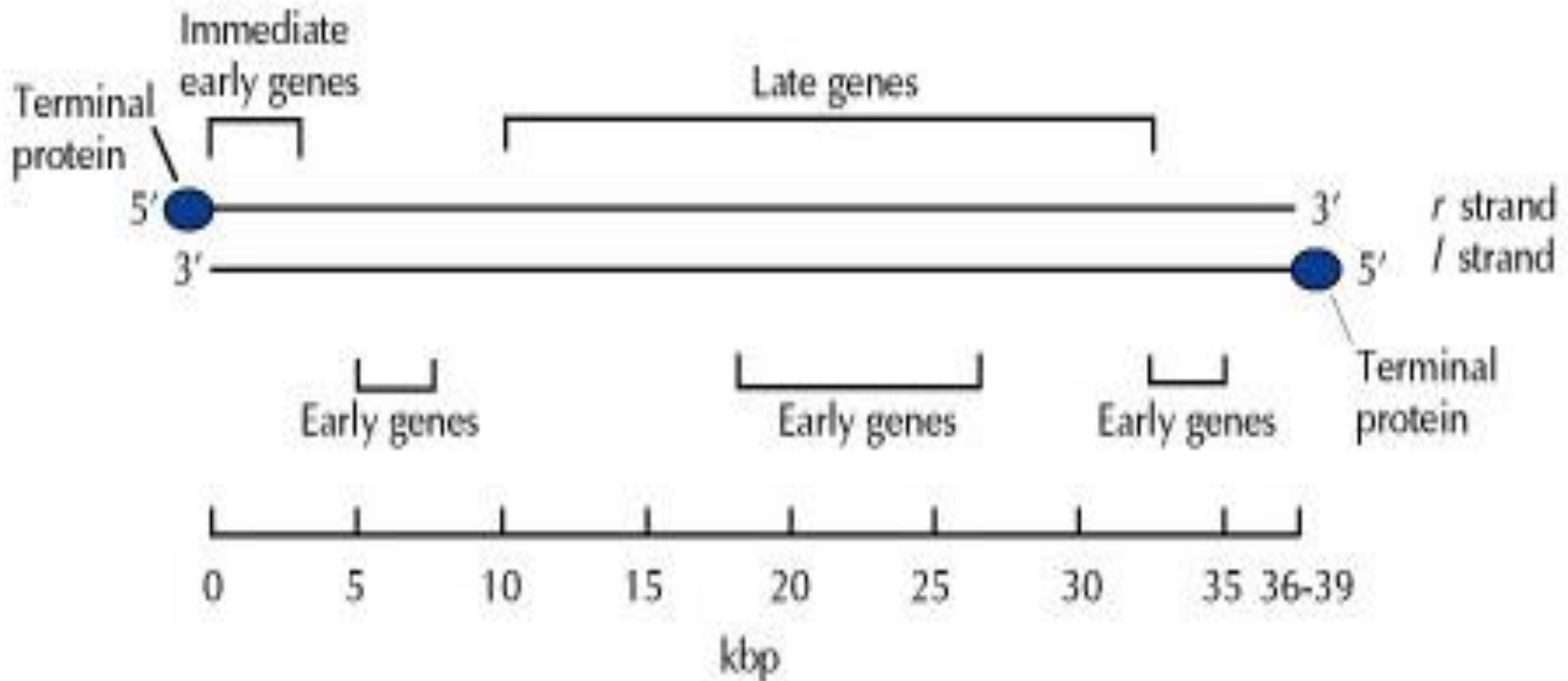
Το πρότυπο μέλος της οικογένειας των Ερπητοιών είναι ο ιός του Απλού έρπητα ( Herpes simplex virus - HSV). Το γένωμα του αποτελείται από περίπου 152 kbp δίκλωνου DNA , του οποίου η νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι πλέον πλήρως γνωστή. **Ο ιός HSV περιέχει περίπου 80 γονίδια, των οποίων τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης αλληλοκαλύπτονται. Ωστόσο, κάθε γονίδιο εκφράζεται από τον δικό του επαγωγέα .**

Τα γενώματα και των υπολοίπων ερπητοιών του ανθρώπου έχουν πλέον αποσαφηνισθεί πλήρως.

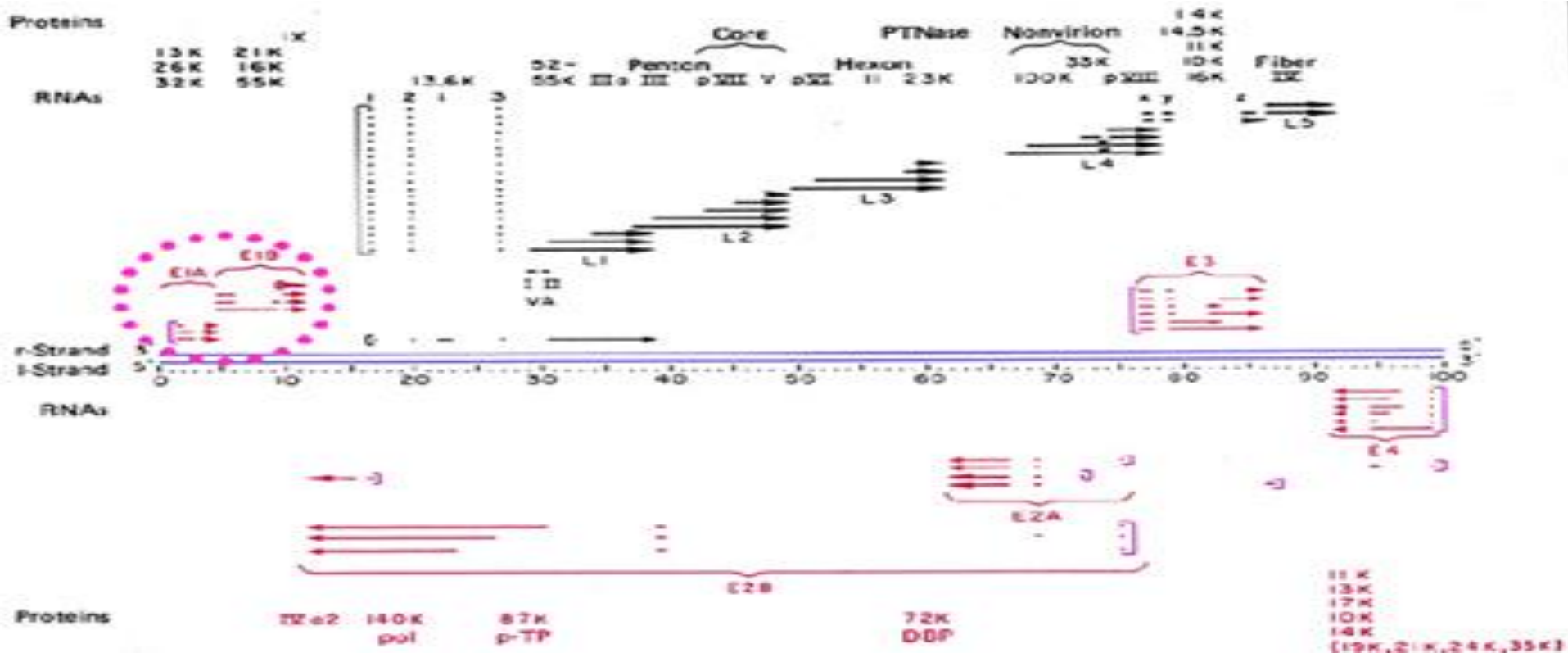


## Adenoviridae

Το γένωμα των αδενοϊών αποτελείται από γραμμικό, δίκλωνο DNA 30-38 kbp, το ακριβές μέγεθος του οποίου διαφέρει μεταξύ των διαφόρων τύπων του γένους. Τα γενώματα των Αδενοϊών περιέχουν 30-40 γονίδια.



Η τελική αλληλουχία του κάθε κλώνου DNA είναι μια ανεστραμμένη επανάληψη από 100-140 bp. Αυτές οι δομές είναι σημαντικές στην DNA αντιγραφή, καθώς η πρωτεΐνη 55 kDa, γνωστή ως τελική πρωτεΐνη, προσδένεται στα 5' τελικά άκρα του κάθε κλώνου. Κατά την διάρκεια της αντιγραφής του γενώματος, αυτή η πρωτεΐνη λειτουργεί ως εκκινητής, αρχίζοντας την σύνθεση των νέων κλώνων DNA. Παρόλο που τα γενώματα των αδενοϊών είναι κατά πολύ μικρότερα από αυτά των ερπητοϊών (herpesviruses), η έκφραση της γενετικής πληροφορίας είναι πολύ πιο σύνθετη. Ομάδες γονιδίων εκφράζονται από έναν περιορισμένο αριθμό κοινών επαγωγέων και μέσω εναλλακτικού ματίσματος τα mRNAs εκφράζουν μια ποικιλία πολυπτεδίων από κάθε επαγωγή.



## ‘ΜΙΚΡΑ’ DNA ΓΕΝΩΜΑΤΑ

### Οι ιοί ζώων, parvoviruses και polyomaviruses.

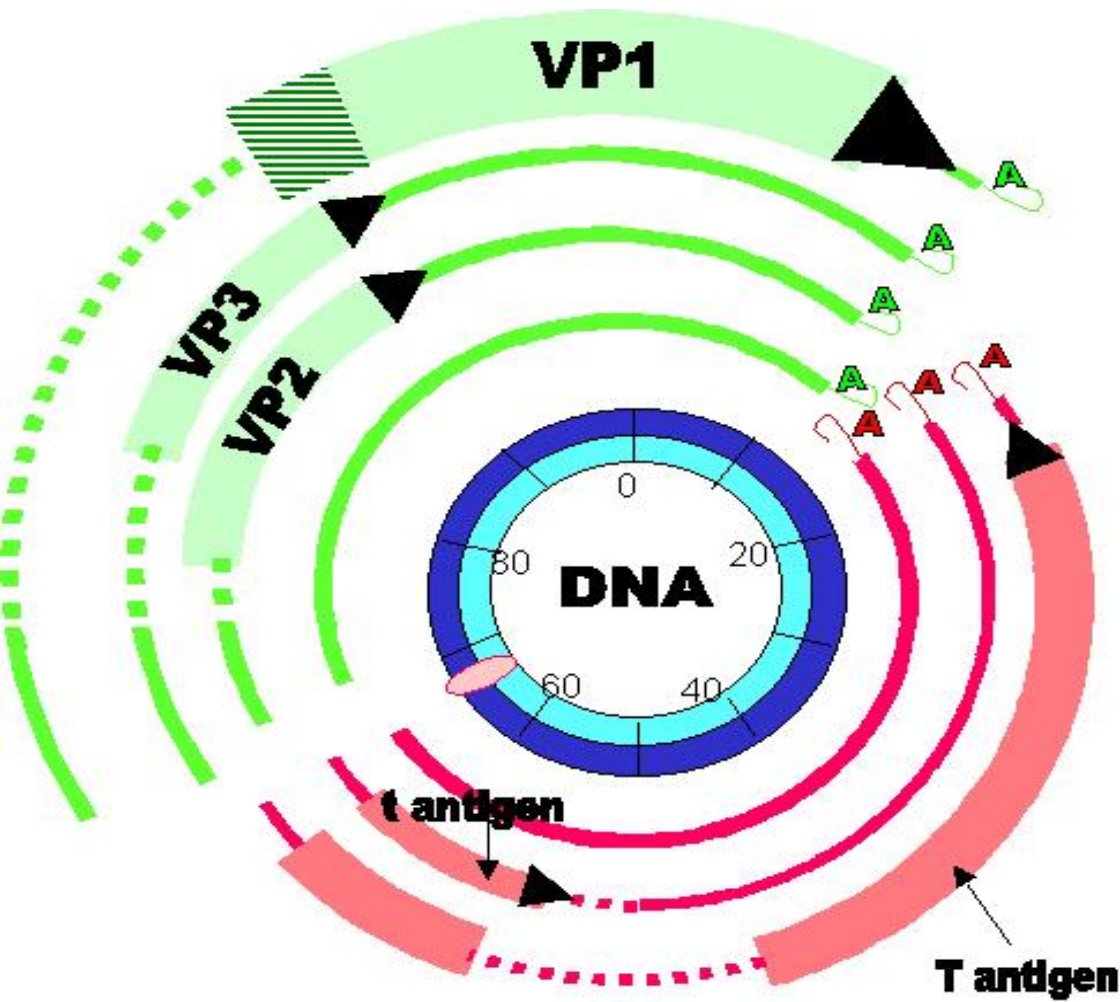
Τα γενώματα των Parvovirus είναι ευθύγραμμα , μη τεμαχισμένα ( non- segmented), μονόκλινα DNA περίπου 5 kb. Οι περισσότεροι κλώνοι εντός του ιικού σωματιδίου είναι είναι (-) πολικότητας (sense), αλλά μερικοί parvoviruses συσσωρεύουν ίσες ποσότητες των (+) και (-) κλώνων (strands), και όλοι εμφανίζονται να συσσωρεύουν τουλάχιστον ένα αριθμό θετικών κλώνων (+). Ακόμη και οι ικανοί για αντιγραφή parvovirus περιέχουν δυο μόνο γονίδια : *rep*, το οποίο κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή , μεταγραφή, και *cap*, το οποίο κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες του νουκλεοκασιδίου. Ωστόσο, η έκφραση αυτών των γονιδίων είναι πιο σύνθετη, θυμίζοντας σε πολλά σημεία την έκφραση των Αδενοϊών .

Τα τέλη των γενωμάτων έχουν παλινδρομικές αλληλουχίες περίπου 115 nt, που σχηματίζουν δομή « φουρκέτα -‘hairpins’» . Αυτές οι δομές είναι απαραίτητες για την έναρξη της αντιγραφής των γενωμάτων, αποδεικνύοντας και πάλι την σημασία των αλληλουχιών στα άκρα του γενώματος.



Το γένωμα των polyoma ιών αποτελείται από δίκλωνο, κυκλικό DNA μόριο περίπου 5 kbp. Η αρχιτεκτονική του γενώματος των Polyoma ιών έχει μελετηθεί λεπτομερώς σε μοριακό επίπεδο. Εντός του ιικού σωματιδίου, το DNA του ιού παρουσιάζεται περιελιγμένο από κυτταρικές ιστόνες τις H2A, H2B, H3 και H4.

Η γενωμική οργάνωση αυτών των ιών έχει εξελιχθεί για να συγκεντρώνει την μέγιστη πληροφορία (έξι γονίδια) στο μικρότερο δυνατόν χώρο (5 kbp) μέσω της χρησιμοποίησης και των δύο κλώνων με αλληλο-επικαλυπτόμενα γονίδια.



Η VP1 κωδικοποιείται από ένα ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), αλλά τα γονίδια VP2 και VP3 αλληλοκαλύπτονται έτσι ώστε το VP3 περιέχεται μέσα στο VP2. Η αρχή της αντιγραφής περιβάλλεται από μη κωδικοποιούσες περιοχές οι οποίες ελέγχουν την μεταγραφή. Οι polyoma ιοί επίσης κωδικοποιούν τα 'T-αντιγόνα', τα οποία είναι ογκοπρωτεΐνες που ανιχνεύονται με τον ορό οροθετικών polyoma ζώων που φέρουν όγκους. Αυτές οι πρωτεΐνες προσδένονται στην αλληλουχία της αρχής της αντιγραφής και εμφανίζουν σύνθετες δραστηριότητες ρύθμισης της αντιγραφής και της μεταγραφής των γονιδίων του ιού.

## HPV

Οι ιοί των θηλωμάτων (papillomaviruses) είναι μικροί DNA ιοί που προκαλούν όγκους των επιθηλίων. Υπάρχουν ~130 ιοί που προσβάλλουν τον άνθρωπο (HPV, Human papillomavirus) αν και, οι περισσότεροι δημιουργούν καλοήθεις όγκους, όπως τα κονδυλώματα, ορισμένοι έχουν συσχετιστεί με κακοήθεις νεοπλασίες και συγκεκριμένα με καρκίνους του τραχήλου της μήτρας. Δύο ιικά προϊόντα που έχουν βρεθεί σε καρκίνους του τραχήλου (οι πρωτεΐνες E6 και E7) είναι ικανά να αθανοτοποιήσουν τα κύτταρα-στόχους.

Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί στον άνθρωπο περισσότεροι από 130 υπότυποι ενώ περί τους είκοσι προσβάλλουν το ουρογεννητικό του σύστημα. Μεταξύ αυτών ορισμένοι, όπως οι τύποι **HPV High risk : 16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68,73,82,83** που συναντώνται σε δυσπλασίες και επιδερμικής προέλευσης καρκίνους χαρακτηρίζονται ως «υψηλής επικινδυνότητας», άλλοι όπως **HPV Low risk: 6,11,40,42,53,54,57,66,84** που βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε καλοήθεις βλάβες, οξυτενή κονδυλώματα (condyloma acuminata) και σχεδόν ποτέ σε καρκινώματα, χαρακτηρίζονται ως «χαμηλής επικινδυνότητας» και τέλος μια τρίτη κατηγορία «ενδιάμεσης επικινδυνότητας» περιλαμβάνει ιούς, όπως **οι τύποι -35, -39, που μπορεί να ανευρίσκονται σε δυσπλασίες.**



**Το DNA των ιών HPV είναι δίκλωνο, κυκλικό και έχει μέγεθος περί τα 7900 ζεύγη.**

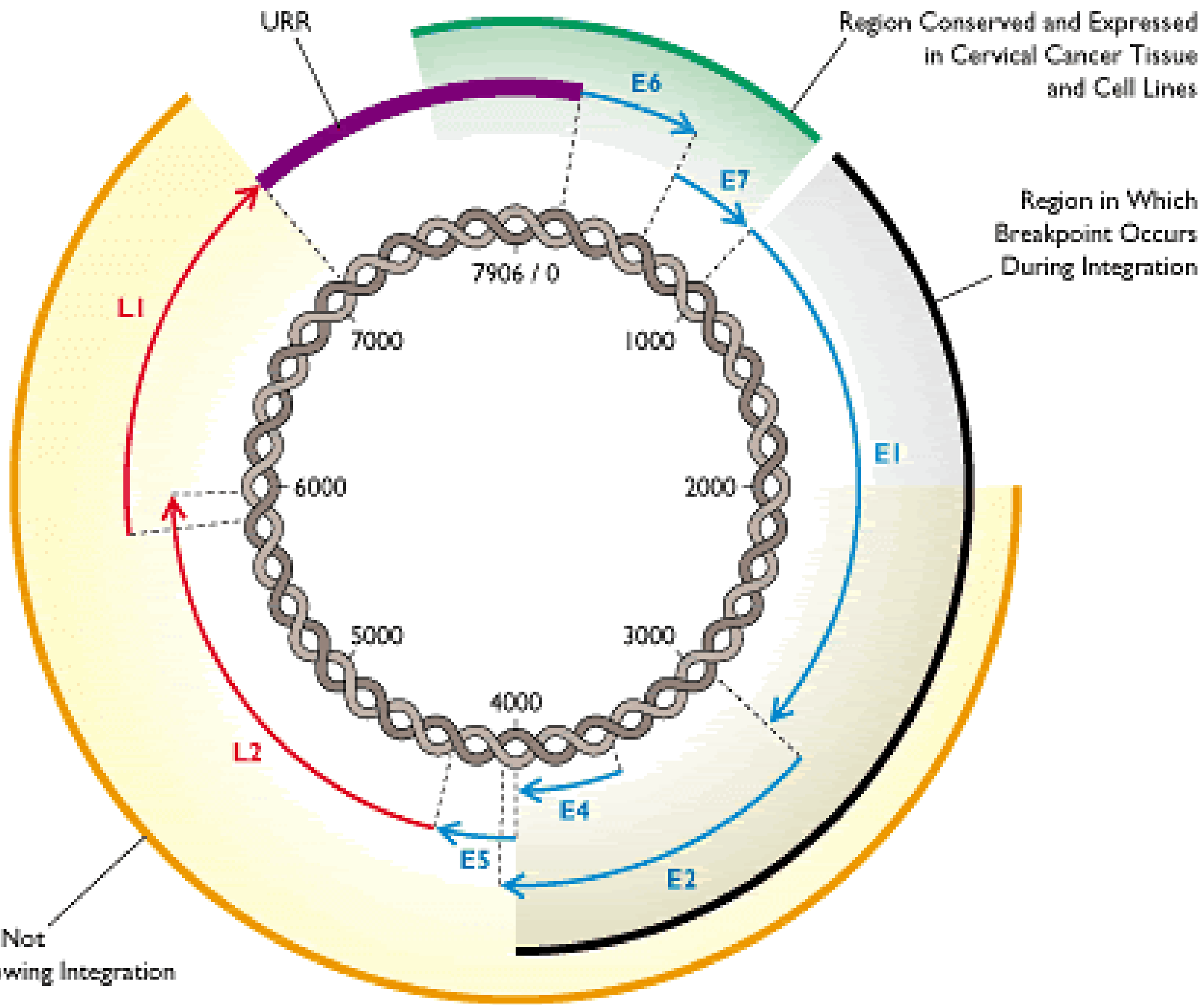
1. Το DNA των ιών HPV υψηλής επικινδυνότητας ανευρίσκεται στο 90% των περιπτώσεων καρκίνου του τραχήλου της μήτρας.

2. Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος, το ιϊκό DNA των ιών υψηλής επικινδυνότητας (HPV-16 και -18) βρίσκεται ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα κατά κανόνα τη διακοπή της αλληλουχίας του πλαισίου ανάγνωσης ORF E2 στους ιούς αυτούς.

3. Το ιϊκό γένωμα περιλαμβάνει περιοχές που ονομάζονται «ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης» ή ORF (Open Reading Frames) και οι οποίες διακρίνονται σε πρώιμες E (Early) και καθυστερημένες L (Late).

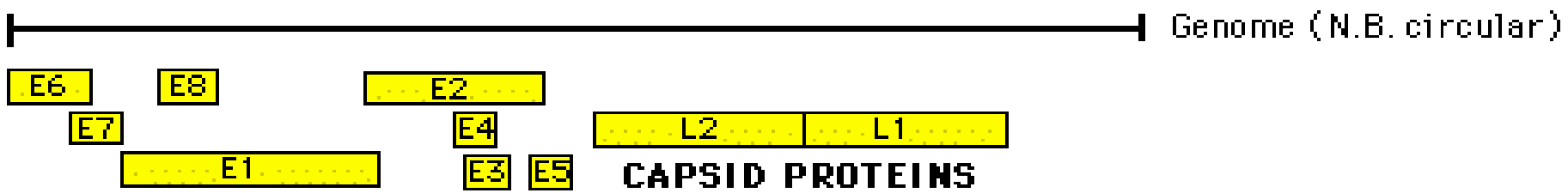
Διακρίνουμε τις E1-E2, E4-E5-E6-E7 που περιέχουν την πληροφορία για το διπλασιασμό του ιού και ταυτόχρονα είναι υπεύθυνες και για το καρκινικό μετασχηματισμό του κυττάρου-ξενιστή.

Οι περιοχές L1 και L2 κωδικοποιούν για τα δομικά πολυπεπτίδια του καψιδίου του ιού.

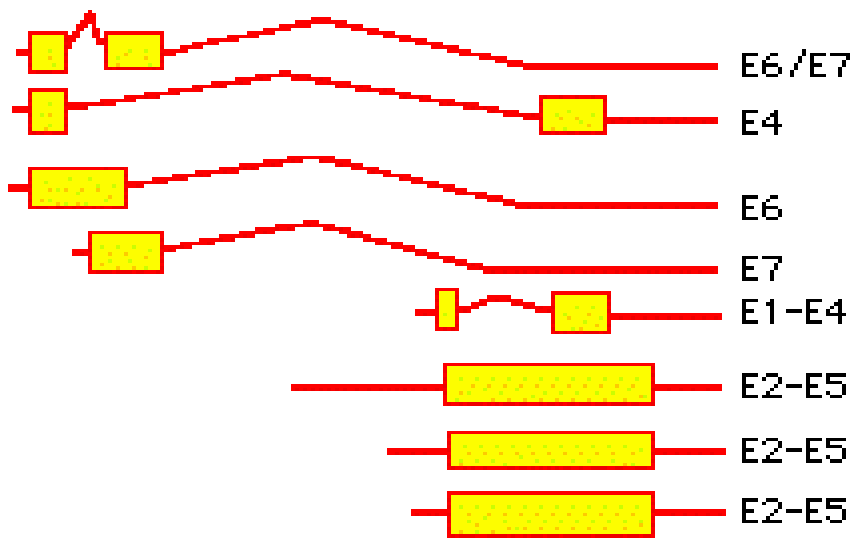


Region Lost or Not Expressed Following Integration

Στις περισσότερες περιπτώσεις καρκίνου του ουρογεννητικού συστήματος, έχουμε έκφραση ιικών γονιδίων που χαρακτηρίζουν τους ιούς υψηλής επικινδυνότητας. Σ' αυτές τις περιπτώσεις ανιχνεύονται μετάγραφα των περιοχών ORF-E6 και ORF-E7.



**mRNAs:**



## **E2:**

Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες και στρατολόγηση της E1 στην αφετηρία έναρξης αντιγραφής  $\Rightarrow$  δημιουργία συμπλόκου  $\Rightarrow$  στρατολόγηση DNA πολυμεράσης και άλλων πρωτεϊνών με σκοπό την έναρξη της αντιγραφής

Ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος από τον πρώιμο επαγωγέα..

## **E1:**

Δραστικότητα 3'-5' ελικάσης  
Δραστικότητα ATPάσης

## **E6 και E7:**

Όγκοπρωτεΐνες στους HPV υψηλού κινδύνου αλλά όχι στους HPV χαμηλού κινδύνου.

## **E4 και E5:**

Ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών

## **L1 και L2**

Εκφράζονται κατά την όψιμη φάση και σχηματίζουν τα καψίδια.

**Σε μολύνσεις χαμηλού βαθμού το γένωμα των HPV υψηλού κινδύνου είναι σαν επίσωμα ενώ κατά την πρόοδο σε καρκίνωμα ενσωματώνεται στο γένωμα του κυττάρου (συνήθως στο E2 ORF) με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των E6 και E7 γονιδίων.**

## ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ RNA ΙΟΙ

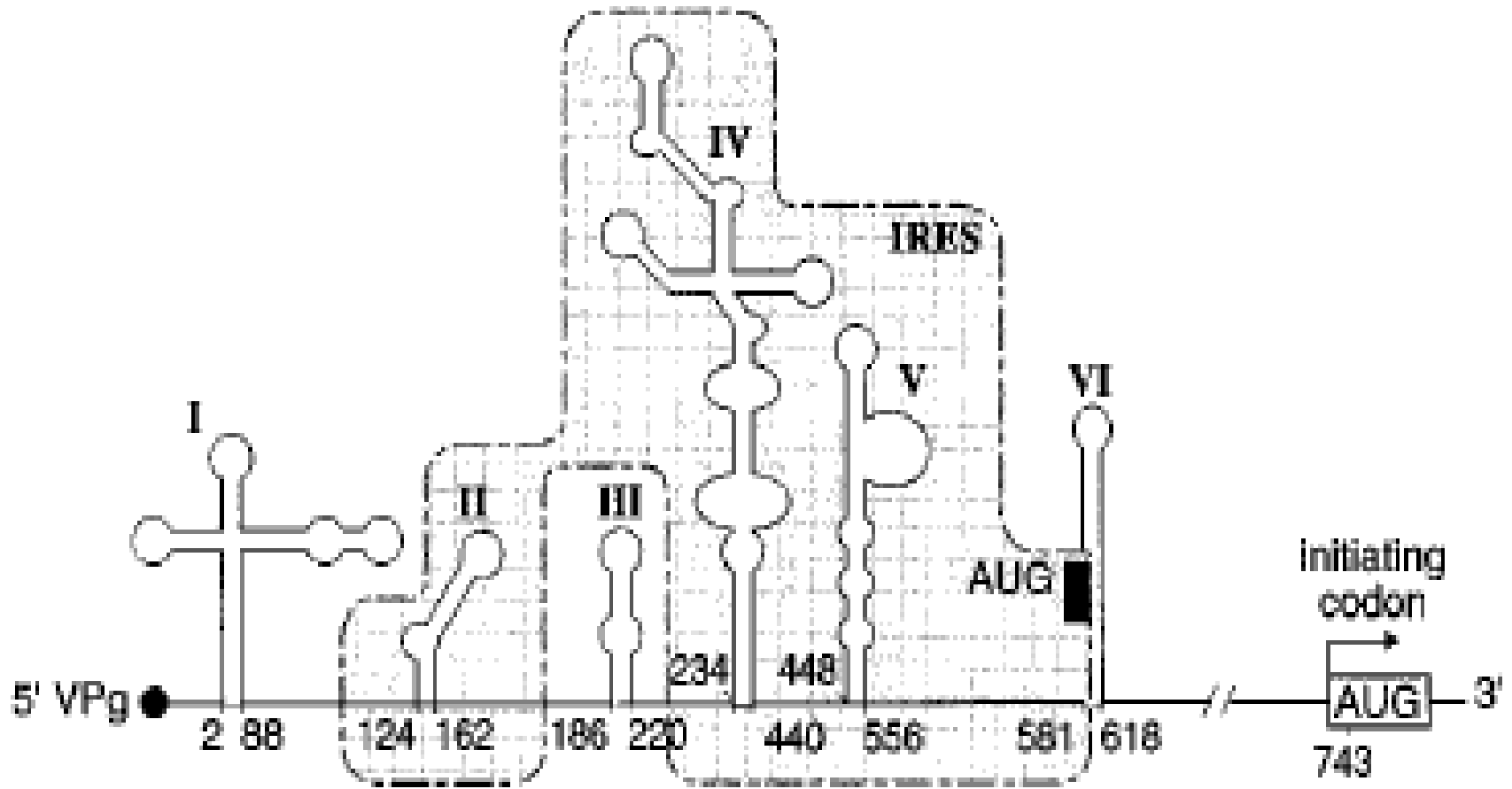
Τα RNA γενώματα έχουν υψηλότερους ρυθμούς μεταλλάξεων από ότι τα DNA διότι αντιγράφονται με μικρότερη πιστότητα. Απομονωμένο θετικής πολικότητας (+) RNA είναι άμεσα μολυσματικό όταν μολυνθούν ευπαθή κύτταρα του ξενιστή αν και είναι περίπου ένα εκατομμύριο φορές λιγότερο μολυσματικό από ένα πλήρες ιικό σωματίδιο.

## PICORNAVIRUSES

Το γένωμα των Picorna ιών αποτελείται από ένα μονόκλωνο, (+) πολικότητας RNA ,7.2 kb στους περισσότερους ιούς ( εντεροιοί , ρινοιοί ), 8.5 kb στον ιό foot-and- mouth disease viruses (FMDV).

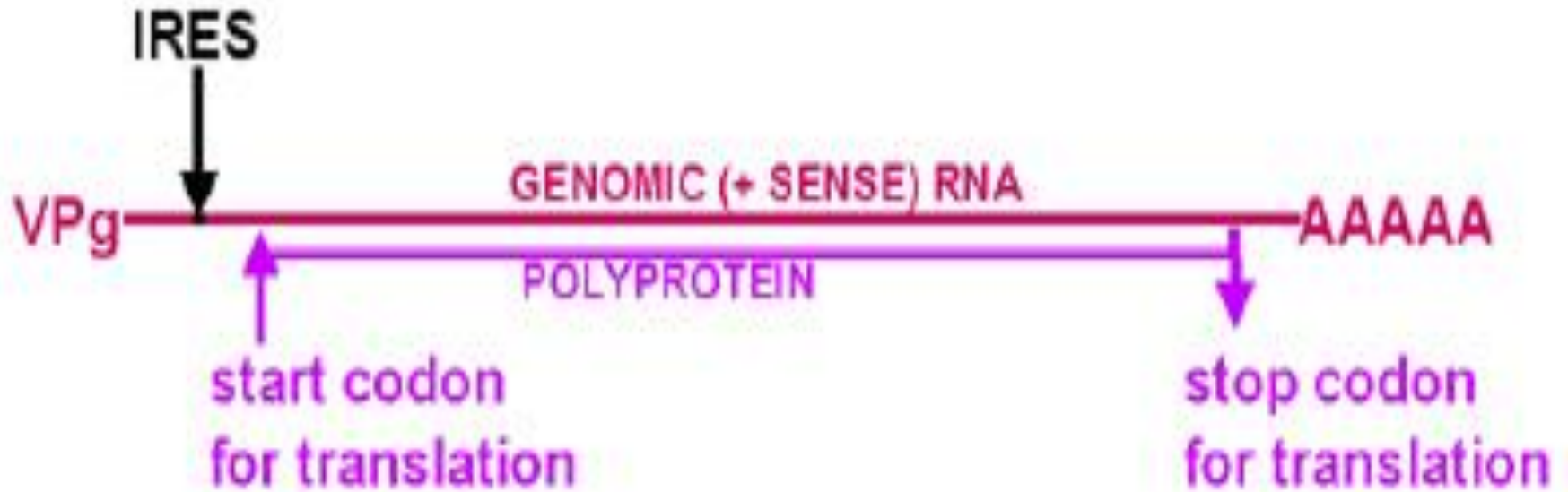
**Τα κοινά χαρακτηριστικά για όλους τους picorna ιούς είναι :**

- μια μακριά (600-1200 nt) μη μεταφρασμένη ή μη κωδικοποιούσα περιοχή (UTR ή NCR) στο 5' τελικό άκρο που είναι σημαντική για την μετάφραση και την ενσωμάτωση του RNA στο ιικό σωματίδιο
- και μια μικρότερη στο 3' μη μεταφρασμένη περιοχή (50-100 nt) απαραίτητη για την σύνθεση του κλώνου αρνητικής πολικότητας (-) κατά την διάρκεια της αντιγραφής.
- Το 5' UTR περιέχει ένα πλέγμα δευτεροταγών δομών γνωστές με την ονομασία IRES (Internal ribosome entry site - εσωτερική θέση πρόσδεσης του ριβοσώματος). Το υπόλοιπο του γενώματος κωδικοποιεί μια μόνο πολυπρωτεΐνη περίπου 2100 - 2400 αμινοξέων



Διάγραμμα της δευτεροταγούς δομής της 5'-NCR περιοχής του γενώματος του στελέχους PV-1/Mahoney. Οι έξι δομές φουρκετών αριθμούνται από I έως VI. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES

- Και τα δυο άκρα του γενώματος είναι τροποποιημένα, το 5' από μια μικρή, βασική πρωτεΐνη VPg (23 αμινοξέα) και το 3' είναι πολυαδενυλιωμένο .



## **TOGA IOI**

Το γένωμα τους ( Togavirus) αποτελείται από θετικής πολικότητας (+) , μη τεμαχισμένο (non-segment) RNA περίπου 11.7 kb.

Έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Μοιάζει με κυτταρικό mRNA διότι έχει μια 5' μεθυλιωμένη καλύπτρα (methylated cap) και στο 3' άκρο μια poly(A) ουρά .

Η έκφραση επιτυγχάνεται με δυο γύρους μετάφρασης, παράγοντας πρώτα μη δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από το 5' του γενώματος και κατόπιν από δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούμενες από το 3' του γενώματος .

## **FLAVI IOI**

Το γένωμα των Flavi ιών αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας, 10.5 kb με τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Στο 5' το RNA είναι μεθυλιωμένο, αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις το 3' δεν φέρει την poly A ουρά.

Οι δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το 5' του γενώματος και οι μη- δομικές από το 3'.

Η έκφραση του γενώματος ομοιάζει με εκείνη των ricorna ιών δηλ. μέσω μιας πολυπρωτεΐνης.



## CORONA IOI

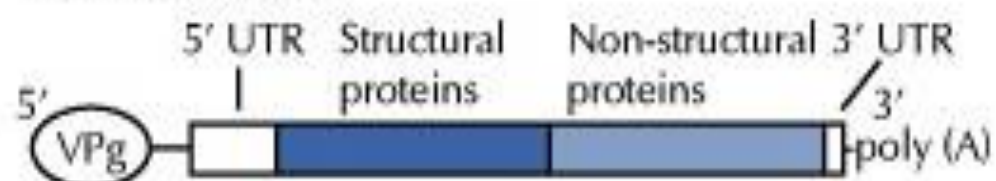
Το γένωμα των corona ιών αποτελείται από μονόκλωνο RNA θετικής πολικότητας , μη τεμαχισμένο, περίπου 30 kb το οποίο είναι και το μεγαλύτερο των RNA ιών. Παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

Το 5' του vRNA είναι μεθυλιωμένο, το 3' φέρει poly A ουρά και λειτουργεί απευθείας ως mRNA.

Οι 20 kb του 5' τμήματος του vRNA μεταφράζονται πρώτα για την παραγωγή μιας ιικής πολυμεράσης, η οποία μετατρέπει το γένωμα σε αρνητικής πολικότητας. Το αρνητικής πολικότητας γένωμα χρησιμοποιείται ως μήτρα για την παραγωγή mRNA, μιας σειράς mRNAs τα οποία όλα έχουν ένα πανομοιότυπο 5' άκρο το οποίο αποτελείται από μια αλληλουχία 72 νουκλεοτιδίων η οποία δεν μεταφράζεται και καταλήγουν σε μια 3' poly A ουρά.

Κάθε mRNA είναι μονοκιστρονικό.

### Picornaviruses:



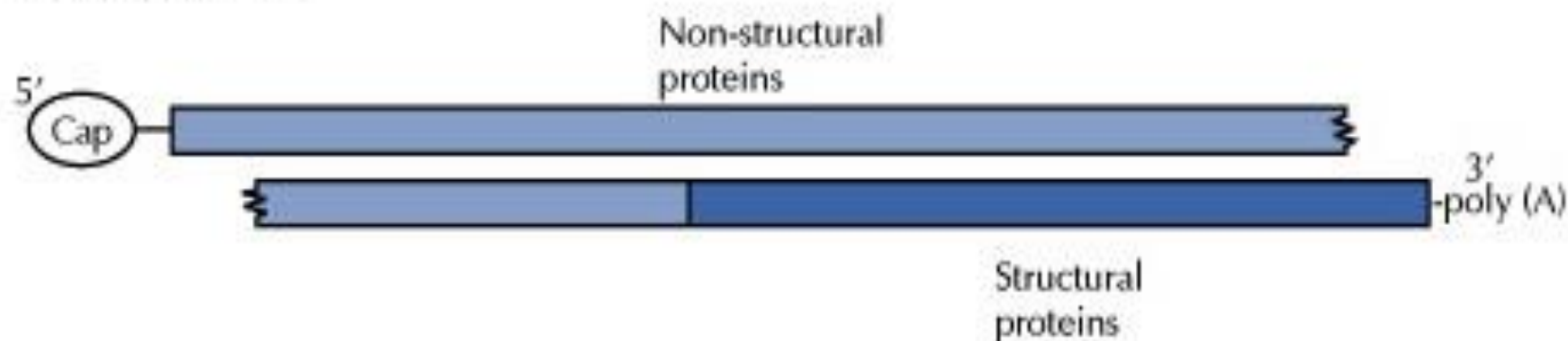
### Togaviruses:



### Flaviviruses:



### Coronaviruses:



## **ΑΡΝΗΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ RNA ΙΟΙ**

Οι ιοί αυτοί έχουν σχετικά ένα μεγαλύτερο γένωμα, το οποίο συνήθως είναι τεμαχισμένο και φέρουν στο ιικό τους σωματίδιο μια RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση. Ορισμένοι ιοί αυτής της κατηγορίας δεν είναι αυστηρά αρνητικής πολικότητας, αλλά διπλής πολικότητας (ambisense), μιας που ένα μέρος του γενώματος είναι αρνητικής πολικότητας και το άλλο είναι θετικής.

### **BUNYA ΙΟΙ**

Οι ιοί αυτοί αποτελούνται από μονόκλωνο RNA αρνητικής πολικότητας, τεμαχισμένο.

Το γένωμα αποτελείται από τρία μόρια: L (8.5 kb), M (5.7 kb) και S(0.9kb).

Τα μόρια αυτά είναι ευθύγραμμα, αν και μέσα στο ιικό σωματίδιο παρουσιάζονται ως κυκλικά λόγω σύζευξης βάσεων.

Το 5' τμήμα του νRNA δεν είναι μεθυλιωμένο και το 3' δεν φέρει poly A ουρά.

Στους ιούς με διπλή πολικότητα (ambisense) το 5' του κάθε τμήματος είναι θετικής πολικότητας και το 3' αρνητικής.

Στους Tospo ιούς μόνο το τμήμα M παρουσιάζει διπλή πολικότητα.

### **ARENA ΙΟΙ**

Το γένωμα τους είναι μονόκλωνο ευθύγραμμο RNA και αποτελείται από δυο τμήματα L (5.7 kb) και S (2.8) kb, τα οποία έχουν οργάνωση διπλής πολικότητας ως ανωτέρω.

### **PARAMYXO ΙΟΙ**

Το RNA τους είναι αρνητικής πολικότητας μη τεμαχισμένο μήκους 15-16 kb. Το γένωμα τους είναι οργανωμένο σε 6 γονίδια σε μια ευθύγραμμη αλληλουχία με την ακόλουθη σειρά (3'-NP-P/C/V-M-F-HN-L-5'). Κάθε γονίδιο φέρει μια poly A αλληλουχία στο τέλος του, μια αλληλουχία (GAA) μεταξύ των 6 γονιδίων ( intergenic region) και μια αλληλουχία «σήμα» για την έναρξη της μετάφρασης στην αρχή κάθε γονιδίου.

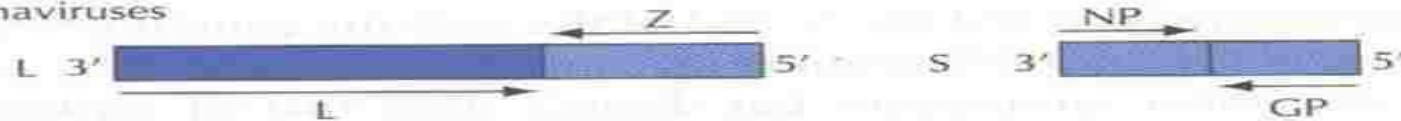
# RHABDO IOI

Το γένωμα τους είναι RNA αρνητικής πολικότητας μη τεμαχισμένο μήκους 11 kb. Το 5' του γενώματος φέρει μια αλληλουχία 60 νουκλεοτιδίων μη μεταφραζόμενη (UTR). Φέρει 5 γονίδια όπου στο τέλος του κάθε γονιδίου υπάρχει μια poly A αλληλουχία και η αλληλουχία GAA μεταξύ των 5 γονιδίων.

## Bunyaviruses



## Arenaviruses



## Orthomyxoviruses



## Paramyxoviruses



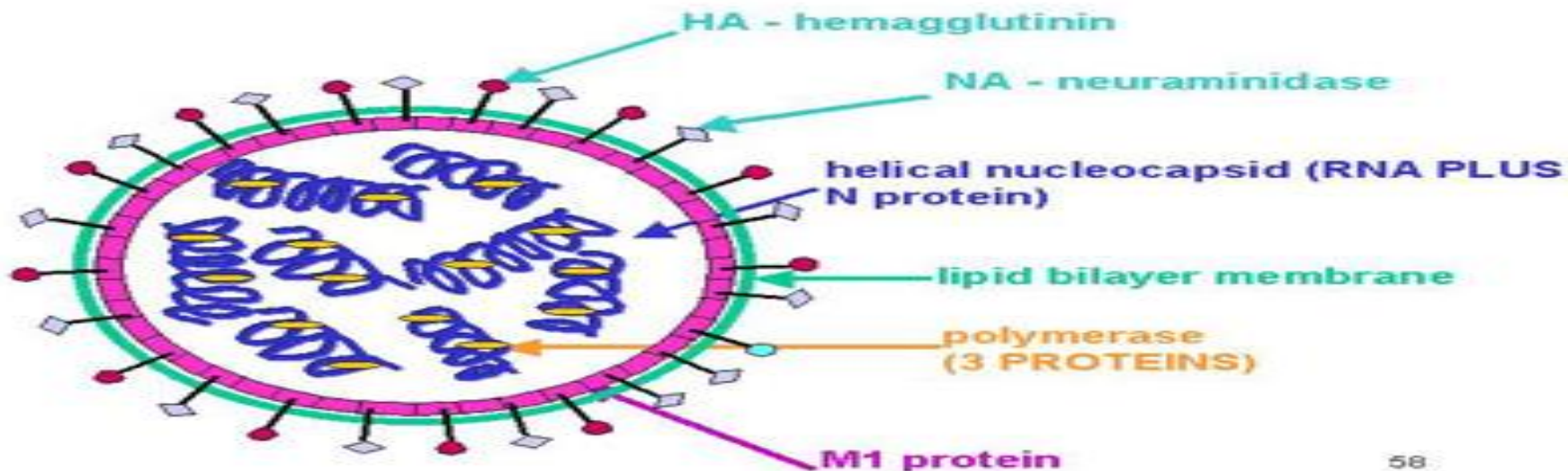
## Rhabdoviruses



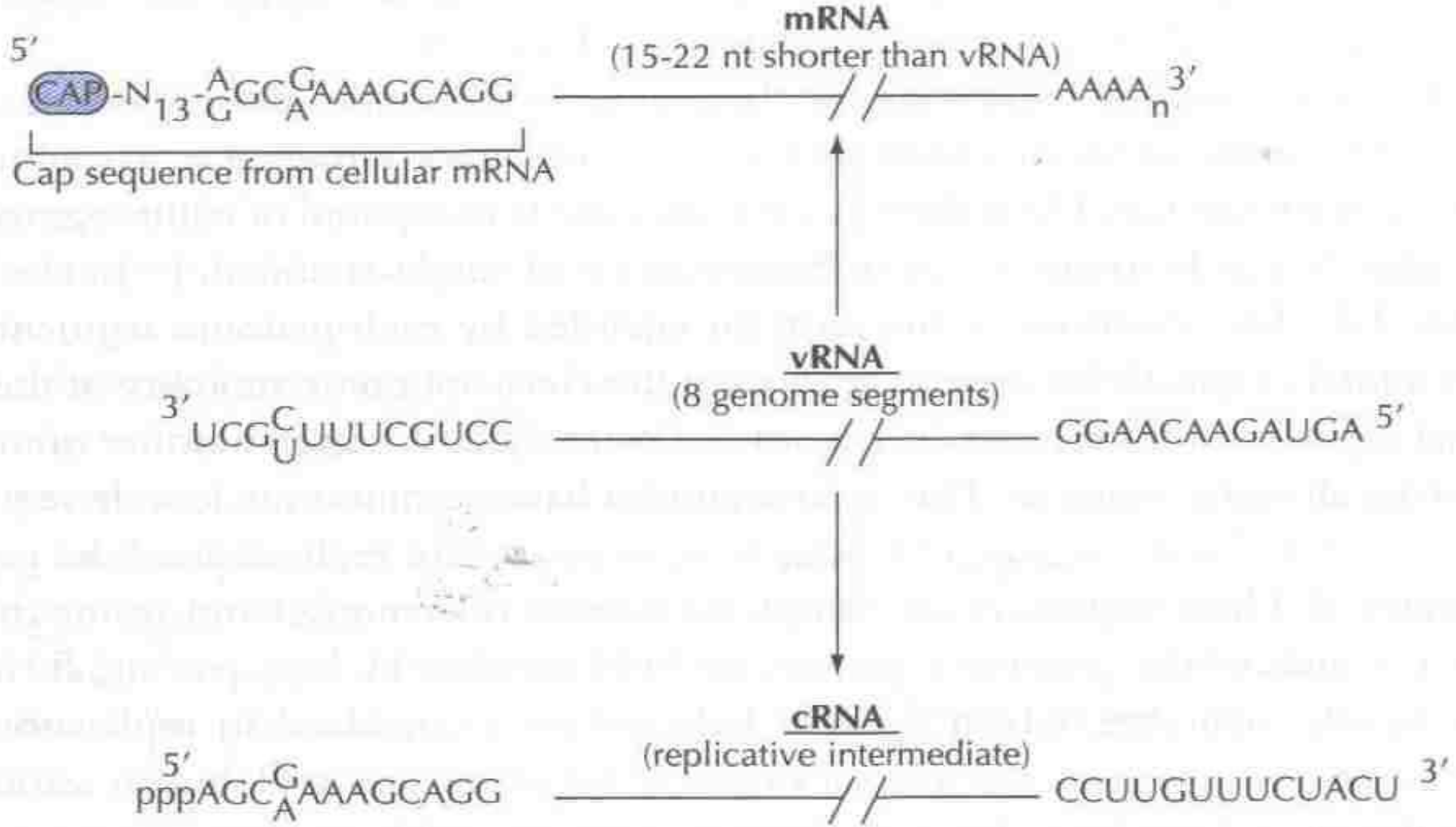
## ORTHOMYXO ΙΟΙ

Οι Orthomyxο ιοί αποτελούνται από 8 RNA τμήματα στον ιό της γρίπης Α και Β και 7 τμήματα στον ιό της γρίπης C. Το RNA είναι μονόκλωνο αρνητικής πολικότητας. Τα 8 τμήματα έχουν κοινές αλληλουχίες στο 5' και 3' του κάθε τμήματος. Τα άκρα του κάθε τμήματος δημιουργούν συζεύξεις βάσεων με το επόμενο τμήμα. Το πακετάρισμα του RNA γίνεται με την βοήθεια της νουκλεοπρωτεΐνης η οποία κωδικοποιείται από το τμήμα 5' του γενώματος. Κάθε τμήμα συμπεριφέρεται ως μια γενετικώς ανεξάρτητη μονάδα. Οι συζεύξεις βάσεων οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ κάθε τμήματος συντελούν ώστε το πακετάρισμα του γενώματος να γίνεται με χαμηλό ποσοστό λάθους. Το γένωμα του ιού της Γρίπης αποτελείται από 12000-15000 νουκλεοτίδια (nt) τα οποία κατανέμονται σε 8 τεμάχια. μήκους από 800-2500 νουκλεοτιδίων. Το γένωμα παρουσιάζει τελικές επαναλήψεις στα άκρα του κάθε τεμαχίου 12-13 νουκλεοτιδίων στο 5'- άκρο και 9-11 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο.

## ORTHOMYXOVIRUSES



Ο τεμαχισμός του γενώματος είναι απαραίτητος μιας που το μονόκλωνο RNA είναι εξαιρετικά ευαίσθητο σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες με αποτέλεσμα το vRNA να μην μπορεί να αντιγραφεί, να μεταγραφεί και να μεταφραστεί σωστά. Ο τεμαχισμός του vRNA αποφεύγει τα ανωτέρω προβλήματα μιας που κάθε τεμάχιο λειτουργεί ως ανεξάρτητο γονίδιο αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο το δυναμικό κωδικοποίησης του γενώματος.



Segment	Size (nt)	Polypeptide(s)	Function (Location)
1	2341	PB <sub>2</sub>	Transcriptase: cap binding
2	2341	PB <sub>1</sub>	Transcriptase: elongation
3	2233	PA	Transcriptase: (?)
4	1778	HA	Haemagglutinin
5	1565	NP	Nucleoprotein: RNA binding; part of transcriptase complex
6	1413	NA	Neuraminidase
7	1027	M <sub>1</sub>	Matrix protein: major component of virion
		M <sub>2</sub>	Integral membrane protein – ion channel
8	890	NS <sub>1</sub>	Non-structural (nucleus) function unknown
		NS <sub>2</sub>	Non-structural (nucleus + cytoplasm) function unknown

Λόγω της χαμηλής αντιγραφικής πιστότητας της RNA- εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης συμβαίνει τουλάχιστον μια λάθος ενσωμάτωση νουκλεοτιδίου κάθε 10.000 βάσεις δηλ. σε κάθε κύκλο αντιγραφής θα δημιουργείται τουλάχιστον μια μετάλλαξη / ιϊκό στέλεχος. Λαμβάνοντας υπόψιν την δομή του vRNA γενώματος μια μετάλλαξη σε οποιοδήποτε τεμάχιο του γενώματος όταν δυο στελέχη μολύνουν συγχρόνως το ίδιο κύτταρο μέσω της πιθανής ανακατανομής των τεμαχίων (*reassortment*) ίσως νέες μεταλλάξεις να εισαχθούν στα ιϊκά σωματίδια τα οποία ενδεχομένως να παρουσιάσουν νέο τροπισμό ή/και νέες αντιγονικές ιδιότητες ( αντιγονική μετατόπιση) και να μην εξουδετερώνονται πλέον τα ιϊκά σωματίδια από τα προυπάρχοντα αντισώματα σε ένα δεδομένο πληθυσμό.

Η ανακατανομή (*reassortment*) αποτελεί κατά συνέπεια ένα ισχυρό μέσο εξέλιξης και γενετικής ποικιλομορφίας, γεγονός το οποίο αν και σχετικά σπάνιο συμβαίνει στους τεμαχισμένους RNA ιούς.



## ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ

Το 1970 οι Howard Temin και David Baltimore δημοσίευσαν συγχρόνως την παρατήρηση ότι οι ρετροϊοί στο σωματίδιό τους φέρουν το ενζυμικό σύμπλοκο της RNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης – την αντίστροφη μεταγραφάση.

Τα ρετροτρανσποζόνια με μεγάλες ομοιότητες με το γένωμα των ρετροϊών είναι αλληλουχίες οι οποίες συναντιόνται στο γένωμα των θηλαστικών και στα άκρα τους εντοπίζονται μακρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (long terminal repeats, LTRs).

Οι αλληλουχίες αυτές εμπλέκονται σε :

Φαινομενικά «αυθόρμητες» μεταλλάξεις

Σε γενωμικές επαναδιατάξεις του κυττάρου ξενιστή όπως ελλείμματα (deletions) , αντιστροφές ( inversions ), διπλασιασμούς (duplications) και μετατοπίσεις (translocations).

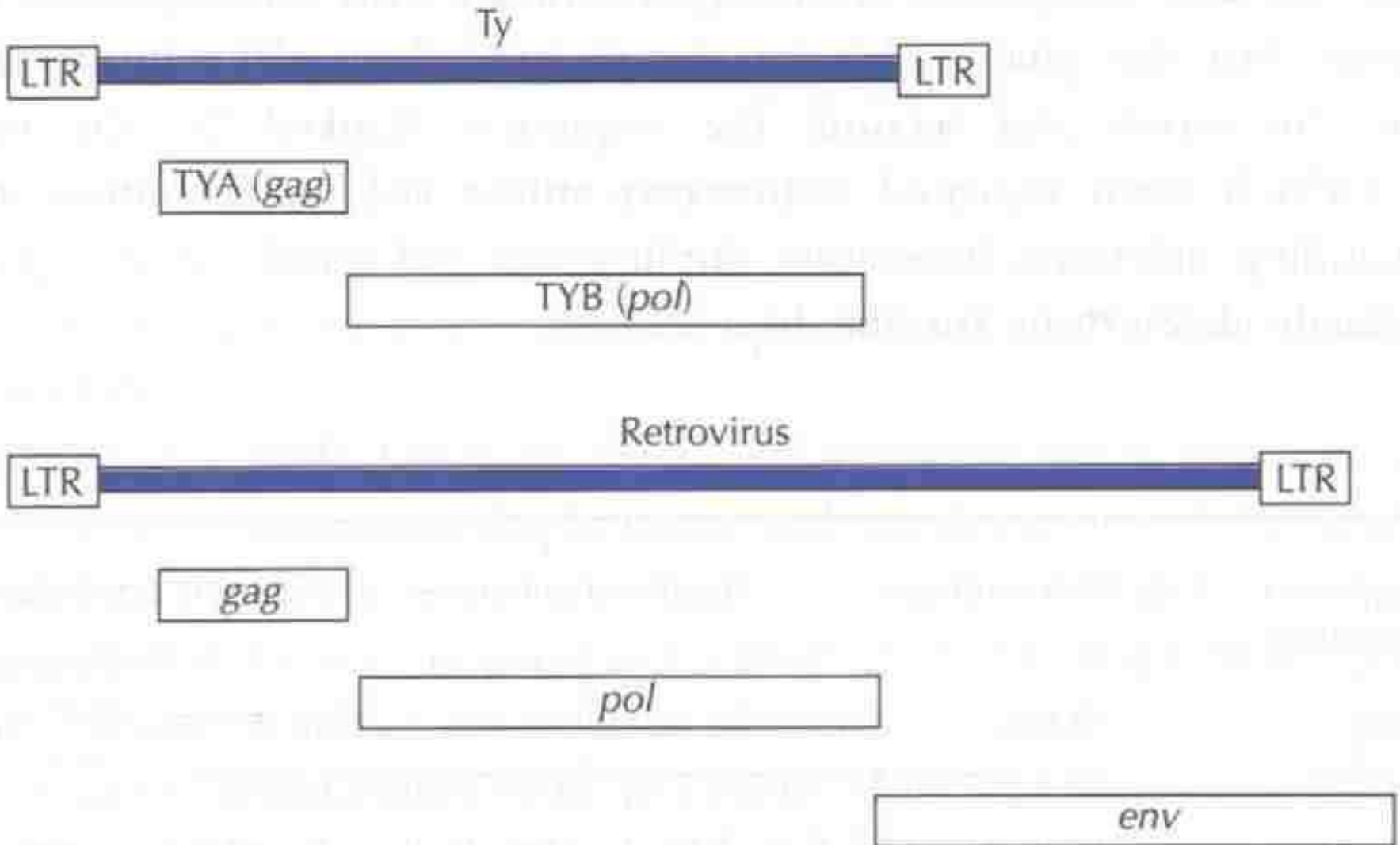
Ο μηχανισμός ένθεσης δημιουργεί ένα μικρό διπλασιασμό (3-13 ζεύγη βάσεων) στην κάθε πλευρά της ένθεσης.

Τα άκρα των μεταθετών στοιχείων αποτελούνται από αντίστροφες επαναλήψεις 2-50 ζεύγη βάσεων.

Τα μεταθετά στοιχεία ελέγχουν την μετάθεσή τους κωδικοποιώντας για πρωτείνες οι οποίες λειτουργούν είτε **cis** (επηρεάζοντας την ενεργότητα γειτονικών αλληλουχιών) είτε **trans** (επηρεάζοντας την ενεργότητα απομακρυσμένων στο γένωμα αλληλουχιών).

## ΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ Ty

Τα περισσότερα στελέχη *Saccharomyces cerevisiae* περιέχουν 30-35 αντίγραφα του στοιχείου Ty του οποίου το μήκος είναι 6 kb και στο κάθε άκρο του έχει επαναλήψεις 245-371 bp.



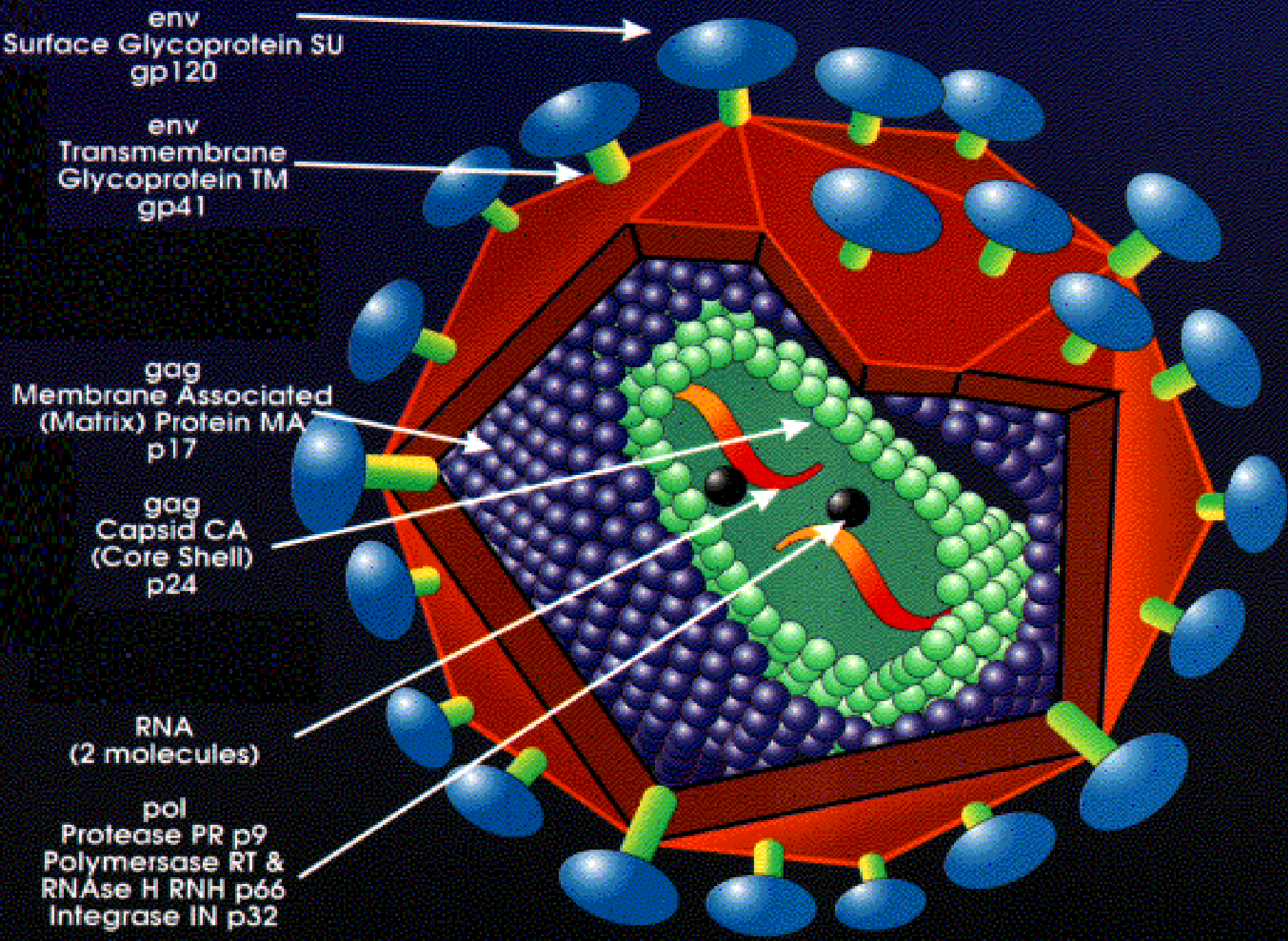
Εντός των επαναλήψεων τοποθετείται ο επαγωγέας ο οποίος επάγει την μεταγραφή ενός τμήματος 5,6 kb mRNA. Περιέχει 2 γονίδια : το TyA το οποίο παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο gag των ρετροϊών και το TyB που παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο pol. Η πρωτεΐνη η οποία κωδικοποιείται από το TyA σχηματίζει μια σχεδόν σφαιρική δομή διαμέτρου 60 nm “virus-like particle -VLP”. Το 5,6 Kb μετάγραφο μπορεί να εισέλθει σε μια τέτοια δομή δημιουργώντας ενδοκυτταρικές δομές γνωστές ως Ty-VLPs.

Η πιο σημαντική διαφορά μεταξύ των ρετροϊών και των στοιχείων Ty είναι ότι οι ρετροϊοί έχουν ένα επιλέον γονίδιο , το env ,το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του περιβλήματος .Η πρωτεΐνη του περιβλήματος συνδέεται στον υποδοχέα και έτσι επέτρεψε στους ρετροϊούς να «αποδράσουν» από την αποκλειστικά ενδοκυτταρική ζωή των ρετροτρανσποζονίων και να επεκτείνουν τον πληθυσμό τους μέσω της μόλυνσης και άλλων κυττάρων ξενιστών.

Οι ρετροϊοί χαρακτηρίζονται από ότι :  
Είναι διπλοειδείς

Η αντιγραφή τους χρησιμοποιεί ως εκκινήτη ένα κυτταρικό tRNA  
Αν και το γένωμά τους είναι θετικής πολικότητας δεν λειτουργεί αμέσως ως mRNA μετά την είσοδο του ιού στο κύτταρο ξενιστή.

Αν και RNA ιοί η μεταγραφή τους πραγματοποιείται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή.



Οι ρετροϊοί έχουν γενετικό υλικό αποτελούμενο από δύο ανεξάρτητα μόρια (+) RNA αλυσίδων και χαρακτηρίζονται από την παρουσία του ενζυμικού συμπλόκου της αντίστροφης μεταγραφάσης, ενσωματάσης, RNase H και πρωτεάσης. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιώντας ένα tRNA ως έναυσμα έχει την ικανότητα να αντιγράψει RNA προκειμένου να συνθέσει DNA. Το RNA γίνεται πρώτα μονόκλωνο DNA και στη συνέχεια το ίδιο ένζυμο συνθέτει και το συμπληρωματικό κλώνο, με αποτέλεσμα να έχουμε δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια το δίκλωνο DNA ενσωματώνεται, με τη βοήθεια του ενζύμου ενσωματάσης, στο κυτταρικό γονιδίωμα ως προιός.

Η μεταγραφή του αρχίζει μόνο όταν αυτό ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του ξενιστή. Έτσι η ενσωμάτωση είναι απαραίτητο στάδιο στη ζωή ενός ρετροϊού, και γι' αυτό η συχνότητα ενσωμάτωσης είναι πολύ υψηλή. Κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής, τα δύο μονόκλινα θετικής πολικότητας RNA μόρια του ιού μετατρέπονται σε δίκλωνο DNA μόριο μεγαλύτερου μήκους από το ιικό RNA λόγω του διπλασιασμού των ακραίων επαναλήψεων (long terminal repeats – LTRs).

Για τον πολλαπλασιασμό του προιού, πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στα άκρα του RNA, και κατ' επέκταση και στα άκρα του DNA του προιού, οι οποίες ονομάζονται LTR (Long Terminal Repeats). Αυτές περιέχουν υποκινητές (promoters) και ενισχυτές (enhancers), που δίνουν τα αναγκαία σήματα για την μεταγραφή του προιού σε RNA. Το τελευταίο έχει διπλό ρόλο καθ' ότι χρησιμεύει αφ' ενός ως mRNA για τη σύνθεση των ιϊκών πρωτεϊνών και αφ' ετέρου ως γενετικό υλικό για τη δημιουργία νέων απογόνων.

## Η δομή του ιικού γενώματος ενός ώριμου Ρετροϊού

PBS

GAG

POL

ENV



R U5 Leader

PPTU3 R

**R Region:** επαναλήψεις 18-250nt επαναλαμβανόμενες στα 2 άκρα του γενώματος.

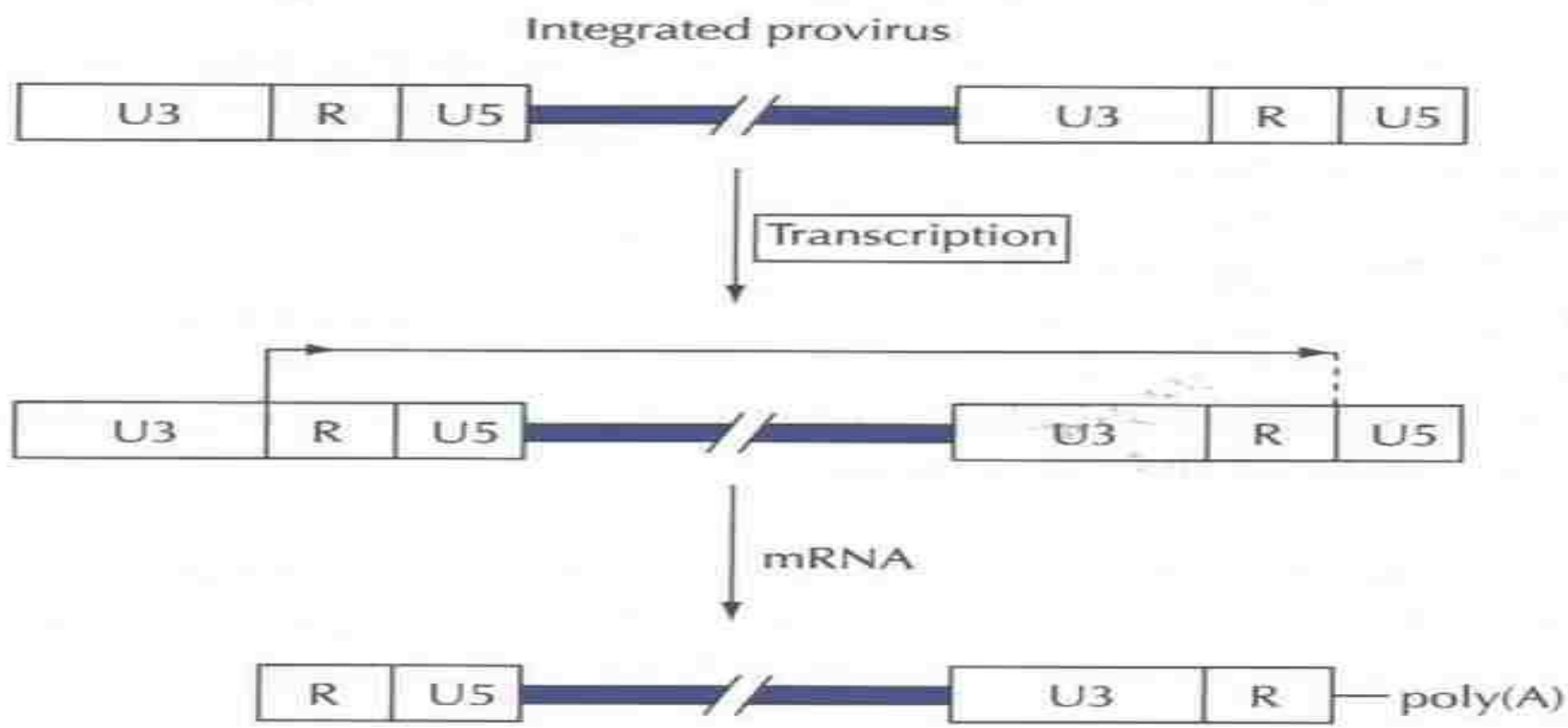
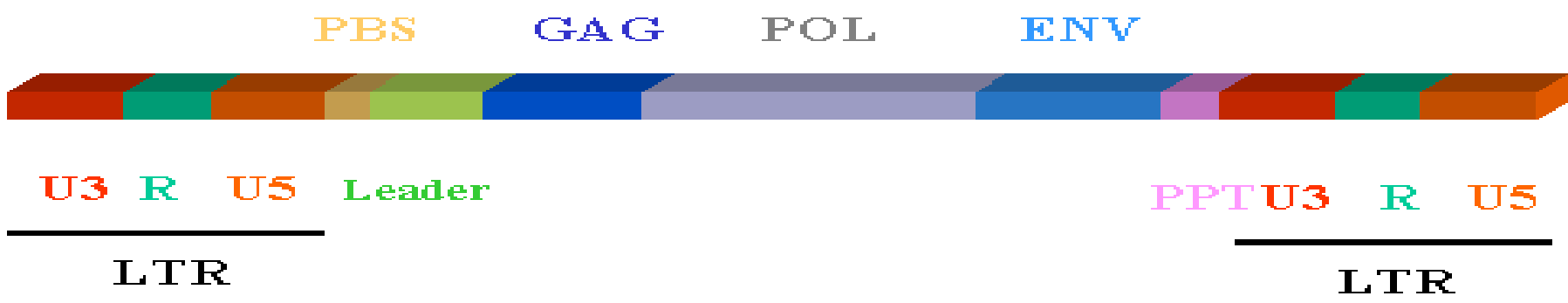
**U5:** μοναδική μη κωδικοποιούσα περιοχή 75-250nt η οποία μεταγράφεται πρώτη (reverse transcribed), σχηματίζοντας το τέλος 3' του προιού.

**Primer Binding Site:** 18nt συμπληρωματικά του τέλους 3' του ειδικού tRNA το οποίο χρησιμοποιείται για την αρχή της αντίστροφης μεταγραφής.

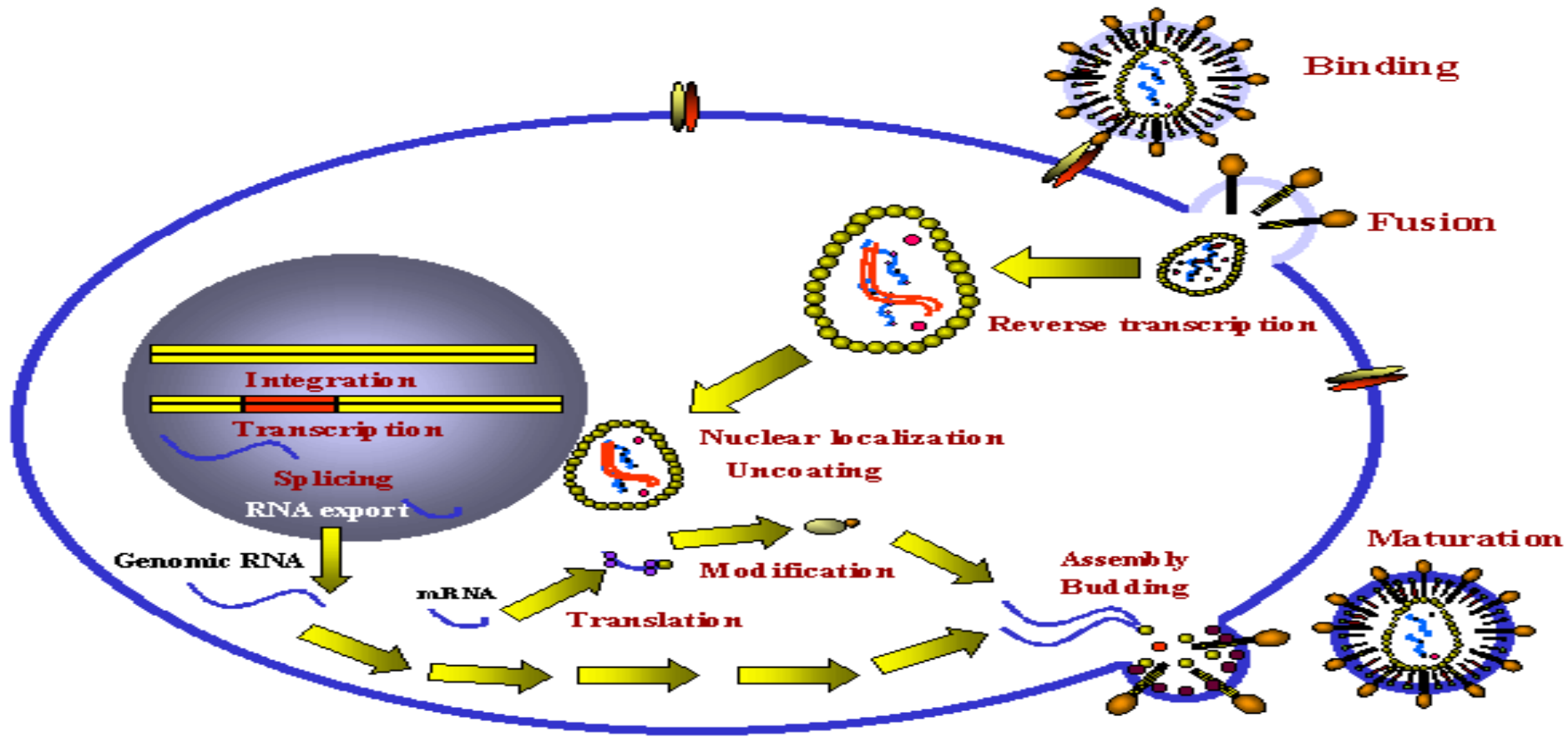
**Leader:** σχετικά μεγάλη αλληλουχία 90-500nt, μη μεταφραζόμενη περιοχή αμέσως μετά το σημείο εκκίνησης της μεταγραφής και κατά συνέπεια παρούσα στο 5' του ιικού mRNAs.

**Polyurine Tract:** μια μικρή (~10) νουκλεοτιδίων αλληλουχία A/G υπεύθυνη για την έναρξη της σύνθεσης του θετικού κλώνου (+) κατά την διάρκεια της αντίστροφης μεταγραφής.

# Η δομή του γενώματος ενός Ρετροϊού υπό μορφή DNA προιού



Ο ιός μολύνει ένα νέο κύτταρο-ξενιστή με σύντηξη του φακέλου του με την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξενιστή και ακολουθεί η απελευθέρωση του περιεχομένου του ιϊκού σωματίου στο κυτταρόπλασμα.



Η μετατροπή του ιϊκού RNA σε δίκλωνο DNA ξεκινάει εντός του νουκλεοκασιδίου κατά την διεργασία απελευθέρωσης του RNA, έτσι το «πήδημα» της RNA εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης οφείλεται στο γεγονός ότι η στερεοδιαμόρφωση των δυο κλώνων RNA είναι τέτοια ώστε τα δυο άκρα εκάστου κλώνου να είναι πολύ κοντά εντός του νουκλεοκασιδίου.



**Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι το ένζυμο που ευθύνεται για τη σύνθεση, με μήτρα τη θετική αλυσίδα RNA (plus strand RNA), ενός συμπληρωματικού κλώνου DNA που ονομάζεται αρνητική αλυσίδα DNA (minus strand DNA). Η αντίστροφη μεταγραφάση καταλύει και τα μετέπειτα στάδια παραγωγής του δίκλωνου DNA, καθώς διαθέτει ακόμη ενεργότητα DNA πολυμεράσης, η οποία της επιτρέπει να συνθέσει ένα δίκλωνο DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα την αρνητική αλυσίδα DNA. Ο δεύτερος κλώνος DNA αυτού του δίκλωνου μορίου ονομάζεται θετική αλυσίδα DNA (plus strand DNA). Η αντίστροφη μεταγραφάση φέρει επιπλέον και ενεργότητα RNAάσης Η, η οποία αναγνωρίζει ως υπόστρωμα το υβρίδιο RNA-DNA και αποικοδομεί το RNA του.**

Το ιικό RNA φέρει στα άκρα του ομόρροπες επαναλήψεις που ονομάζονται **τμήματα R** (R segments, τα οποία ποικίλλουν από 10 ως 250 νουκλεοτίδια). Η αλληλουχία στο 5' άκρο του ιού συμβολίζεται με **R-U5** και η αλληλουχία στο 3' άκρο με **U3-R**. Τα τμήματα R χρησιμοποιούνται κατά τη σύνθεση του DNA, ώστε να δημιουργηθούν οι πιο εκτεταμένες ομόρροπες επαναλήψεις που απαντώνται στο γραμμικό DNA του ιού. Στην ενσωματωμένη του μορφή, το δίκλωνο DNA του ιού βραχύνεται σε κάθε άκρο κατά 2 bp περίπου, γεγονός που αποτελεί συνέπεια του μηχανισμού ενσωμάτωσης.

**Η αντίστροφη μεταγραφάση χρειάζεται έναν εκκινητή. Ο φυσικός εκκινητής της είναι ένα μόριο tRNA. Ένα αφόρτιστο tRNA του ξενιστή βρίσκεται μέσα στο ιικό σωματίο. Μια αλληλουχία 18 βάσεων στο 3' άκρο αυτού του tRNA ζευγαρώνει με μια θέση που απέχει 100-200 βάσεις από το 5' άκρο ενός από τα ιικά μόρια RNA. Το tRNA μπορεί να ζευγαρώσει και με μια άλλη θέση κοντά στο 5' άκρο του δεύτερου ιικού RNA, βοηθώντας έτσι το σχηματισμό διμερών ανάμεσα στα δύο ιικά μόρια RNA.**

Η αντίστροφη μεταγραφάση αρχίζει να συνθέτει DNA από μια θέση που απέχει 100-200 βάσεις καθοδικά από το 5' άκρο.

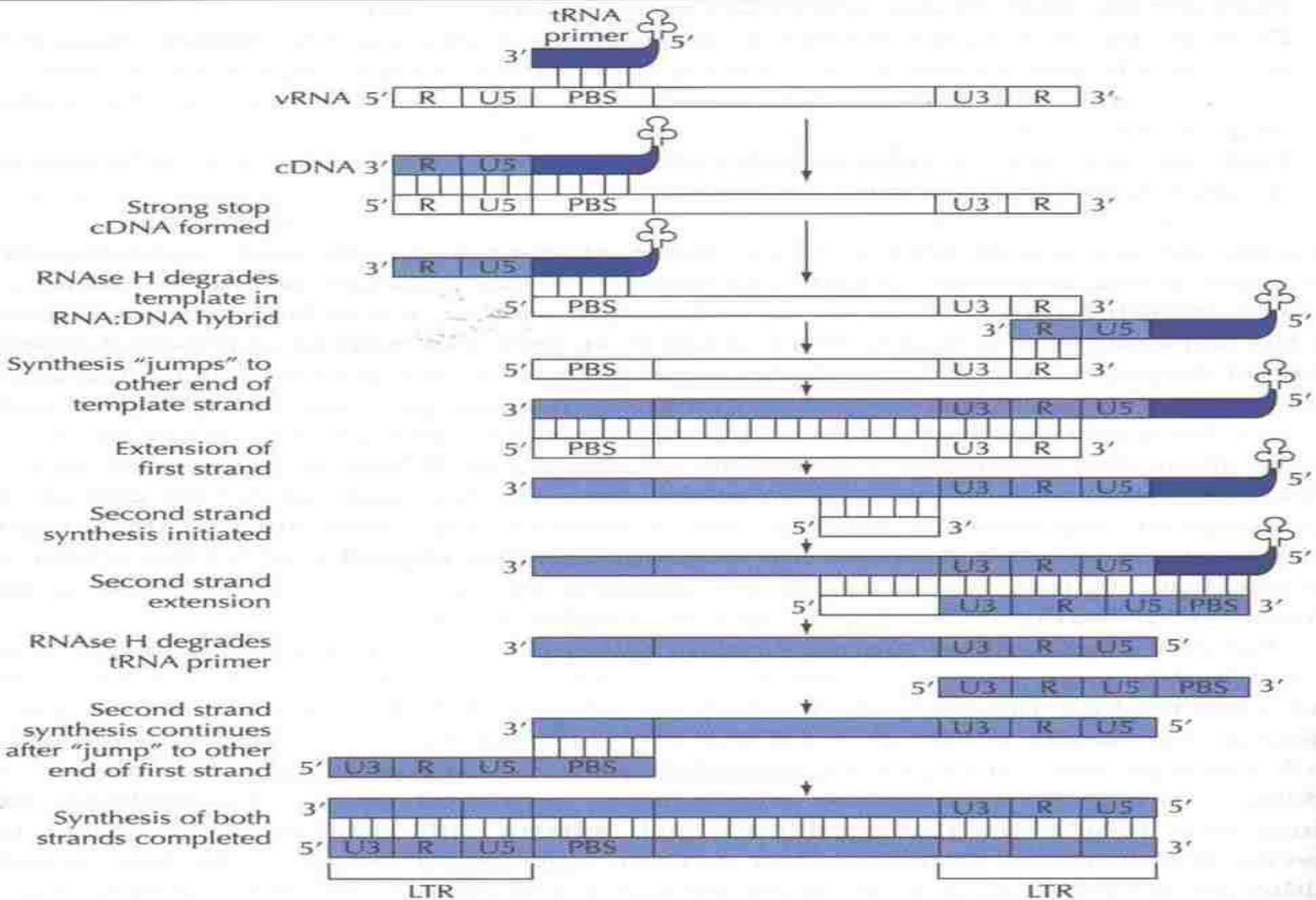
**Πώς όμως είναι δυνατόν να συντεθεί το DNA που αντιπροσωπεύει το ακέραιο γονιδίωμα του ιού;**

Η αντίστροφη μεταγραφάση μεταπηδά από τη 5' περιοχή στη 3' περιοχή, μεταφέροντας το αρτιγενές μόριο DNA. Μετά τη σύνθεση του αρνητικού DNA, η περιοχή R στο 5' άκρο της μήτρας RNA αποικοδομείται χάρη στην ενεργότητα RNAάσης H της αντίστροφης μεταγραφάσης. Η αφαίρεση αυτής της περιοχής επιτρέπει στο τμήμα R που βρίσκεται στο νεοσυντιθέμενο DNA να ζευγαρώσει με το τμήμα R στο 3' άκρο. Ακολούθως, η αντίστροφη μεταγραφή συνεχίζεται, μέσω της περιοχής U3, στο κύριο τμήμα του ιικού RNA.

Το αποτέλεσμα της μεταπήδησης και της επακόλουθης επιμήκυνσης είναι να προστεθεί ένα τμήμα U3 στο 5' άκρο. Το τμήμα του RNA με τη δομή U3-R-U5 ονομάζεται **μακριά τερματική επανάληψη (LTR – Long Terminal Repeat)**.

**Το μήκος της LTR ποικίλλει από 700-1.400 bp.**

Στο επόμενο στάδιο χρειάζεται να σχηματιστεί η θετική αλυσίδα του DNA και η LTR στο 3' άκρο. Η αντίστροφη μεταγραφάση κάνει εκκίνηση της σύνθεσης της θετικής αλυσίδας DNA από ένα τμήμα RNA που έχει παραμείνει μετά την αποικοδόμηση του αρχικού μορίου RNA. Όταν το ένζυμο φτάσει στο άκρο της μήτρας, ολοκληρώνεται η σύνθεση της θετικής αλυσίδας DNA. Στη συνέχεια, αυτή η αλυσίδα DNA μεταφέρεται στο άλλο άκρο της αρνητικής αλυσίδας. Η θετική αλυσίδα DNA χρησιμοποιεί την περιοχή PBS για να ζευγαρώσει με το 3' άκρο της αρνητικής αλυσίδας DNA. Ακολούθως, αυτό το μερικά δίκλωνο DNA υφίσταται συμπλήρωση και των δύο κλώνων του, ώστε να σχηματιστούν δίκλωνες περιοχές LTR σε κάθε άκρο.



**Key**  
 □ Virus RNA  
 ■ Newly synthesized cDNA

Η αντίστροφη μεταγραφή είναι μια διεργασία χαμηλής μεταγραφικής πιστότητας με αποτέλεσμα να εισάγει στο γένωμα των ρετροϊών μεταλλάξεις με υψηλή συχνότητα ( $10^{-3}$  -  $10^{-4}$ ) οδηγώντας σε γενετική ποικιλομορφία.

Επιπλέον δεδομένου ότι το γένωμα των ρετροϊών είναι διπλοειδές είναι δυνατόν να συμβεί ανασυνδυασμός μεταξύ των δυο κλώνων. Στην περίπτωση δε που οι δυο κλώνοι διαφέρουν μεταξύ τους π.χ. από μια μόνο μετάλλαξη τότε σε περίπτωση ανασυνδυασμού ο ιός ο οποίος θα προκύψει θα είναι γενετικώς διαφορετικός και από τους δυο γονείς.

Κατά συνέπεια και ο ανασυνδυασμός οδηγεί σε γενετική ποικιλομορφία.

Μετά το τέλος της αντίστροφης μεταγραφής το δίκλωνο DNA μεταναστεύει στον πυρήνα. Τα προϊόντα του γονιδίου pol είναι ένα σύμπλοκο πολυπεπτιδίων με τρεις ενζυμικές ενεργότητες :

αντίστροφης μεταγραφάσης, RNase H (ενεργότητες οι οποίες εμπλέκονται στην αντίστροφη μεταγραφή) και ενσωματάσης (integrase) ενεργότητα η οποία εμπλέκεται στην ενσωμάτωση του δίκλωνου πλέον ιικού DNA στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή ως προιού.

# Η δομή του γενώματος ενός Ρετροϊού υπό μορφή DNA προιού

PBS GAG POL ENV



U3 R U5 Leader

PPT U3 R U5

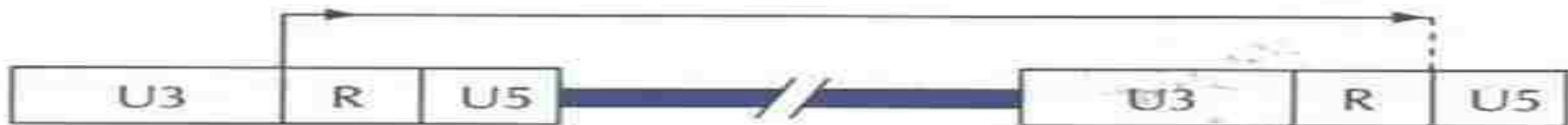
LTR

LTR

Integrated provirus



Transcription

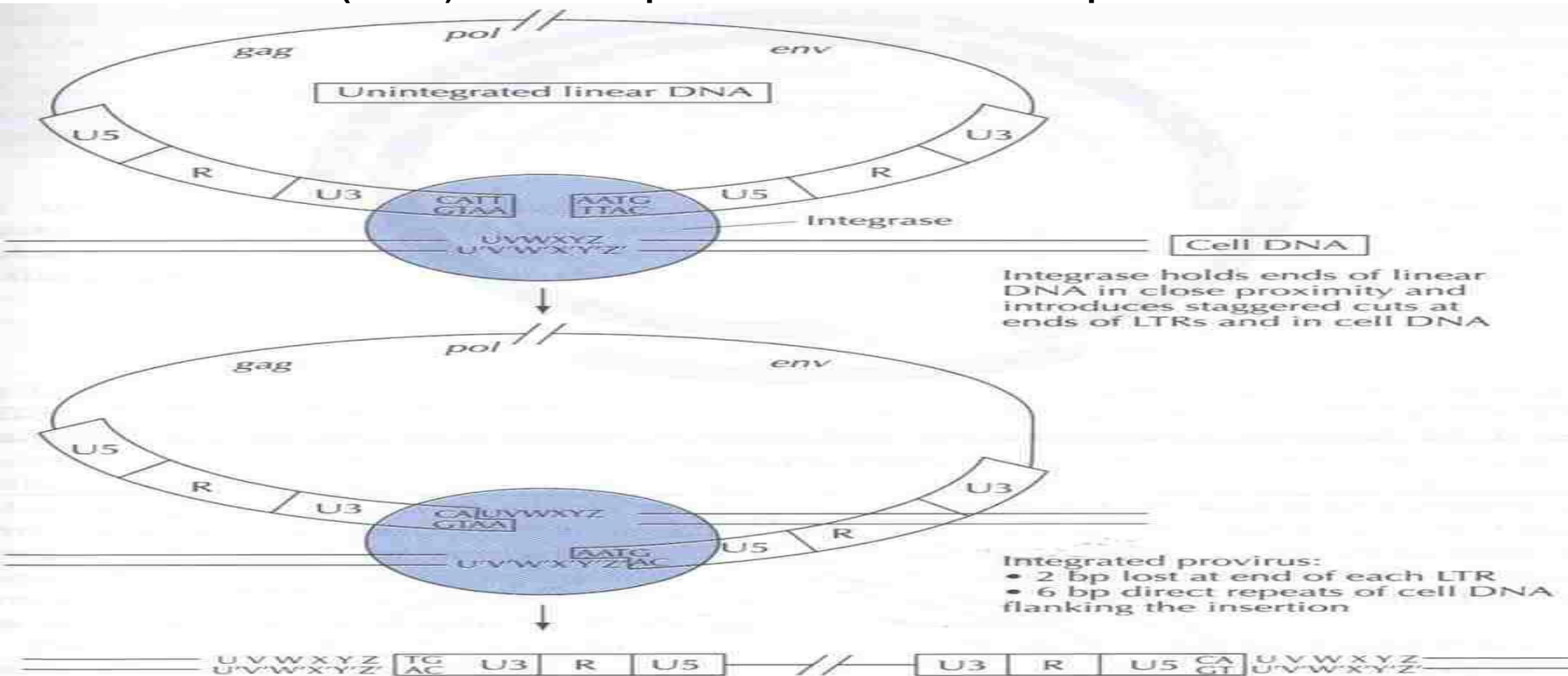


mRNA



## Ως μοντέλο ενσωμάτωσης θεωρείται ότι :

Τα άκρα LTRs βρίσκονται πολύ κοντά το ένα με το άλλο συγκρατούμενα από το ενζυμικό σύμπλοκο αντίστροφης μεταγραφάσης –RNAse H -Integrase . Το αποτέλεσμα της ενσωμάτωσης είναι η απώλεια 1-2 bp από τα άκρα κάθε LTRs και η προσθήκη (εκατέρωθεν των LTRs) επιπλέον 4-6 bp προερχόμενες από το κυτταρικό DNA. Πιστεύεται ότι η ενσωμάτωση στο DNA του κυττάρου ξενιστή γίνεται σε θέσεις λίγο πολύ τυχαίες και πλέον ο προιός εξαρτάται από το κυτταρικό σύστημα για την περαιτέρω έκφρασή του. Ο μόνος τρόπος για τον ιό για να ενεργοποιηθεί και να αποκοπεί από το γένωμα του κυττάρου ξενιστή είναι η μεταγραφή του μέσω ενός πλήρους ( full length) mRNA μείον τα άκρα U3 και U5 των LTRs. Δυο αντίγραφα από αυτό το ιικό RNA (vRNA) θα ενσωματωθούν στο νουκλεοκαψίδιο του ιού.



Η ενσωμάτωση του γραμμικού DNA καταλύεται από ένα μόνο προϊόν του ιού, την ιντεγράση. Η ιντεγράση δρα τόσο στο γραμμικό DNA του ρετροϊού όσο και στο DNA-στόχο. Κοντά στο άκρο κάθε ανάστροφης επανάληψης υπάρχει μια δινουκλεοτιδική αλληλουχία CA, η οποία αποτελεί το καλύτερα συντηρημένο χαρακτηριστικό των άκρων.

**Η ιντεγράση φέρνει κοντά τα άκρα του γραμμικού DNA μέσα σε ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο και τα μετατρέπει από λεία (blunt ends) σε υπολειπόμενα (recessive ends), αφαιρώντας τις βάσεις που βρίσκονται πέρα από το συντηρημένο δινουκλεοτίδιο CA.**

Το αποτέλεσμα της αντίδρασης αυτής είναι συνήθως η απώλεια 2 βάσεων από κάθε άκρο. Οι θέσεις-στόχοι επιλέγονται τυχαία από πλευράς αλληλουχίας.

Η ιντεγράση δημιουργεί ασυμπτωτικές εγκοπές στη θέση-στόχο. Η απόσταση των ασυμπτωτικών εγκοπών και επομένως το μήκος της αλληλουχίας που επαναλαμβάνεται εκατέρωθεν της θέσης-ένθεσης του προϊού εξαρτώνται από το συγκεκριμένο ρετροϊό και μπορεί να είναι 4, 5 ή 6 bp.

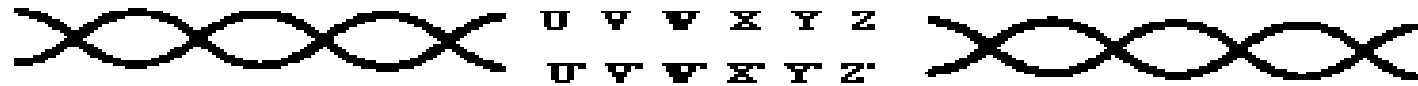
Τα 5' άκρα που σχηματίζονται από τη θραύση του DNA-στόχου ενώνονται ομοιοπολικά με τα υπολειπόμενα 3' άκρα του ιικού DNA.

Τα δύο 3' άκρα του ιικού DNA συνδέονται με έναν από τους κλώνους του DNA-στόχου.

**Στη συνέχεια, ένζυμα του κυττάρου-ξενιστή επιδιορθώνουν τις μονόκλωνες περιοχές.**

**Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης αυτής αφαιρούνται οι 2 προεξέχουσες βάσεις από τα 5' άκρα του ιικού DNA, με αποτέλεσμα το ενσωματωμένο ιικό DNA να χάσει 2 bp από κάθε LTR. Αυτό σημαίνει απώλεια 2 bp από το αριστερό άκρο του 5' τερματικού U3 και 2 bp από το δεξί άκρο του 3' τερματικού U5.**

**Το ιικό DNA ενσωματώνεται στο γονιδίωμα του ξενιστή σε θέσεις που επιλέγονται τυχαία.**



- Κάθε LTR φέρει έναν υποκινητή που εντοπίζεται στην περιοχή U3. Ο υποκινητής στην αριστερή LTR ευθύνεται για την έναρξη της μεταγραφής του προϊόντος.
- Η LTR φέρει επίσης έναν ενισχυτή (enhancer) στην περιοχή U3, δηλαδή μία αλληλουχία που ενεργοποιεί υποκινητές σε γειτονικές με αυτή περιοχές και μπορεί να δρα τόσο σε κυτταρικές όσο και σε ιικές αλληλουχίες.



Σε αντίθεση με τους ρετροϊούς ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV- Hepatoviridae, hepadnaviruses ) χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση όχι σε αρχικό στάδιο της αντιγραφής αλλά λίγο πριν τον σχηματισμό του ιικού σωματιδίου.

Features	Caulimoviruses	Hepadnaviruses	Retroviruses
Genome	DNA	DNA	RNA
Primer for (–)strand synthesis	tRNA	Protein	tRNA
Terminal repeats (LTRs)	No	No	Yes
Specific integration of virus genome	No	No	Yes

Ο ιός HBV αποτελείται από σφαιρικά σωματίδια διαμέτρου 42-47 nm εντός του οποίου περιέχεται μερικώς δίκλωνο DNA ( παρουσιάζοντας κενά - gapped DNA ) καθώς επίσης και το ένζυμο RNA εξαρτώμενη DNA πολυμεράση δηλ. η αντίστροφη μεταγραφάση. Το γένωμα του ιού HBV αποτελείται από έναν αρνητικό κλώνο μήκους 3,0-3,3 Kb και ένα θετικό κλώνο μήκους 1,7-2,8 Kb . Ο ιός παράγει τρία μεταγράφα μήκους 3,5 , 2,4 και 2,1 Kb mRNAs τα οποία έχουν την ίδια πολικότητα ( μεταγράφονται από τον ίδιο κλώνο ) και το ίδιο 3' άκρο , αλλά διαφορετικά 5' άκρα δηλ. διαφορετικά σημεία εκκίνησης της μεταγραφής.

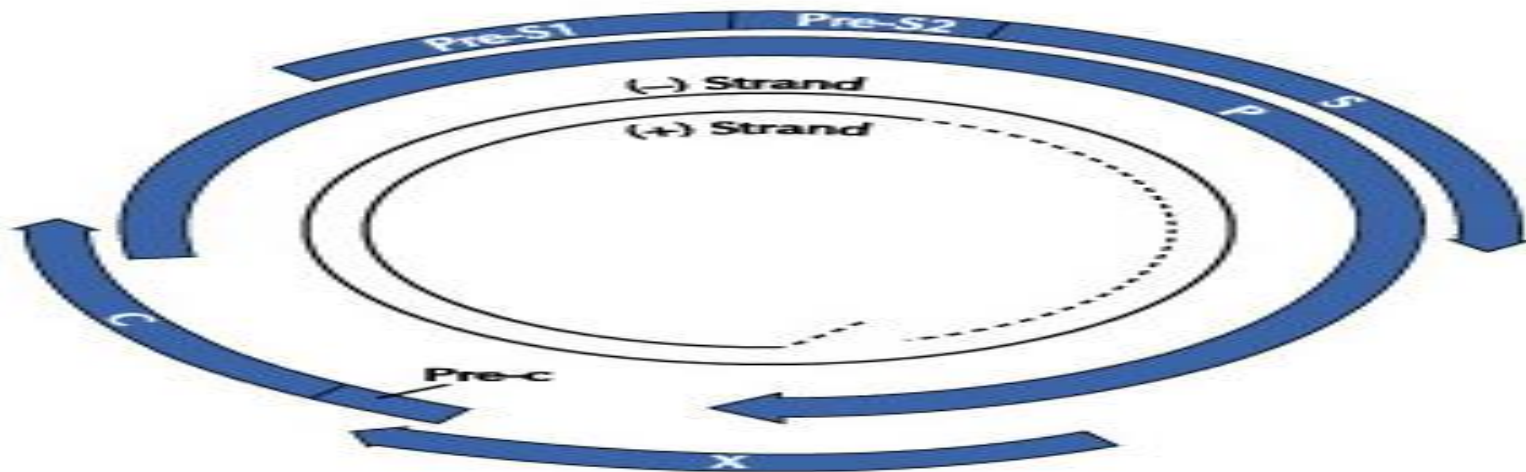
Ο ιός φέρει 4 γονίδια :

Το γονίδιο C το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του καψιδίου

Το γονίδιο P το οποίο κωδικοποιεί για την πολυμεράση

Το γονίδιο S το οποίο μέσω εναλλακτικού ματίσματος κωδικοποιεί για τα αντιγόνα επιφανείας pre-S1 , pre-S2 και S

Το γονίδιο X το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη trans-ενεργοποιητή της μεταγραφής



Το ιώσωμα περιέχει τουλάχιστον ένα ολόκληρο μόριο της P (πολυμεράσης) πρωτεΐνης. Στο καρβοξυτελικό άκρο βρίσκεται μια περιοχή με ενεργότητα ριβονουκλεάσης H (RNase H).

Η P έχει επίσης ενεργότητα DNA- εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης.

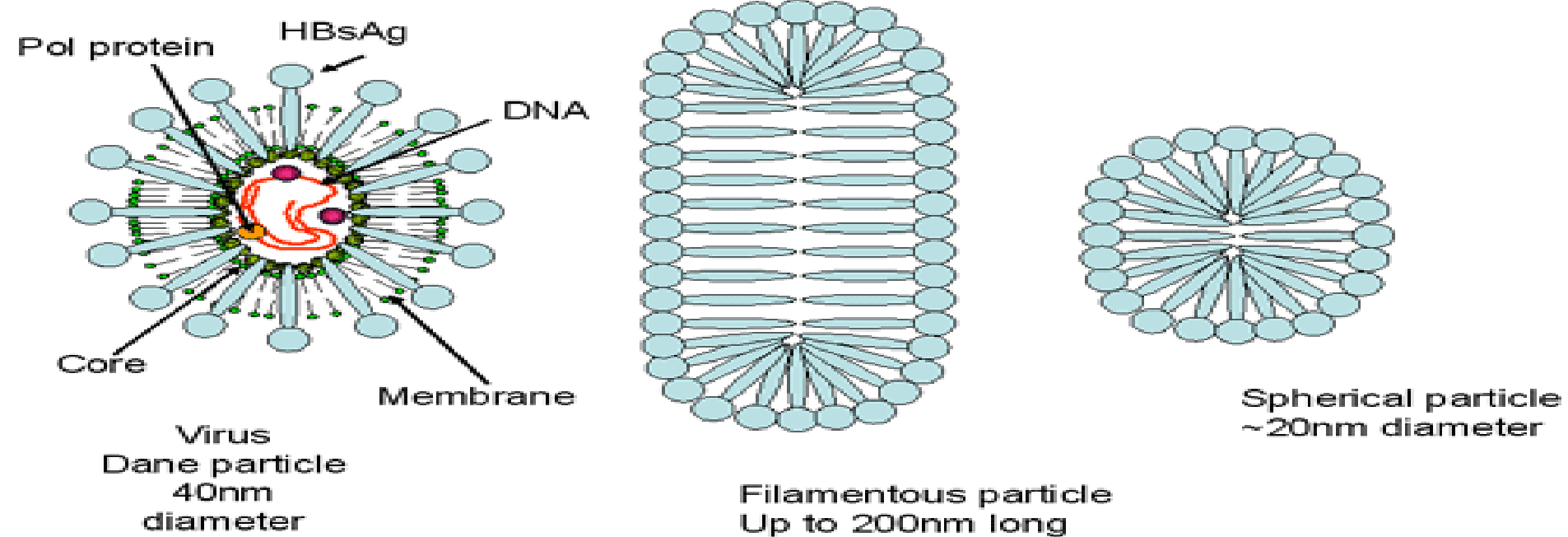
Το καψίδιο, το οποίο έχει εικοσαεδρική συμμετρία, είναι κατασκευασμένο από διμερή της C (core) πρωτεΐνης. Το καρβοξυτελικό άκρο της C πρωτεΐνης είναι πολύ βασικό λόγω της παρουσίας κατάλοιπων αργινίνης (αυτή η περιοχή συνδέεται στο ιικό γένωμα).

Ο φάκελος του ιοσώματος περιέχει τρία είδη πρωτεϊνών: μικρή πρωτεΐνη (S), μεσαία πρωτεΐνη (M) και μεγάλη πρωτεΐνη (L). Οι πρωτεΐνες M και L είναι πιο μακριές εκδοχές της S πρωτεΐνης, η οποία είναι η πιο άφθονη. Οι επιφανειακές περιοχές των πρωτεϊνών του φακέλου αποτελούν ένα αντιγόνο γνωστό ως αντιγόνο επιφάνειας της ηπατίτιδας β (HBsAg).

### Μη μολυσματικά σωματίδια

Ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό της μόλυνσης με HBV είναι η παρουσία στο αίμα όχι μόνο ιοσωμάτων, αλλά και μεγάλων ποσοτήτων μη μολυσματικών σωματιδίων, τα οποία απελευθερώνονται από τα μολυσμένα κύτταρα του ήπατος. Αυτά τα σωματίδια δεν περιέχουν νουκλεοκαψίδια και αποτελούνται από λιπίδια και ιικές πρωτεΐνες του φακέλου. Μερικά από τα σωματίδια αυτά είναι σαν ίνες και άλλα είναι σφαιρικά. Τα μη μολυσματικά σωματίδια, ειδικά τα σφαιρικά, ξεπερνούν αριθμητικώς κατά πολύ τα ιοσωμάτια. Έχει προταθεί ότι τα μη μολυσματικά σωματίδια δρουν σαν δόλωμα έναντι των αντισωμάτων του ξενιστή, και με αυτόν τον τρόπο παρέχουν στα ιοσώματα ένα είδος προστασίας από το ανοσοποιητικό σύστημα του ξενιστή.

Μαζί με τα ιοσώματα και τα μη-μολυσματικά σωματίδια στο αίμα μερικών μολυσμένων ασθενών βρίσκεται και μια διαλυτή πρωτεΐνη. Αυτή η πρωτεΐνη είναι γνωστή ως αντιγόνο e της ηπατίτιδας B (HBeAg). Είναι παρόμοια με την πρωτεΐνη C, αλλά έχει 10 επιπρόσθετα κατάλοιπα αμινοξέων στο αμινοτελικό άκρο και της λείπουν 34 αα από το καρβοξυτελικό άκρο. Η λειτουργία του HBeAg είναι άγνωστη.



Σύντομα μετά την μόλυνση στον πυρήνα των κυττάρων ευρίσκεται το DNA του ιού υπό την μορφή κλειστού κυκλικού DNA και πιστεύεται ότι σχηματίζεται ως εξής :

Συμπληρώνεται ο κλώνος θετικής πολικότητας

Η έναρξη της αντιγραφής γίνεται μέσω μιας πρωτεΐνης η οποία λειτουργεί ως εκκινητής στον αρνητικό κλώνο και μέσω ενός ολιγονουκλεοτιδίου το οποίο λειτουργεί ως εκκινητής στον θετικό κλώνο και οι δυο αυτοί εκκινητές αφαιρούνται.

Στα άκρα του αρνητικού κλώνου υπάρχουν επαναλήψεις οι οποίες αφαιρούνται  
Ενωση των άκρων των δυο κλώνων ( ligation).

Η δρατικότητα αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία μετατρέπει το RNA σε DNA πραγματοποιείται στο ιικό σωματίδιο καθώς αυτό σχηματίζεται στο κυτταρόπλασμα.

## **ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ**

### **ΓΕΝΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ**

Καθώς αυξάνεται ο αριθμός των ιών που απομονώνονται και οι τεχνικές ανάλυσης βελτιώνονται, έγινε εφικτό κατά την διάρκεια των δεκαετιών 1930-1950 να ταξινομηθούν οι ιοί με βάση την δομή των σωματιδίων τους.

Υπάρχουν ακόμα προβλήματα διάκρισης μεταξύ ιών που είναι μορφολογικά παρόμοιοι αλλά προκαλούν εντελώς ανόμοια κλινικά συμπτώματα (π.χ. οι ποικίλοι *ricorna* ιοί).

Κατά την ίδια χρονική περίοδο η ανάπτυξη των ορολογικών μεθόδων (serology) έδωσε σημαντική βοήθεια στην ταξινόμηση των ιών, και η μορφολογία του σωματιδίου συνεχίζει να αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην ταξινόμηση των ιών (μορφολογική ταξινόμηση).

Στα πρόσφατα χρόνια, περισσότερη έμφαση έχει δοθεί στην σύνθεση και στην δομή του γενώματος των ιών και στους περιορισμούς που υπόκειται η αντιγραφή τους στο κύτταρο ξενιστή (λειτουργική ταξινόμηση).

Η μοριακή ανάλυση του γενώματος των ιών επιτρέπει την γρήγορη αναγνώριση των ξεχωριστών ειδών των ιών και συγχρόνως επιτρέπει την πρόβλεψη των ιδιοτήτων και την σύγκριση ενός προηγούμενως άγνωστου ή νέου ιού με μια ήδη γνωστή δομή γενώματος.

Υπό μια τελεολογική έννοια, ο μόνος σκοπός του ιού είναι να αντιγράψει τις γενετικές πληροφορίες του και είναι η φύση του γενώματος του ιού η οποία και θα καθορίσει ποια βήματα είναι απαραίτητα για να επιτύχει τον σκοπό του. Για τους ιούς των προκαρυωτών, η αντιγραφή αντανακλά σε κάποιο βαθμό την σχετική απλότητα των κυττάρων ξενιστών .

Για τους ιούς των ευκαρυωτών όπου οι δομές είναι συχνά πιο σύνθετες, κάθε γένος επιλέγει την στρατηγική του για την αντιγραφή.

Το γένωμα του ιού μπορεί να είναι πολύ μικρό και ο ιός κωδικοποιεί μόνο την απαραίτητη πληροφορία για λίγες πρωτεΐνες, π.χ. ραγνο ιοί.

Αντίθετα , μεγάλα και σύνθετα γενώματα, όπως αυτά των ροξ ιών, κωδικοποιούν από μόνοι τους την περισσότερη απαραίτητη για την αντιγραφή τους πληροφορία, και ο ιός βασίζεται μόνο στο κύτταρο ξενιστή για την παροχή της απαραίτητης ενέργειας και των ριβοσωμάτων.

Οι ιοί με RNA τρόπο ζωής και ένα RNA γένωμα που μπορεί να λειτουργήσει και ως mRNAs, δεν έχουν φαινομενικά την ανάγκη να μπουν στον πυρήνα, παρόλο που κατά την διάρκεια της αντιγραφής, πολλοί το κάνουν.

Οι 'DNA ιοί', όπως αναμένεται, κυρίως, αντιγράφονται στον πυρήνα όπου το κύτταρο ξενιστής αντιγράφει και το δικό του DNA και όπου η βιοχημική μηχανική για αυτήν την διαδικασία είναι διαθέσιμη .

Ωστόσο, μερικοί ιοί με DNA γενώματα (π.χ. ροξviruses) όπως προαναφέρθηκε έχουν αναπτύξει επαρκή βιοχημική μηχανική εντός του ιικού σωματιδίου ώστε να είναι ικανοί να αντιγραφούν στο κυτταρόπλασμα, με μηδαμινή απαίτηση από τις λειτουργίες του κυττάρου ξενιστή.

# RNA VIRUS STRATEGIES

## RNA → RNA

RNA-dependent RNA polymerase

## RNA → DNA

RNA-dependent DNA polymerase  
- reverse transcriptase

## Host cell DNA → mRNA

DNA-dependent RNA polymerase

2

## RNA viruses that do NOT have DNA phase

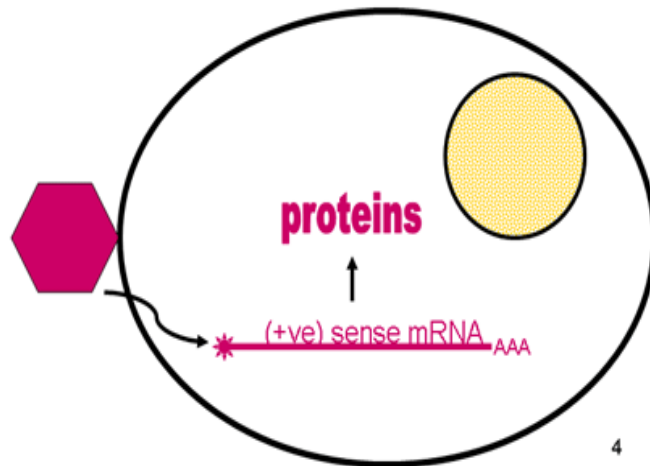
Genome	RNA-dependent RNA polymerase (=transcriptase) IN VIRION	Infectivity of RNA	Initial event in cell
Plus-stranded RNA	No	Infectious	Translation
Negative-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Transcription
Double-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Transcription

# RETROVIRUSES

Genome	DNA-dependent RNA polymerase (=reverse transcriptase) in virion	Infectivity of RNA	Initial event in cell
Plus-stranded RNA	Yes	Non-infectious	Reverse transcription

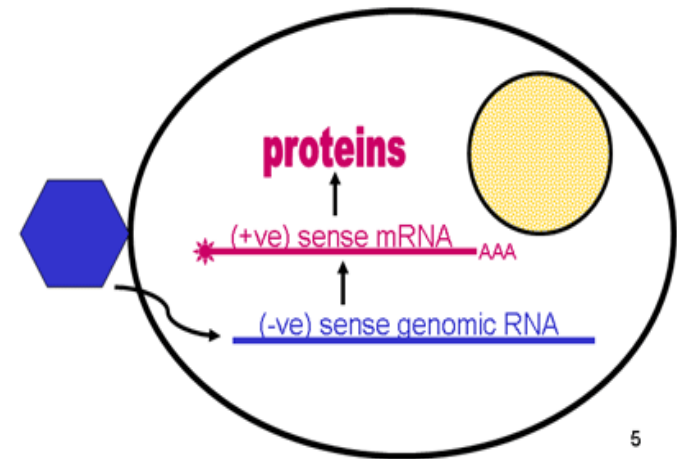
Need to make mRNA

PLUS (POSITIVE) SENSE RNA GENOMES



Need to make mRNA

MINUS (NEGATIVE) SENSE RNA GENOMES



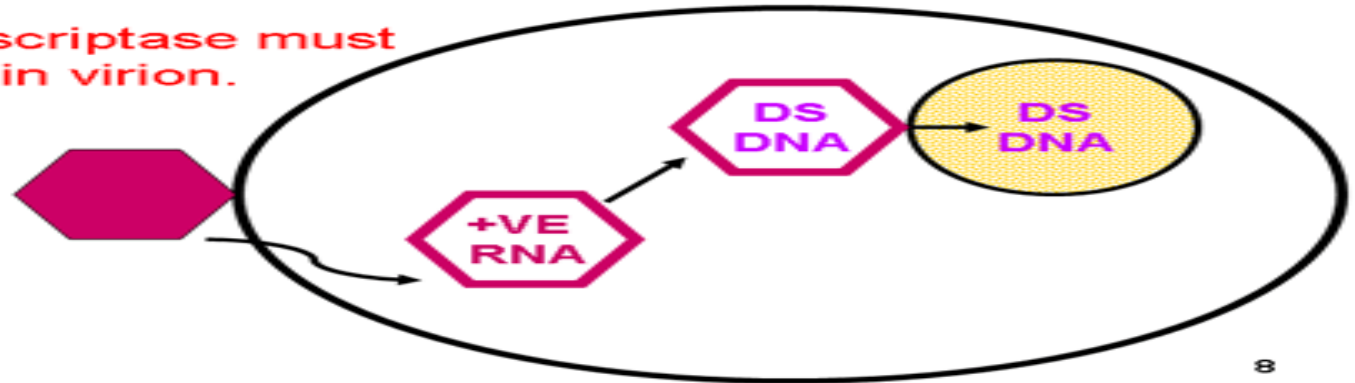
Οι ιοί με RNA τρόπο ζωής και ένα RNA γένωμα που μπορεί να λειτουργήσει και ως mRNA, δεν έχουν φαινομενικά την ανάγκη να μπουν στον πυρήνα, παρόλο που κατά την διάρκεια της αντιγραφής, κάποιοι το κάνουν ( ρετροιοί).



# Need to make mRNA

## RETROVIRUSES

Reverse transcriptase must be packaged in virion.



Τα ένζυμα τα οποία εμπλέκονται στο μάτισμα του mRNA ευρίσκονται στον πυρήνα και καθώς οι RNA ιοί αναδιπλασιάζονται στο κυτταρόπλασμα δεν μπορούν να επωφεληθούν θεωρητικά του ματίσματος.

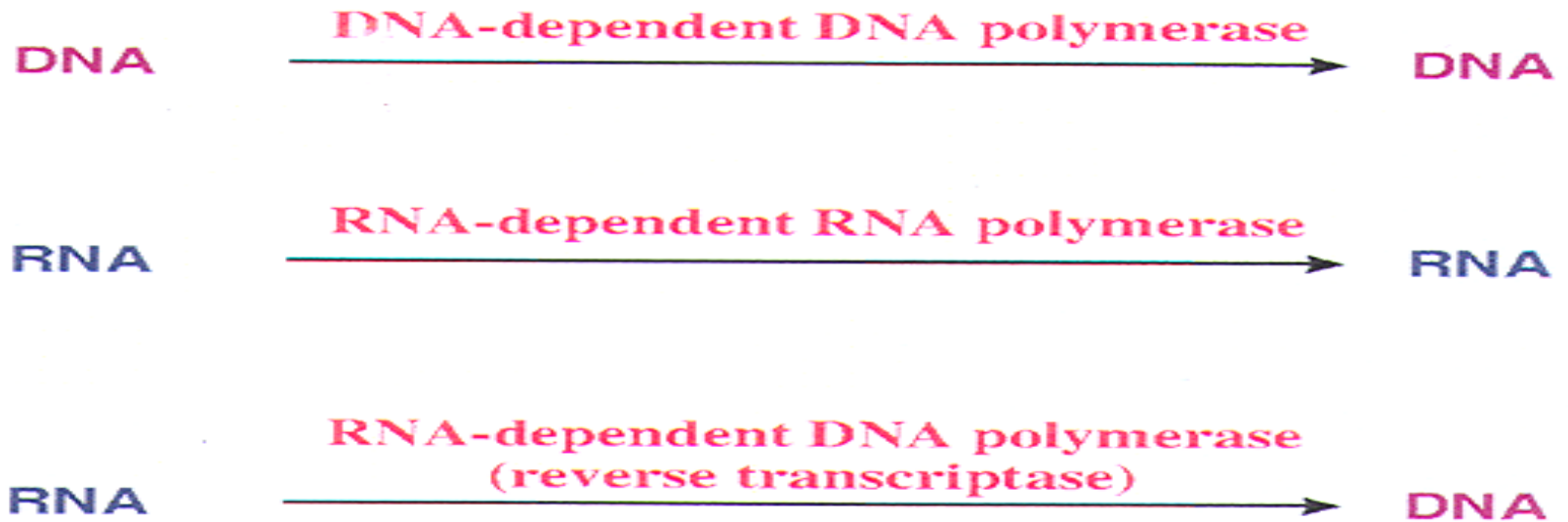
Ετσι οι RNA ιοί ή θα πρέπει να μεταναστεύσουν στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή ή θα πρέπει να μεταφράσουν το mRNA τους ως μια μεγάλη πολυπρωτεΐνη και η οποία θα κωδικοποιεί για μια πρωτεάση η οποία θα πέψει την πρόδρομο πολυπρωτεΐνη σε μικρότερες ώριμες πρωτεΐνες π.χ. εντεροιοί.

# Θέσεις αντιγραφής του γενώματος των RNA & DNA ιών στα ευκαρυωτικά κύτταρα

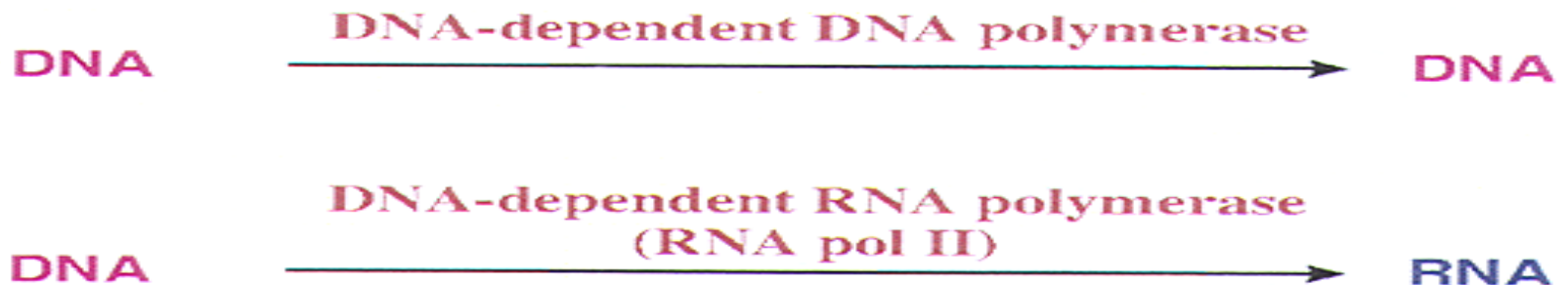
Virus genome	Cytoplasm	Nucleus
dsDNA	Some	Some
ssDNA		All
dsRNA	All	
(+) RNA	All	
(-) RNA (non-segmented genome)	All	
(-) RNA (segmented genome)		All
Retroviruses [(+) RNA] } Pararetroviruses [dsDNA] }	ssRNA → dsDNA	dsDNA → ssRNA

# Ενζυμα ιϊκής και κυτταρικής προέλευσης τα οποία συμμετέχουν στον κύκλο αντιγραφής των RNA & DNA ιών στα ευκαρυωτικά κύτταρα

## Virus enzymes

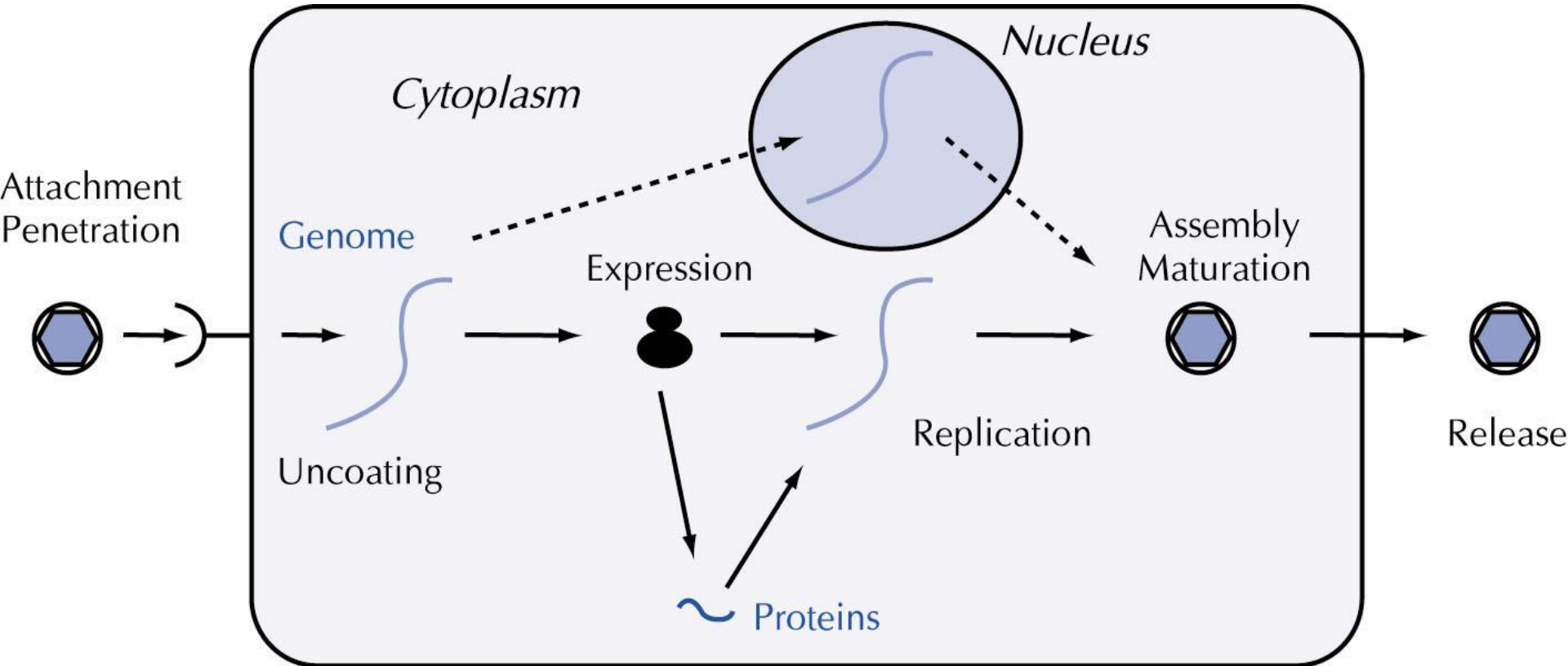


## Cell enzymes



# Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ

Ο κύκλος της αντιγραφής του ιού μπορεί να διαιρεθεί σε οχτώ στάδια:



Θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτές είναι αυθαίρετες διαιρέσεις ( βήματα), που χρησιμοποιούνται εδώ για την διευκόλυνση της επεξήγησης του κύκλου της αντιγραφής ενός 'τυπικού' ιού των σπονδυλωτών γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν είναι όλα τα ανωτέρω βήματα διακριτά σε όλους τους ιούς.

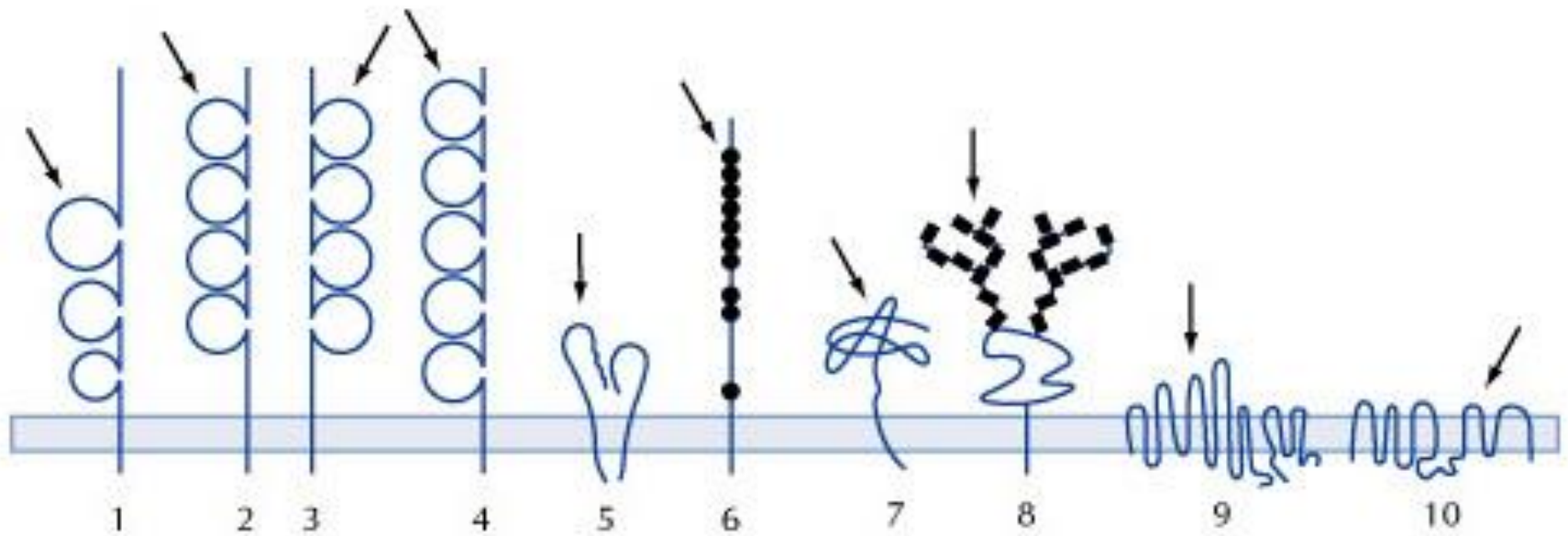
## **ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ**

Η προσκόλληση του ιού αποτελεί μια ειδική ζεύξη μιας πρωτεΐνης προσκόλλησης του ιού σε ένα κυτταρικό μόριο, τον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή.

**Τα μόρια στόχοι-υποδοχείς στις επιφάνειες των κυττάρων ξενιστών είναι κατά κανόνα γλυκοπρωτεΐνες ή και γλυκολιπίδια.**

Οι υποδοχείς των ιών κατατάσσονται βασικά σε 3 μεγάλες ομάδες μορίων :

- α) immunoglobulin-like superfamily ( υποδοχείς 1-4 κατωτέρω) ,**
- β) υποδοχείς που σχετίζονται με την μεμβράνη και**
- γ) διαμεμβρανικοί μεταφορείς .**



© Academic Press, 2000.

**1.Poliovirus receptor (PVR)**

**2.CD4: HIV**

**3.Carcinoembryonic antigen(s): Coronavirus**

**4.ICAM-1: για τους περισσότερους Echo ιούς**

**5.VLA-2 integrin: Echo ιοί**

**6.LDL receptor: για κάποιους rhino ιούς**

**7.Aminopeptidase N: coronaviruses**

**8.Sialic acid (on glycoprotein): influenza, reoviruses, rotaviruses**

**9.Cationic amino acid transporter: murine leukaemia virus**

**10.Sodium-dependent phosphate transporter: gibbon leukaemia virus**

**Οι ιοί των φυτών αντιμετωπίζουν ειδικά προβλήματα κατά την μόλυνση. Κάθε κύτταρο περιβάλλεται από ένα παχύ στρώμα κυτταρίνης που καλύπτει την κυτταροπλασματική μεμβράνη. Μέχρι σήμερα, κανένας ιός φυτών δεν είναι γνωστό ότι χρησιμοποιεί ένα συγκεκριμένο κυτταρικό υποδοχέα του τύπου που οι ιοί των ζώων και των βακτηρίων χρησιμοποιούν για να προσκολληθούν στα κύτταρα. Οι ιοί των φυτών βασίζονται στην παραβίαση της ακεραιότητας του κυτταρικού τοιχώματος με την άμεση εισαγωγή ενός ιικού σωματιδίου στο κύτταρο. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τον φορέα ( π.χ. έντομο ) που σχετίζεται με την μεταφορά του ιού είτε απλά με την μηχανική καταστροφή του κυττάρου.**

**Μερικά από τα πιο κατανοητά παραδείγματα των αλληλεπιδράσεων ιού-υποδοχέα είναι αυτά των Picorna ιών .**

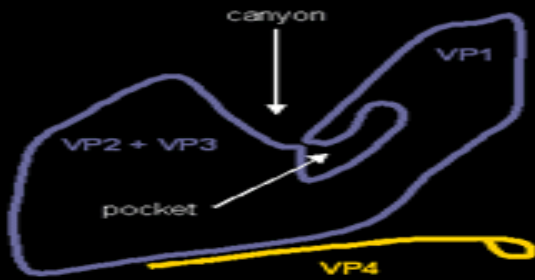
**Ο βασικός υποδοχέας των Ρινοϊών (Human rhinovirus- HRV) είναι το μόριο ICAM-1 το οποίο είναι ένα μόριο προσκόλλησης του οποίου η φυσιολογική λειτουργία είναι να συνδέει τα κύτταρα σε γειτονικά υποστρώματα. Δομικώς, το μόριο ICAM-1 είναι παρόμοιο με ένα μόριο ανοσοσφαιρίνης , με σταθερές (C) και μεταβλητές (V) περιοχές ανάλογες με αυτές των αντισωμάτων και θεωρείται μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (immunoglobulin superfamily). Δεδομένου ότι η κρυσταλλογραφική δομή των καψιδίων ορισμένων picorna ιών είναι γνωστή είναι δυνατόν να προσδιορισθούν τα χαρακτηριστικά της σύνδεσης του ιού με τον υποδοχέα του κυττάρου ξενιστή. Στους Ρινοϊούς του ανθρώπου (rhinoviruses - HRVs), υπάρχει ένα βαθύ σχίσσιμο γνωστό ως 'canyon' στην επιφάνεια της κάθε τριγωνικής πλευράς του εικοσαεδρικού καψιδίου, το οποίο σχηματίζεται από τις γειτονικές δομικές πρωτεΐνες του ιού , VP1, VP2 και VP3 .**

**Τα αμινοξέα που σχηματίζουν τις εσωτερικές επιφάνειες του canyon είναι σχετικά αμετάβλητα.**

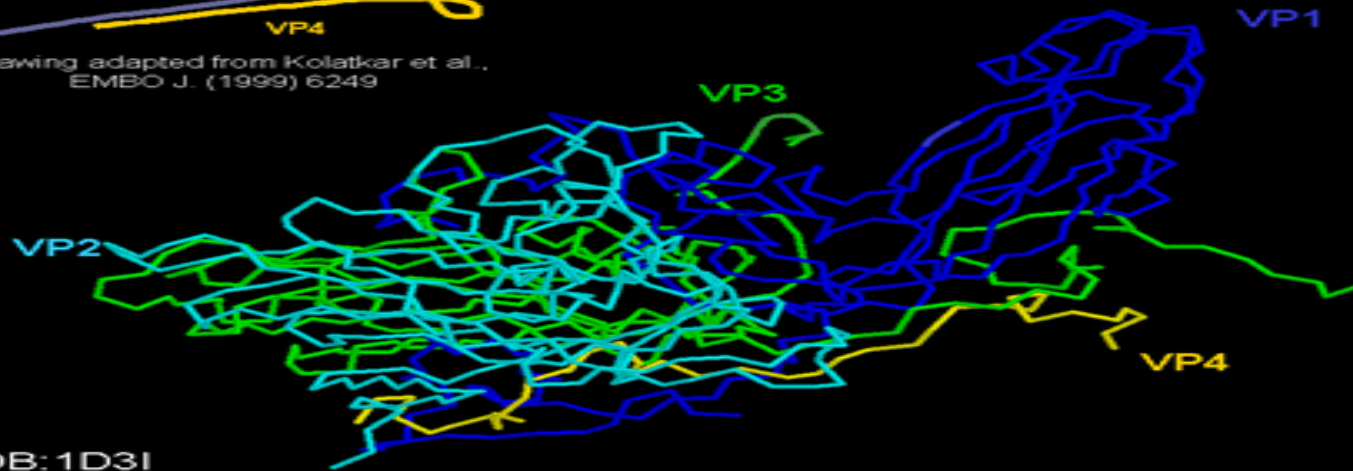
**Προτάθηκε ότι αυτές οι περιοχές είναι προστατευμένες από την αντιγονική πίεση διότι τα μόρια των αντισωμάτων είναι πολύ μεγάλα για να εισέλθουν στη σχισμή . Σημαντικό γεγονός επίσης είναι ότι , ριζικές αλλαγές αμινοξέων σε αυτό το σημείο , παρόλο που θα επέτρεπαν στον ιό να ξεφύγει από μια ανοσολογική απόκριση, μπορούν να διαταράξουν την πρόσδεση του στον υποδοχέα.**



# Rhinovirus (HRV14)

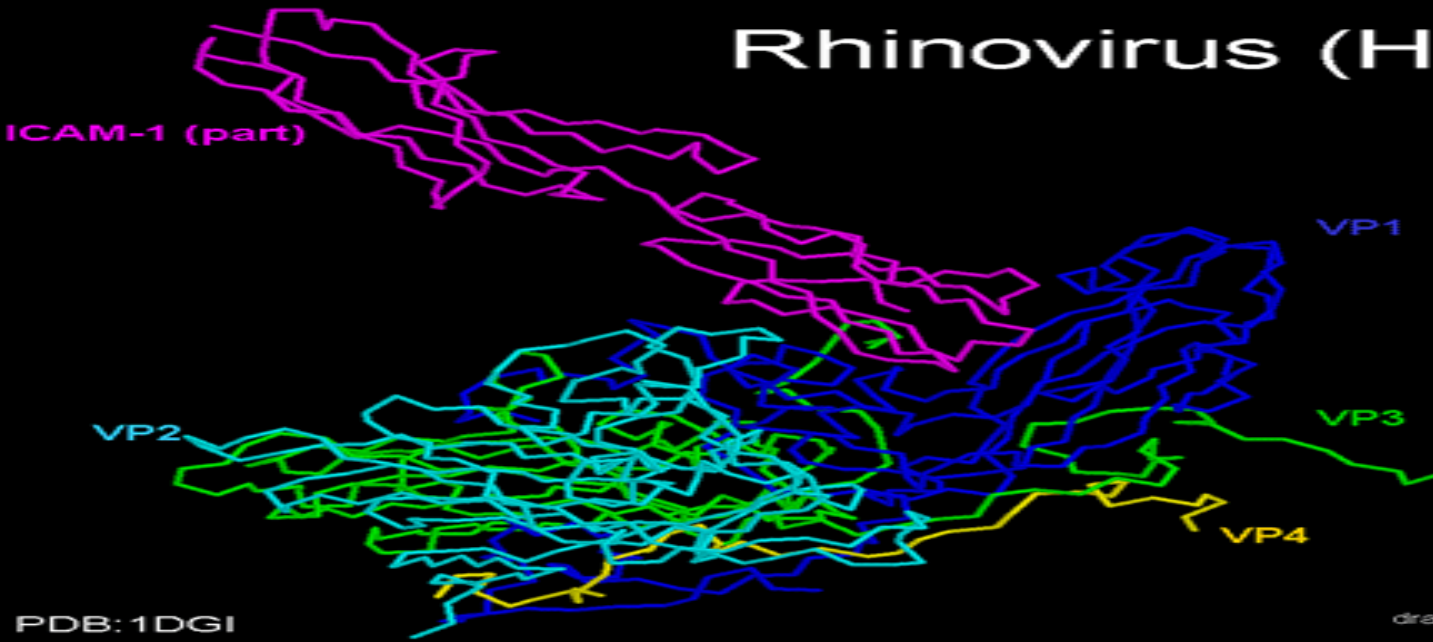


drawing adapted from Kolatkar et al.,  
EMBO J. (1999) 6249

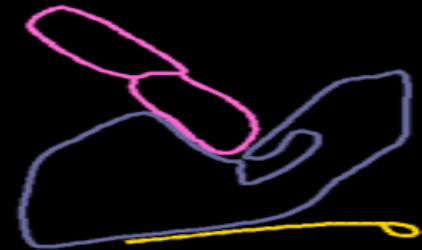


PDB: 1D3I

# Rhinovirus (HRV14)

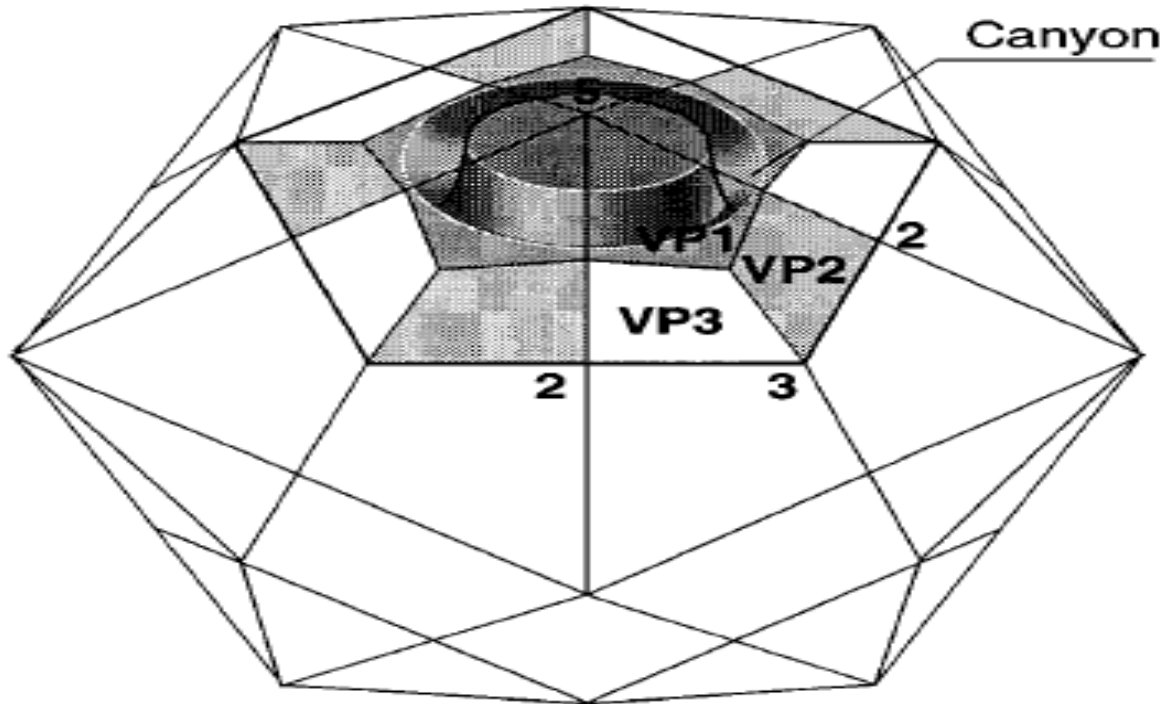


PDB: 1DGI



drawing adapted from Kolatkar et al.,  
EMBO J. (1999) 6249

Στους πολιοιούς, υπάρχει ένα παρόμοιο canyon το οποίο περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας του καψιδίου.



Απεικονίζονται οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς. Επίσης φαίνεται η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας.

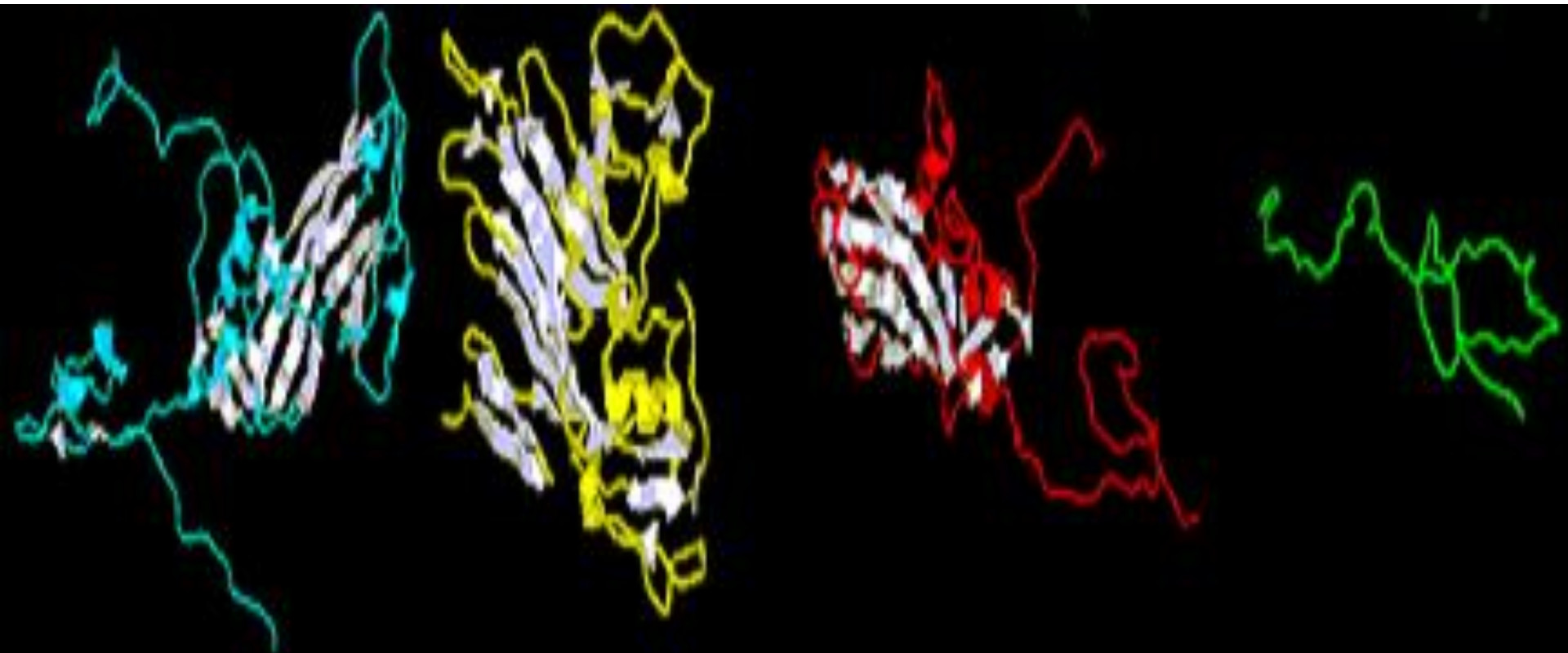
VP1, θαλασσί χρώμα; VP2, κίτρινο χρώμα; VP3, κόκκινο χρώμα; VP4, πράσινο χρώμα. Οι δευτεροταγές δομές των δομικών πρωτεϊνών (οι  $\alpha$ -έλικες και οι θηλιές είναι τονισμένες με διαφορετικό χρώμα για την κάθε δομική πρωτεΐνη ενώ τα  $\beta$ -φύλλα είναι άσπρα)

VP1

VP2

VP3

VP4



**Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 καθώς και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις , οι N-AgI, N-AgII, N-AgIII A και N-AgIII B.**

**Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1. Η N-AgII είναι διακοπτόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 221-226 της VP1 και τα αμινοξέα 164-172, 270 της VP2.**

**Η N-AgIII A αποτελείται από τα αμινοξέα 58-60 και 71-73 της VP3 και τέλος η N-AgIII B από τα αμινοξέα 76-79 της VP3 και το αμινοξύ 72 της VP2.**

**Τα αντισώματα που επάγονται κατά του οροτύπου 1 δεν εξουδετερώνουν 100% την μολυσματικότητα των οροτύπων 2 ή 3 και αντίστροφα .**

**Αντίθετα τα αμινοτελικά άκρα των VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στο εσωτερικό του καψιδίου και σχηματίζουν ένα περίπλοκο δίκτυο με την VP4 η οποία είναι συνδεδεμένη στο αμινοτελικό άκρο της με το μυριστικό οξύ.**

**Μία βαθιά επιφανειακή κοιλότητα που είναι γνωστή ως αύλακα (canyon) περιβάλλει μία προεξοχή σχήματος αστεριού στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας . Αυτή η αύλακα αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού στον κυτταρικό του υποδοχέα .**

**Πολλοί εντεροϊοί προσδένονται στον παράγοντα επιτάχυνσης της αλλοίωσης (decay-accelerating factor) DAF ή CD55 , που είναι μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών ρύθμισης της ενεργότητας του συμπληρώματος. Ο DAF είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συνδεδεμένη στην κυτταρική μεμβράνη μέσω γλυκοσυλιωμένης φωσφοϊνοσιτόλης, που απαντά στη επιφάνεια της πλειοψηφίας των ορο-εκτιθέμενων κυττάρων και τα προστατεύει από τη λύση που προκαλεί το συμπλήρωμα, καθώς επιταχύνει την αποικοδόμηση των μετατροπασών του κλασσικού C3 και C5 μονοπατιού . Ο DAF αποτελείται από 4 μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Short Consensus Repeats-SCR) και από ένα τμήμα πλούσιο σε σερίνη και θρεονίνη, το οποίο συνδέεται με φωσφοϊνοσιτόλη .**

**Διαφορετικές αλληλεπιδράσεις έχουν καταγραφεί κατά την πρόσδεση των εντεροϊών στον DAF. Έτσι ο Coxsackie A21 (CAV-21) και ο Enterovirus 70 (ENV-70) προσδένονται στην απομακρυσμένη από τη μεμβράνη αλληλουχία SCR1 , ενώ όλοι οι Echo ιοί που αλληλεπιδρούν με τον DAF προσδένονται στο SCR3 με κάποιους από αυτούς να αλληλεπιδρούν επιπρόσθετα με την SCR2 και/ή την SCR4 . Παρόλα αυτά, από μόνη της η πρόσδεση των εντεροϊών στον DAF δεν είναι αρκετή για την έναρξη ενός παραγωγικού για τον ιό μολυσματικό κύκλο .**

**Πρόσφατα ανάλυση με κρυομικροσκοπία της αλληλεπίδρασης του ιού Echo 7 με τον DAF, έδειξε ότι ο DAF δεν προσδένεται στην αύλακα, αλλά στην υπερμεταβλητή περιοχή της VP2 ακριβώς έξω από τη «νότια» άκρη της αύλακας καθώς επίσης και σε υπερμεταβλητή περιοχή της VP3 . Επίσης πειράματα κρυομικροσκοπίας έδειξαν ότι ο DAF προσδένεται στον ιό Echo 12 κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων της αλληλουχίας SCR3 με τη VP2 .**

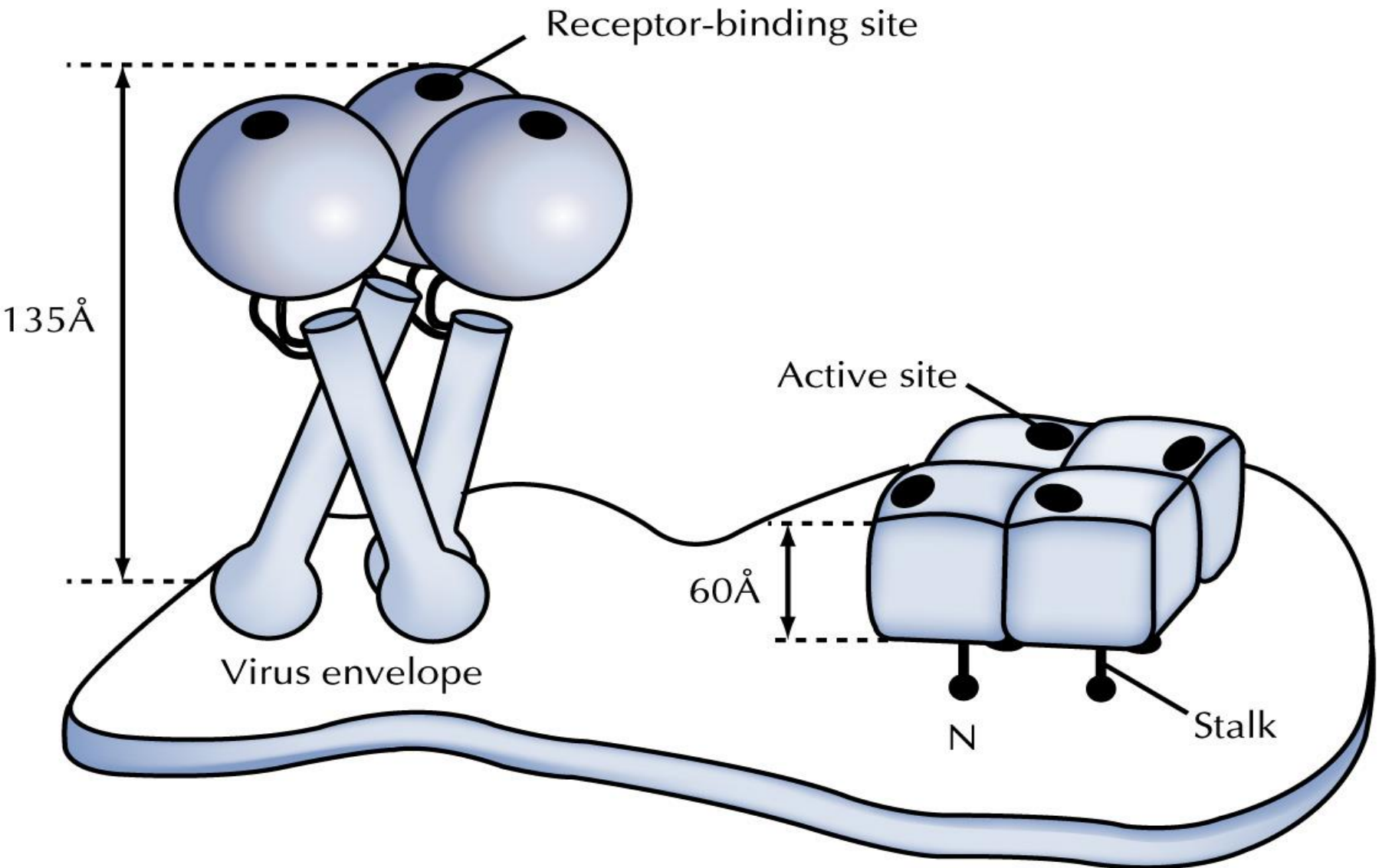
**Κατά συνέπεια η αλληλεπίδραση ενός ιού με έναν μόνο υποδοχέα μπορεί να μην είναι επαρκής για την είσοδό του στο κύτταρο.**

**Έτσι για τον εντεροϊό Coxsackie A21 απαραίτητη είναι η παρουσία τόσο του DAF όσο και του ICAM-1 ως συνυποδοχέων προκειμένου να αρχίσει ένας παραγωγικός για τον ιό μολυσματικός κύκλος . Επίσης κάποιοι Coxsackie B ιοί που προσδένονται στον DAF απαιτούν ως συνυποδοχείς ανβ6-ιντεγκρίνες , ενώ κάποιοι echo-ιοί που χρησιμοποιούν τις α2β1-ιντεγκρίνες ή τον DAF ως υποδοχέα, πιστεύεται ότι απαιτούν ως συνυποδοχέα τη β2-μικροσφαιρίνη .**

**Ένα άλλο καλά μελετημένο παράδειγμα της αλληλεπίδρασης ιού- υποδοχέα είναι αυτό του ιού της Γρίππης ( influenza virus). Η αιμοσυγκολλιλίνη (haemagglutinin) σχηματίζει έναν από τους δυο τύπους των γλυκοπρωτεϊνικών προεξοχών (glycoprotein spikes) στην επιφάνεια του σωματιδίου του ιού της Γρίππης , ενώ ο άλλος τύπος σχηματίζεται από την πρωτεΐνη νευραμινιδάση (neuraminidase). Κάθε προεξοχή αιμοσυγκολλιλίνης αποτελείται από ένα τριμερές των τριών μορίων αιμοσυγκολλιλίνης ( είναι υπεύθυνα για την πρόσδεση στον υποδοχέα του ιού της Γρίππης , ο οποίος είναι το σιαλικό οξύ (N- acetyl neuraminic acid), που συνήθως βρίσκεται σε μια ποικιλία γλυκοσιλιωμένων μορίων , ενώ οι προεξοχές νευραμινιδάσης αποτελούνται από τεραμερή .**

Haemagglutinin (HA) trimer:

Neuramidase (NA) tetramer:



**Ως αποτέλεσμα, υπάρχει μικρή ειδικότητα σχετικά με τον τύπο κυττάρου στον οποίο ο ιός μπορεί να προσδεθεί ( ο ιός προσδένεται σε μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών τύπων κυττάρων π.χ. προκαλεί ακόμη και συγκόλληση των ερυθροκυττάρων) .**

**Το ερυθροκύτταρο δεν είναι ο τύπος ξενιστικού κυττάρου τον οποίο προσβάλλει ο ιός υπό φυσιολογικές συνθήκες, αλλά περιέχει στην επιφάνειά του τον ίδιο τύπο μεμβρανικού συστατικού, το *σιαλικό οξύ*, το οποίο περιέχουν και οι μεμβράνες των κυττάρων του βλεννογόνου της αναπνευστικής οδού.**

**Επομένως, το ερυθροκύτταρο είναι απλώς ένας κατάλληλος τύπος κυττάρου για τη μέτρηση της συγκολλητικής δραστηριότητας.**

**Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό γνώρισμα της αιμοσυγκολλητίνης του ιού της γρίπης είναι ότι το αντίσωμα που αναγνωρίζει την αιμοσυγκολλητίνη *εξουδετερώνει* τον ιό, και αυτός είναι ο μηχανισμός με τον οποίο επέρχεται η ανοσία.**

**Ένας δεύτερος τύπος ακίδας στην επιφάνεια του ιού είναι ένα ένζυμο αποκαλούμενο *νευραμινιδάση*. Η νευραμινιδάση διασπά το σιαλικό οξύ της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Η νευραμινιδάση εμφανίζεται να λειτουργεί πρωτίστως κατά τη διαδικασία συγκρότησης του ιού, καταστρέφοντας το σιαλικό οξύ των μεμβρανών του ξενιστή το οποίο διαφορετικά θα εμπόδιζε τη συγκρότηση του ιού.**



Η προσκόλληση σε κυτταρικούς υποδοχείς είναι στις περισσότερες περιπτώσεις μια αντιστρεπτή διαδικασία. Εάν η διείσδυση των κυττάρων δεν πραγματοποιηθεί τότε ο ιός μπορεί να «εκπλυθεί» από την επιφάνεια του κυττάρου.

Μερικοί ιοί έχουν συγκεκριμένους μηχανισμούς για την «έκπλυση» και η νευραμινιδάση είναι ένας από αυτούς. Η νευραμινιδάση είναι μια εστεράση που διασπά το σιαλικό οξύ. Αυτό είναι ιδιαιτέρως σημαντικό για τον ιό της Γρίπης διότι το μόριο υποδοχέα του ιού είναι ευρύτατα διαδεδομένο και ο ιός τείνει να προσδένεται σε μια ποικιλία κυττάρων ακόμη και σε «συντρίμμια» κυττάρων. Ωστόσο, η έκπλυση από την επιφάνεια του κυττάρου μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα του ιού της Γρίπης οδηγεί σε αλλαγές στερεοδιαμόρφωσης του ιού οι οποίες μειώνουν ή εξαλείφουν την πιθανότητα επικείμενης προσκόλλησης σε άλλα κύτταρα. Έτσι, διάσπαση του σιαλικού οξέος από την νευραμινιδάση αφήνει τις ομάδες αυτές συνδεδεμένες στην ενεργή θέση της αιμοσυγκολλιτίνης, αποτρέποντας την αιμοσυγκολλιτίνη από την πρόσδεση της σε άλλον υποδοχέα.

Η ΗΑ έχει επίσης μια μικρή «τσέπη» η οποία συνδέεται με τον κυτταρικό υποδοχέα για να ξεκινήσει η σύντηξη του ιικού σωματιδίου με το κύτταρο. Σε αυτή την «τσέπη» τα αντισώματα λόγω του μεγάλου μεγέθους τους δεν μπορούν να εισέλθουν, άρα ο ιός ενδέχεται να συνδέεται στον κυτταρικό υποδοχέα του παρουσία αντισωμάτων αρκεί τα αντισώματα αυτά να μην αλλάζουν την στερεοδιαμόρφωση της αιμοσυγκολλιτίνης. Οι αντιγονικοί καθοριστές πάνω στην ΗΑ μπορούν να μεταβάλλονται χωρίς να μεταβάλλεται η σύνδεση του ιού στον υποδοχέα του αρκεί να μην μεταβάλλονται τα αμινοξέα στο εσωτερικό της «τσέπης».

**Στις περισσότερες περιπτώσεις, η έκφραση (ή η απουσία) των υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων καθορίζει τον τροπισμό ενός ιού, δηλαδή τον τύπο του κυττάρου ξενιστή στον οποίο ο ιός μπορεί να αντιγραφεί. Επομένως, αυτό το αρχικό στάδιο της αναγνώρισης του υποδοχέα και της μετέπειτα αντιγραφής του ιού στο κύτταρο ξενιστή θα έχει και σημαντική επίδραση στην παθογένεια του ιού .**

**Όπως ήδη αναφέρθηκε σε ορισμένες περιπτώσεις, αλληλεπιδράσεις με περισσότερες από μια πρωτεΐνες απαιτούνται για την είσοδο του ιού.**

**Ο βασικός υποδοχέας για τον HIV είναι το αντιγόνο CD4 των T – βοηθητικών λεμφοκυττάρων. Απαιτούνται όμως ένας ή περισσότεροι βοηθητικοί παράγοντες επιπρόσθετοι με το CD4 για να σχηματισθεί ένας λειτουργικός HIV υποδοχέας.**

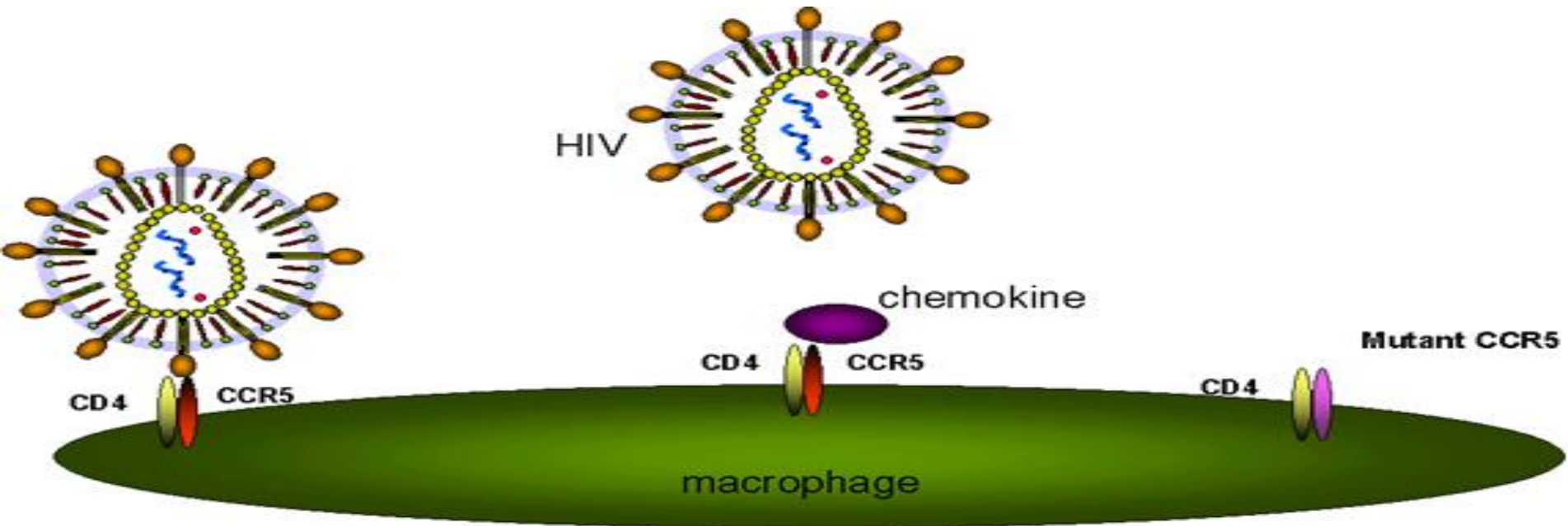
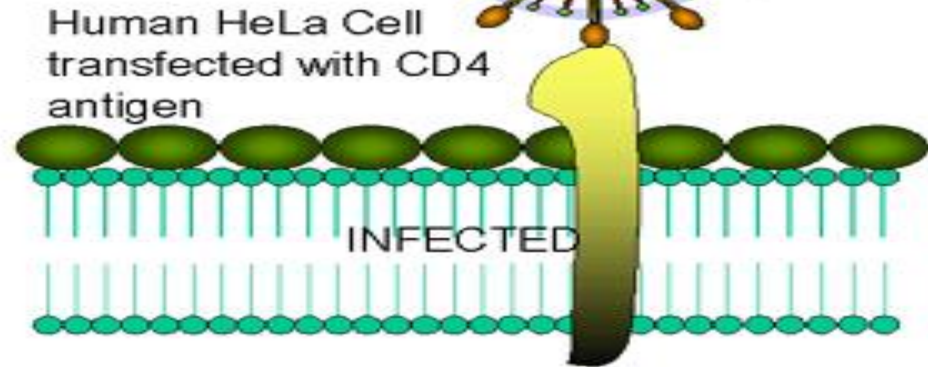
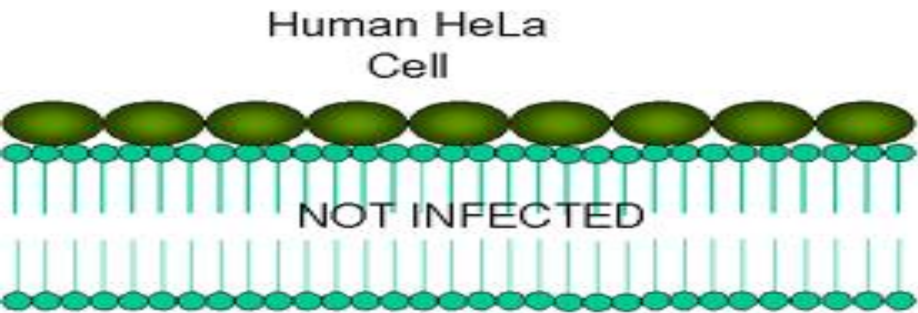
**Αυτοί οι υποδοχείς είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών γνωστή ως β-chemokine . Αρκετά μέλη αυτής της οικογένειας έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην είσοδο του HIV στα κύτταρα, και η κατανομή τους αποτελεί τον τροπισμό του HIV για διαφορετικούς τύπους κυττάρων ( λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, κτλ.). Επιπλέον, είναι προφανές ότι τουλάχιστον σε μερικούς τύπους κυττάρων, η HIV μόλυνση δεν εμποδίζεται με τον ανταγωνισμό διαλυτού CD4, υποδεικνύοντας ότι σε αυτά τα κύτταρα μια διαφορετική στρατηγική για την σύνδεση του ιού με τον υποδοχέα μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Ωστόσο, εάν μια γκάμα CD4- αρνητικών κυττάρων μολυνθεί από τον ιό HIV η μόλυνση θα είναι πολύ λιγότερο αποτελεσματική από ότι η αλληλεπίδραση του ιού με το βασικό του υποδοχέα (CD4 συν β- chemokines).**

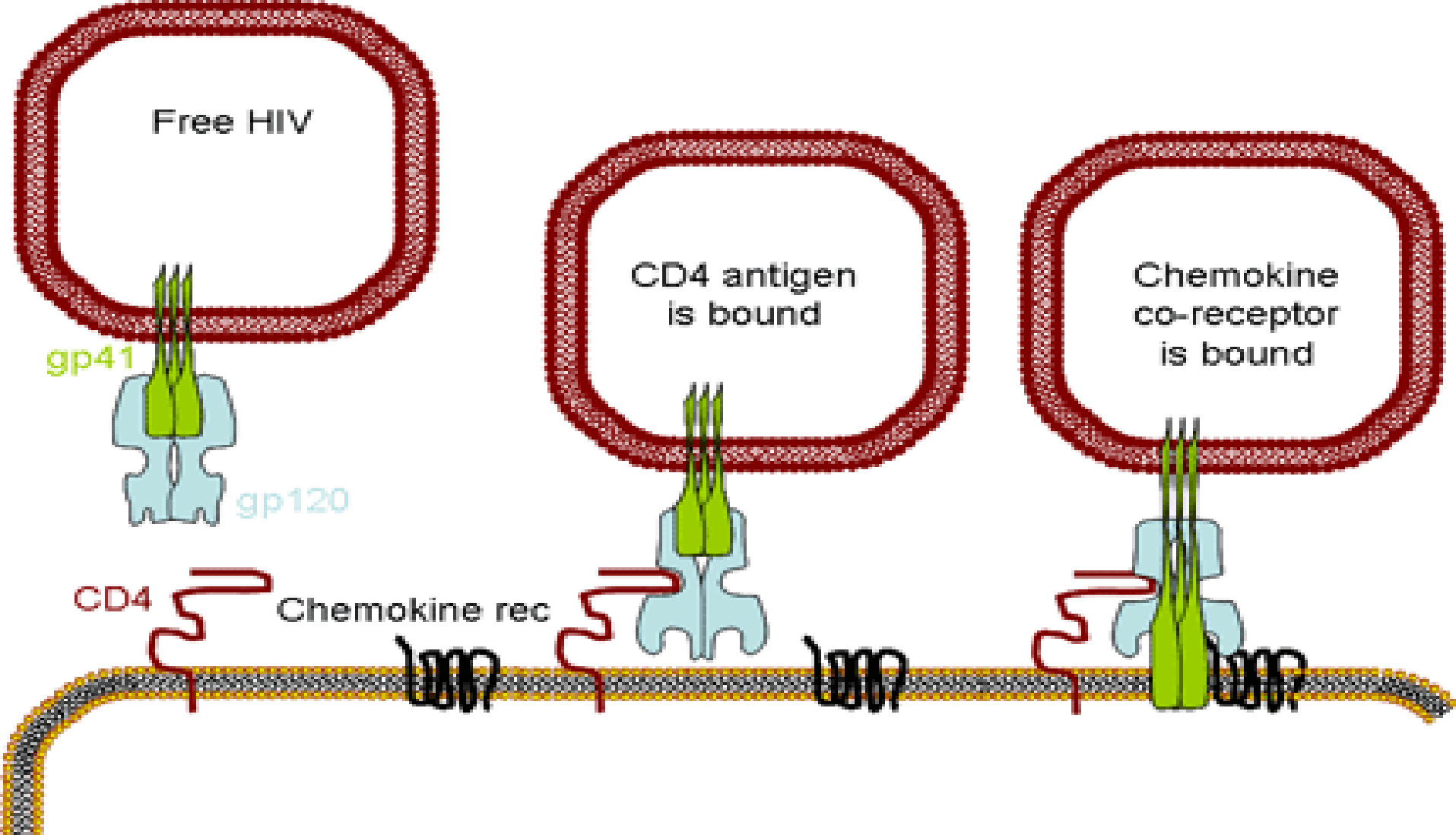
**Για την είσοδο του ιού στο κύτταρο ( μακροφάγο) απαιτείται η σύμπραξη των 2 υποδοχέων ( CD4 & CCR5) .**

**Η προσθήκη διαλυτών Chemokines παρεμποδίζει την είσοδο του ιού όπως και οι μεταλλάξεις του υποδοχέα CCR5**

# Entry into the cell

T4 (CD4+) cells are major target



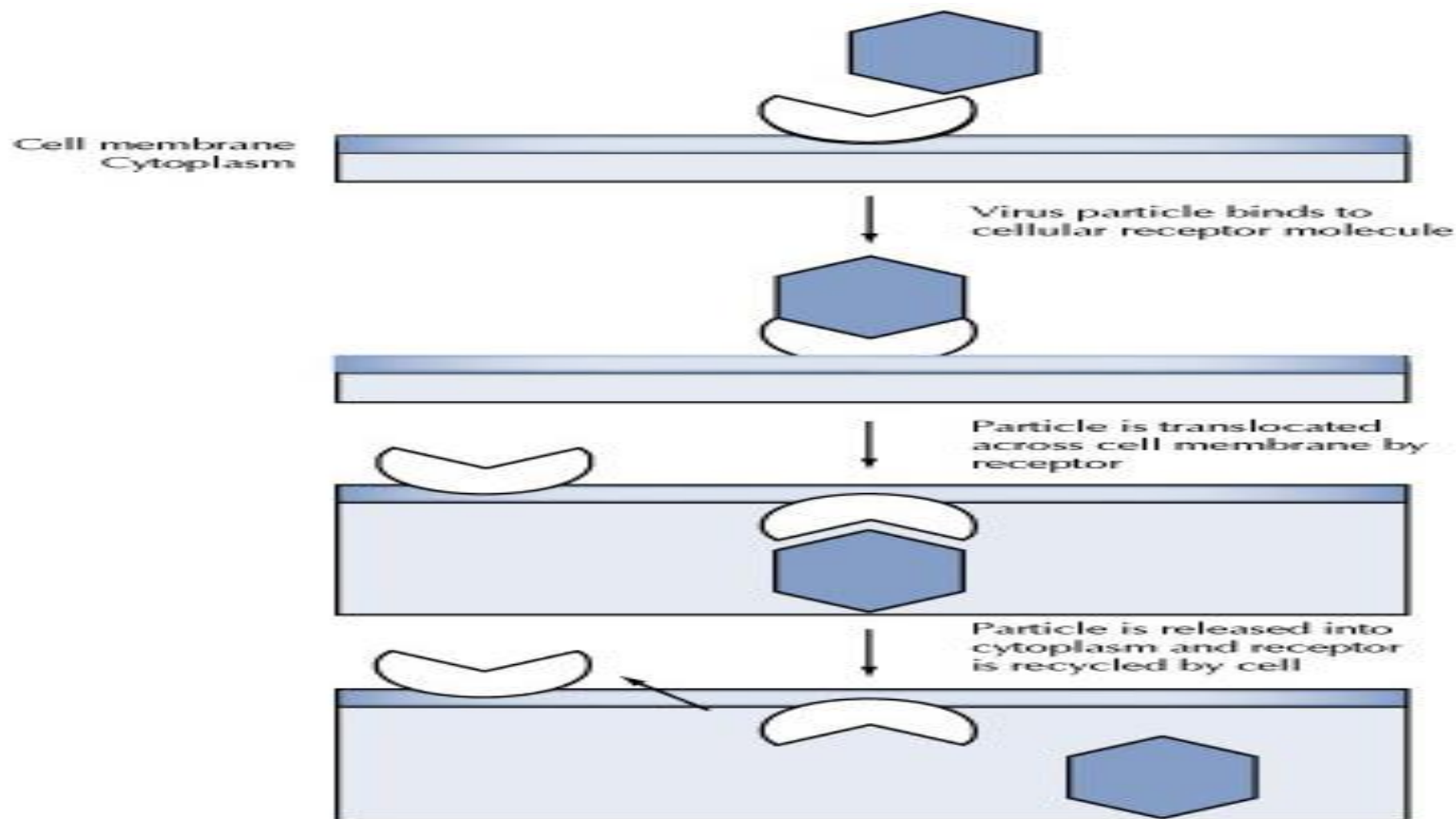


Η σύνδεση της gp120 με το αντιγόνο CD4 αλλάζει την στερεοδιαμόρφωση της gp120 η οποία συνδέεται πάνω στον υποδοχέα των chemokines CCR5 . Η νέα αυτή στερεοδιαμόρφωση ωθεί την gp41 προς την κυτταρική μεμβράνη έτσι ώστε να σχηματισθεί η σύντηξη του ιού με το κύτταρο και ο ιός να εισέλθει στο κύτταρο.

## ΔΙΕΙΣΔΥΣΗ

Η διείσδυση του κυττάρου στόχου φυσιολογικά συμβαίνει λίγη ώρα μετά την προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του στην κυτταρική μεμβράνη. Τρεις κύριοι μηχανισμοί εμπλέκονται:

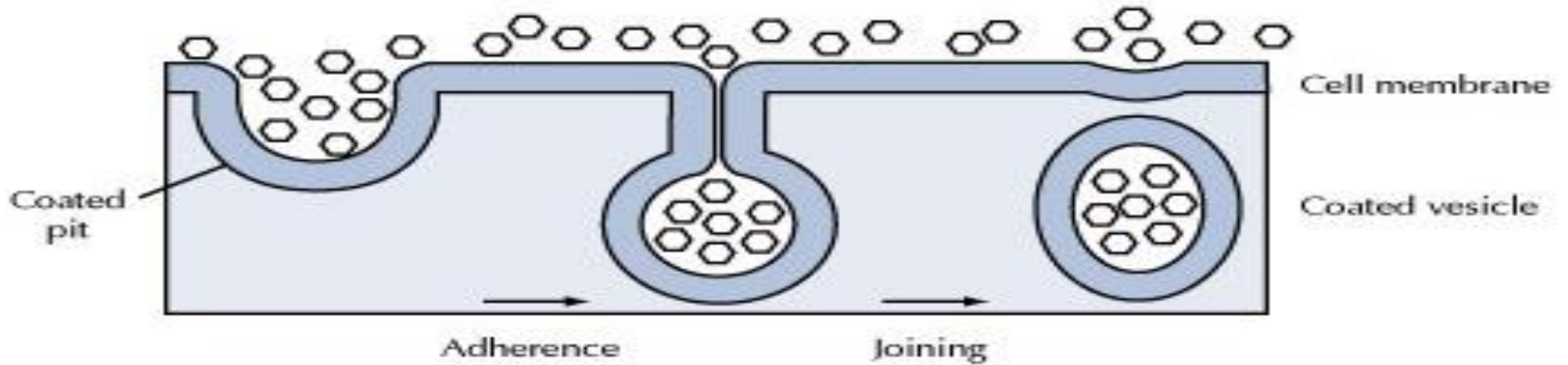
**Μετατόπιση (Translocation) :** Η μετεγκατάσταση ολόκληρου του ιικού σωματιδίου κατά μήκος της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του κυττάρου .  
Αυτή η διαδικασία είναι εξαιρετικά σπάνια μεταξύ των ιών.



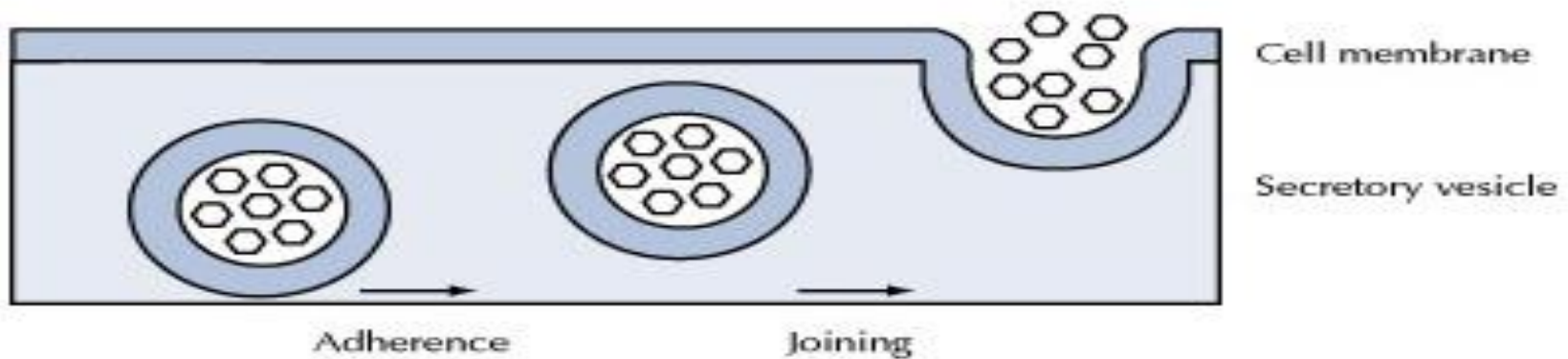
Η ενδοκύτωση του ιού στο ενδοκυτταρικό χώρο .

Αυτός προφανώς είναι ο πιο συνηθισμένος μηχανισμός της εισόδου του ιού στα κύτταρα. Δεν απαιτεί καμία συγκεκριμένη πρωτεΐνη του ιού (άλλες από αυτές που ήδη χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση του στον υποδοχέα).

ENDOCYTOSIS:



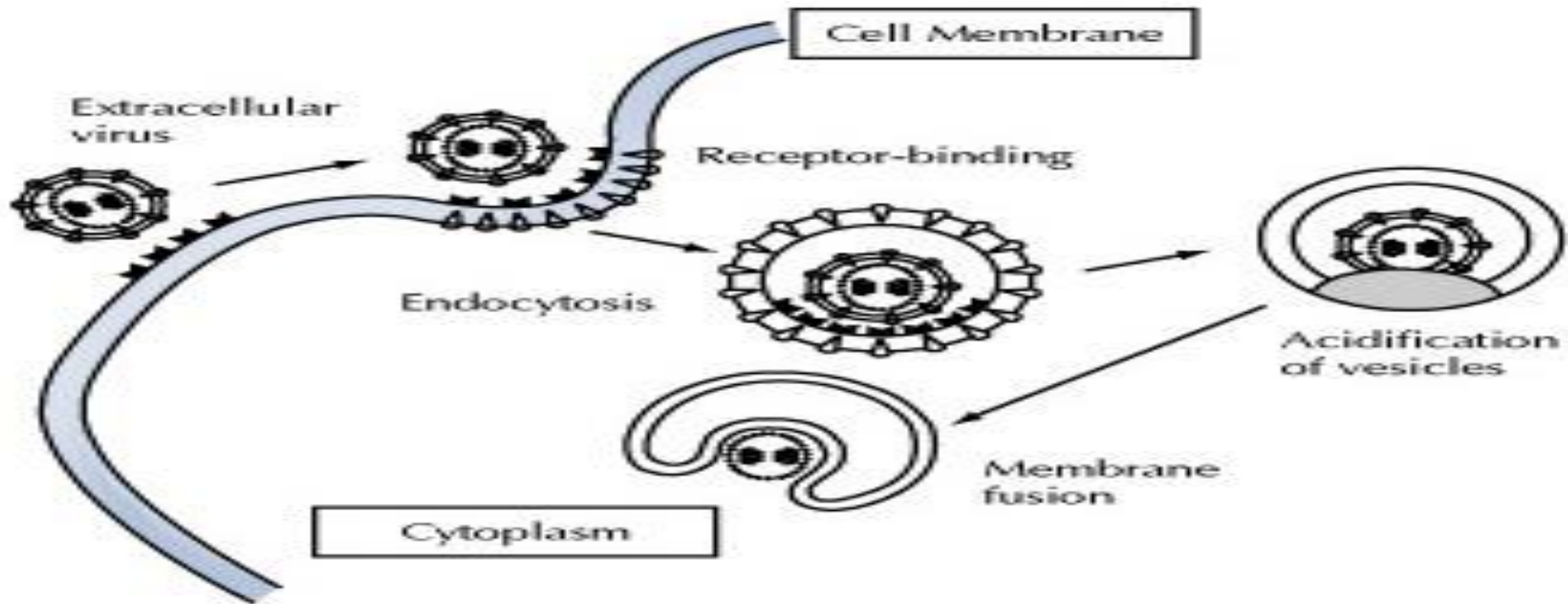
EXOCYTOSIS:



Σύντηξη του εξωτερικού περιβλήματος του ιού ( συναντάται μόνο σε ιούς με εξωτερικά περιβλήματα) με την κυτταρική μεμβράνη, είτε άμεσα στην επιφάνεια του κυττάρου είτε αμέσως μετά την ενδοκύτωση .

Η σύντηξη απαιτεί την παρουσία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης σύντηξης στο εξωτερικό περίβλημα του ιού, π.χ. αιμοσυγκολλιλίνη για την Γρίπη. Οι πρωτεΐνες αυτές προωθούν την σύντηξη των κυτταρικών μεμβρανών και των μεμβρανών του ιού με αποτέλεσμα το νουκλεοκαψίδιο να απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα.

Υπάρχουν δυο τύποι σύντηξης της μεμβράνης:  
pH-εξαρτώμενη και  
pH-ανεξάρτητη.



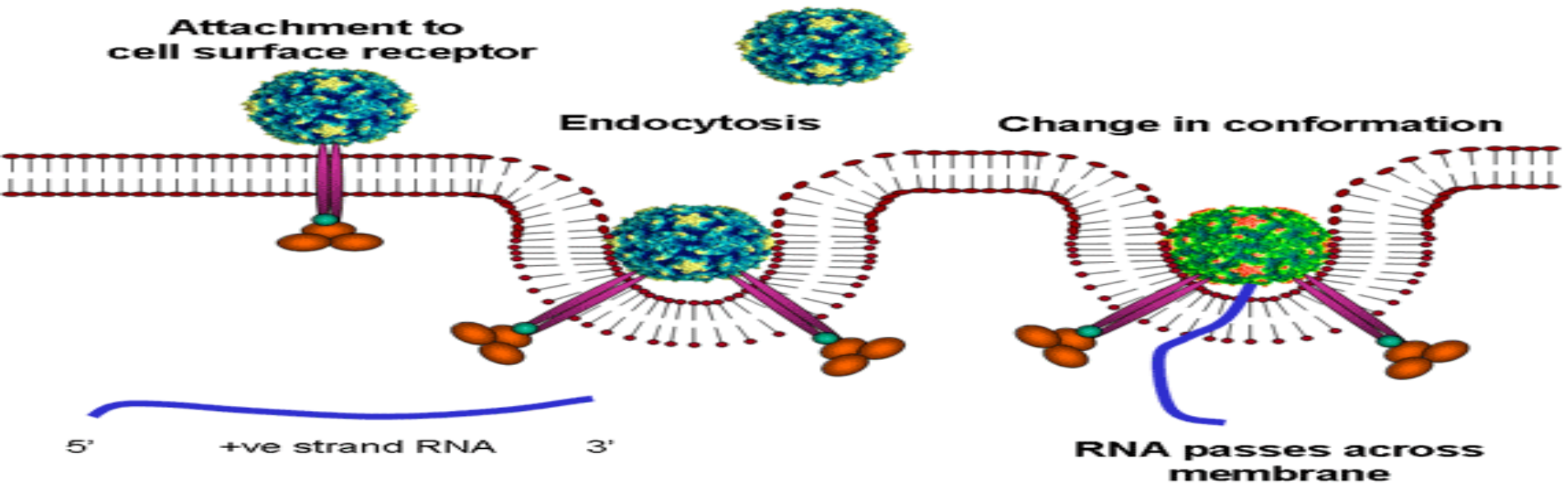


Η διάρκεια ζωής των ιικών σωματιδίων εντός αυτών των αρχικών κυστιδίων είναι πολύ μικρή. Μέσα σε λίγα λεπτά, τα κυστίδια συντήκονται με τα λυσοσωμάτια, το περιβάλλον μετατρέπεται σε όξινο και η συγκέντρωση των πρωτεολυτικών ενζύμων αυξάνεται. Αυτό σημαίνει ότι ο ιός πρέπει να εγκαταλείψει το κυστίδιο και να μπει στο κυτταρόπλασμα πριν την αποδόμηση των πρωτεϊνών του.

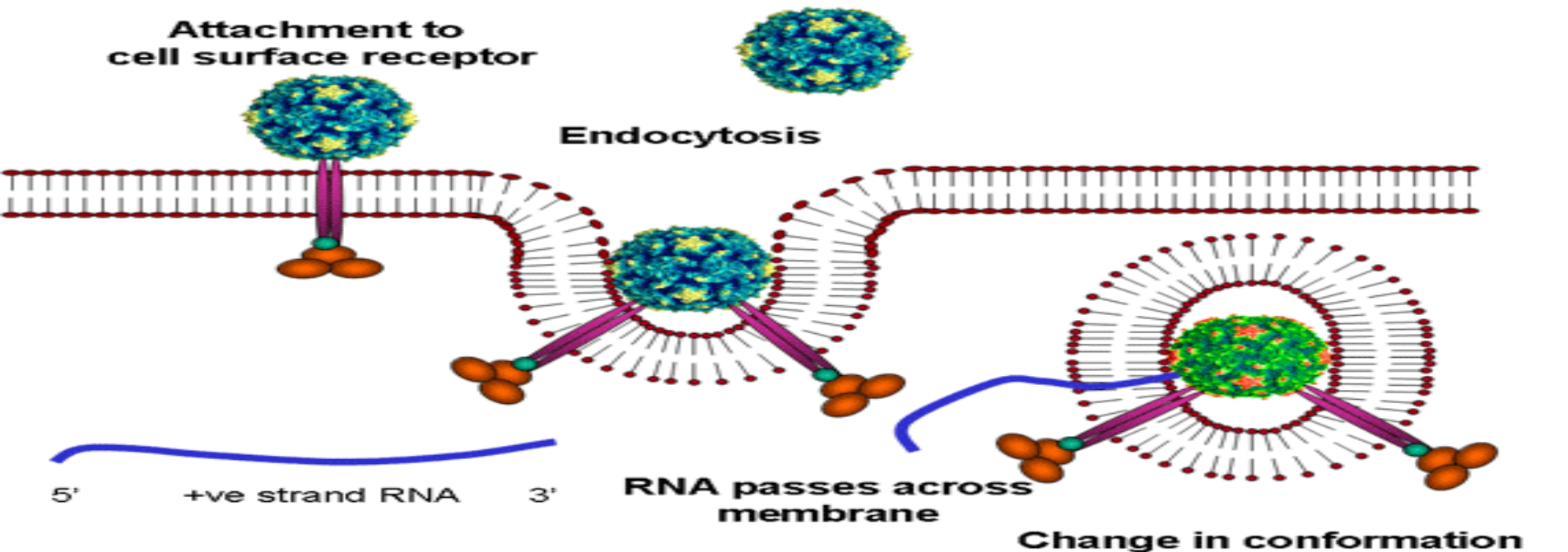
Για τους εντεροϊούς έχουν προταθεί τα ακόλουθα 2 μοντέλα διείσδυσης στο κύτταρο ξενιστή :

α) μέσω ενδοκύττωσης και αλλαγής της στερεοδιαμόρφωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα και

β) μέσω ενδοκύττωσης, εγκλεισμού του νουκλεοκαψιδίου σε κυστίδιο (ενδόσωμα), αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης των καψιδιακών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του θετικής πολικότητας RNA στο κυτταρόπλασμα μέσω του ενδοσώματος.



Adapted from S.J Flint et al. Principles of Virology (2004)  
Virus structure: J Y Sgro



Adapted from S.J Flint et al. Principles of Virology (2004)  
Virus structure: J Y Sgro

## Παραδείγματα κυτταρικών υποδοχέων και ιϊκών πρωτεϊνών οι οποίες εμπλέκονται στην αναγνώριση του κυτταρικού υποδοχέα και την διείσδυση του ιού στο κύτταρο ξενιστή .

Virus	Cell receptor	Virus protein(s) involved in	
		attachment to receptor	fusion
<b>Naked viruses</b>			
Approx. 90% of human rhinoviruses	Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	VP1 + VP3	
Approx. 10% of human rhinoviruses	Low-density lipoprotein receptors	VP1	
Poliovirus	CD155	VP1	
<b>Enveloped viruses</b>			
Murine leukaemia viruses	Mouse cationic amino acid transporter	SU (surface glycoprotein)	TM (transmembrane glycoprotein)
HIV-1	CD4	gp120	gp41
Influenza viruses A & B	Sialic-acid-containing glycoproteins	Haemagglutinin	Haemagglutinin
Measles virus	Signalling lymphocyte activation molecule (CD150)	Haemagglutinin	Fusion

Η απελευθέρωση των σωματιδίων του ιού από τα ενδοσώματα στο κυτταρόπλασμα είναι στενά συνδεδεμένη με την διαδικασία της απέκδυσης (uncoating).

## ΑΠΕΚΔΥΣΗ

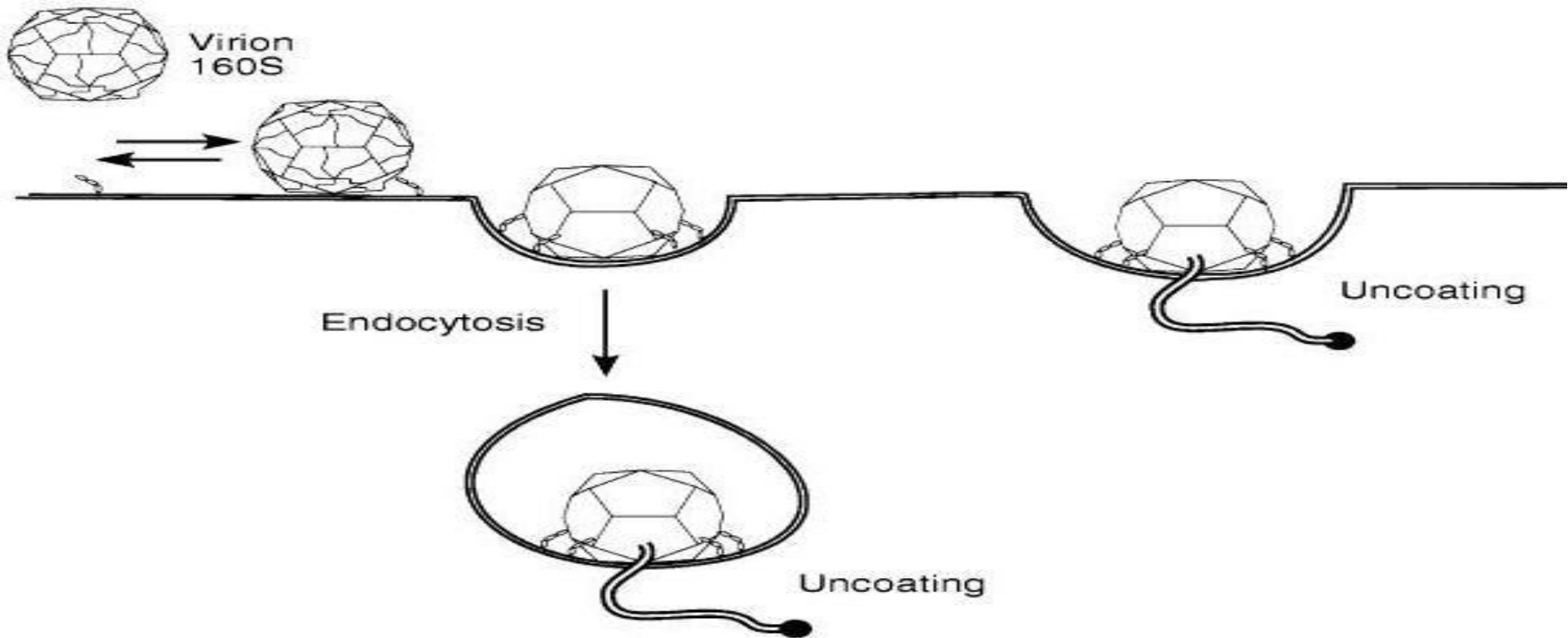
Η απέκδυση είναι ένας γενικότερος όρος για τα γεγονότα που συμβαίνουν μετά την διείσδυση του ιού στο κυτταρόπλασμα όπου το καψίδιο του ιού έχει αφαιρεθεί τουλάχιστον μερικώς και το γένωμα του ιού είναι τουλάχιστον μερικώς απελευθερωμένο από το καψίδιο συνήθως με την μορφή ενός συμπλέγματος νουκλεοπρωτεΐνης.

Κατά μια έννοια, η μετακίνηση του εξωτερικού περιβλήματος του ιού η οποία συμβαίνει κατά την διάρκεια της σύντηξης της μεμβράνης είναι μέρος της διαδικασίας του uncoating. Τα αρχικά γεγονότα στο uncoating συμβαίνουν μέσα στα ενδοσώματα και η αλλαγή του pH καθώς το ενδόσωμα οξύνεται συμβάλλει τα μέγιστα .

Η ενδοκύτωση εμπεριέχει μερικούς κινδύνους για τους ιούς διότι εάν παραμείνουν στο κυστίδιο για πάρα πολύ καιρό θα καταστραφούν αμετάκλητα από την όξυνση ή και από τα πρωτεολυτικά ένζυμα των λυσοσωμάτων.

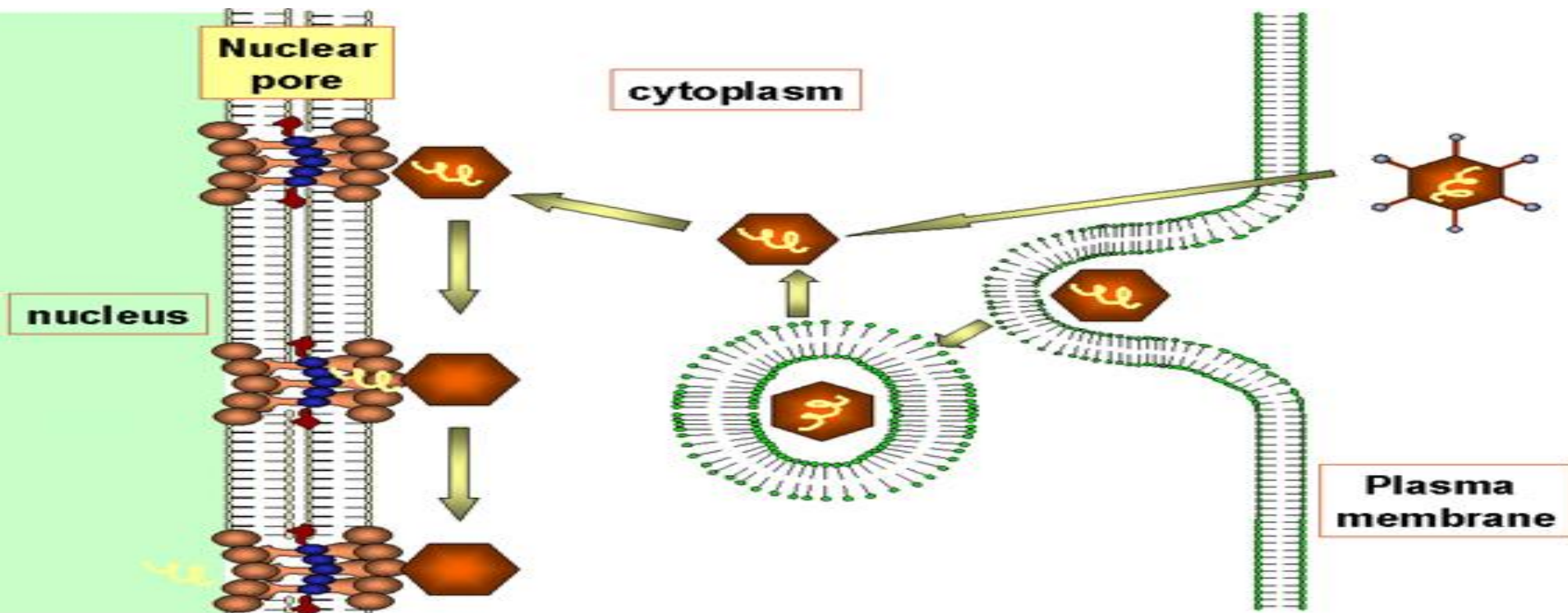
**Η αλληλεπίδραση των πολιοϊών με τον υποδοχέα τους, PVR, οδηγεί το καψίδιο σε δομικές αλλαγές. Σχηματίζονται τα *A σωμάτια* τα οποία περιέχουν το ιϊκό RNA, έχουν όμως χάσει την εσωτερική καψιδική πρωτεΐνη VP4. Επιπρόσθετα, το N-τελικό άκρο της VP1 που κανονικά βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου, έρχεται στην επιφάνεια του *A σωματίου* . Αυτή η αλληλουχία της VP1 είναι υδρόφοβη και έτσι τα *A σωμάτια* έχουν αυξημένη συγγένεια με τις μεμβράνες σε σύγκριση με το φυσιολογικό ιϊκό σωματίο. Έτσι σύμφωνα με μια υπόθεση εισόδου των πολιοϊών στο κύτταρο, η πρόσδεση στον υποδοχέα οδηγεί στις παραπάνω δομικές αλλαγές :**

το εκτεθειμένο λιπόφιλο N-τελικό άκρο της VP1 εισέρχεται στην κυτταρική μεμβράνη, σχηματίζοντας έναν πόρο διαμέσου του οποίου το RNA ταξιδεύει προς το κυτταρόπλασμα . Τα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία A σωμάτια όταν προστεθούν σε λιπιδική διπλοστιβάδα, επάγουν τη δημιουργία ιοντικών καναλιών, ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση . Αν και πιστεύεται ότι το RNA των πολιοϊών διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη, δεν είναι γνωστό αν αυτό συμβαίνει μέσω της πλασματικής ή της ενδοσωματικής μεμβράνης.



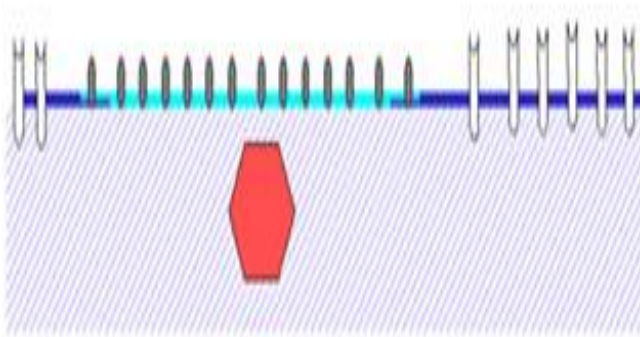
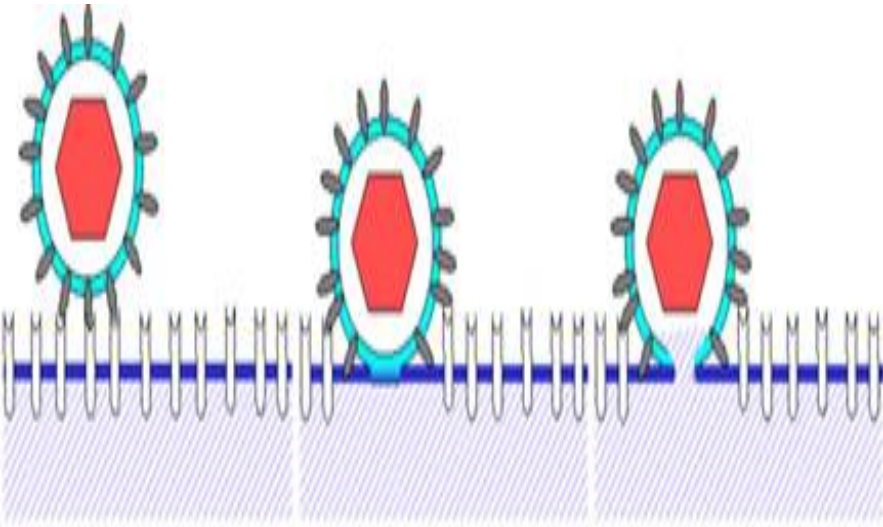
Το ιόσωμα προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα και υφίσταται τις αλλαγές στη διαμόρφωση που προκαλούν την παραγωγή των A σωματίων τα οποία είναι υδρόφοβα και έχουν χάσει τη VP4 καψιδική πρωτεΐνη. Το N-τελικό άκρο της VP1 έχει μεταφερθεί στην επιφάνεια και το ιικό RNA (καμπυλοειδής γραμμή), εξέρχεται από το σωμάτιο είτε από την πλασματική μεμβράνη, είτε διαμέσου των ενδοσωμάτων.

Τα καψίδια των herpesvirus, adenovirus και polyomavirus υφίστανται δομικές αλλαγές μετά την διείσδυση, αλλά γενικά παραμένουν σχεδόν άθικτα. Αυτά τα καψίδια περιέχουν αλληλουχίες οι οποίες είναι υπεύθυνες για την προσκόλληση στο κυτταροσκελετό και αυτή η αλληλεπίδραση επιτρέπει την μεταφορά ολόκληρου του καψιδίου προς τον πυρήνα του κυττάρου στους πόρους του οποίου συμβαίνει η απέκδυση (uncoating) και το DNA περνά στο πυρήνα.



Ο Αδενοϊός εισέρχεται στο κύτταρο ξενιστή μέσω ενδοκύττωσης, απελευθερώνεται από τα ενδοσώματα και το νουκλεοκαψίδιο του μεταφέρεται προς τον πυρήνα του κυττάρου στους πόρους του οποίου συμβαίνει η απέκδυση (uncoating) και το DNA του ιού περνά τελικά στον πυρήνα.

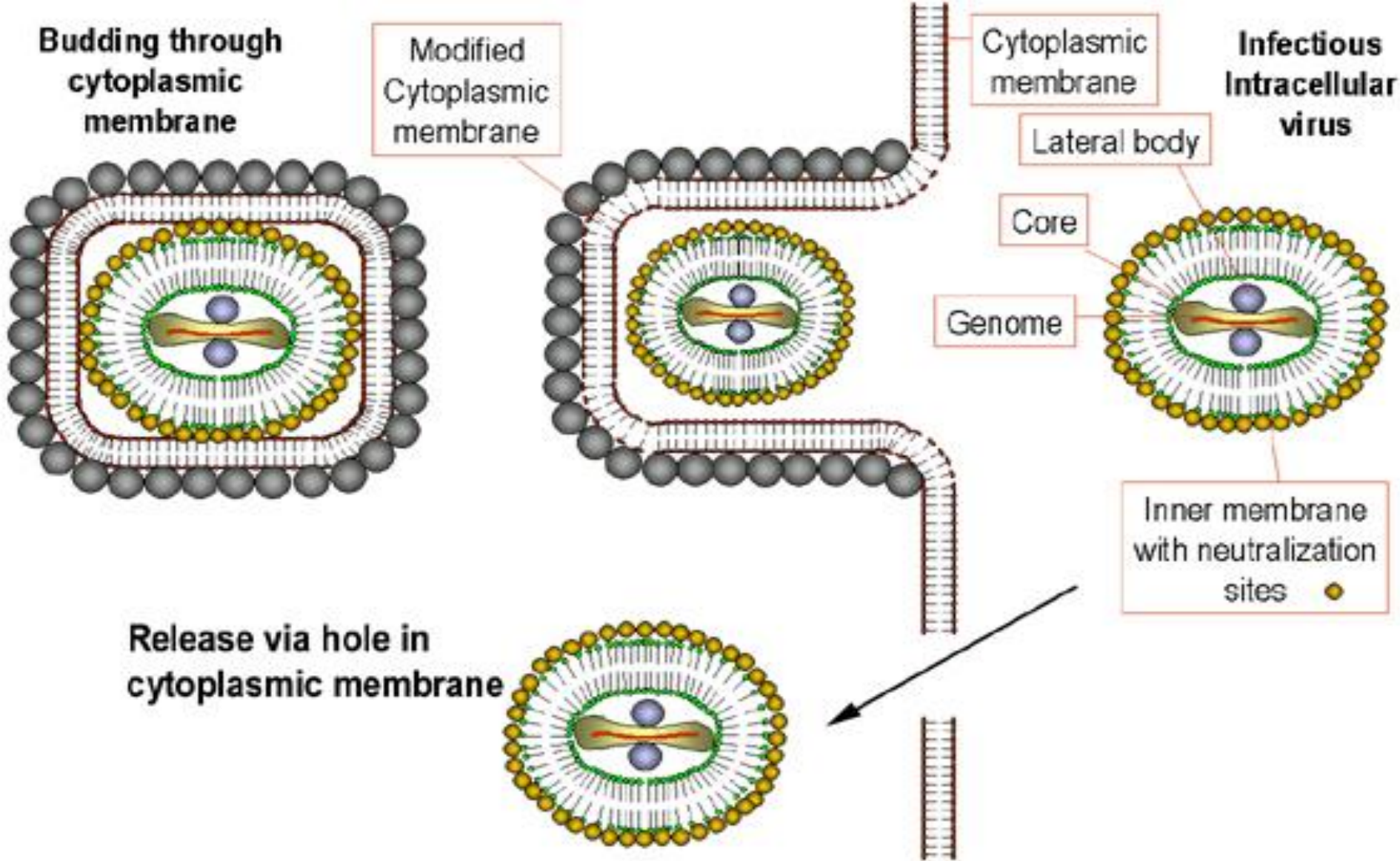
Στους ερπητοϊούς ο ιός εισέρχεται μέσω σύντηξης στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και το νουκλεοκαψίδιό του ταξιδεύει προς τον πυρήνα όπου τελικά το DNA του ιού θα περάσει μέσω των πυρηνικών πόρων στον πυρήνα.



herpesviruses, paramyxoviruses, HIV



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



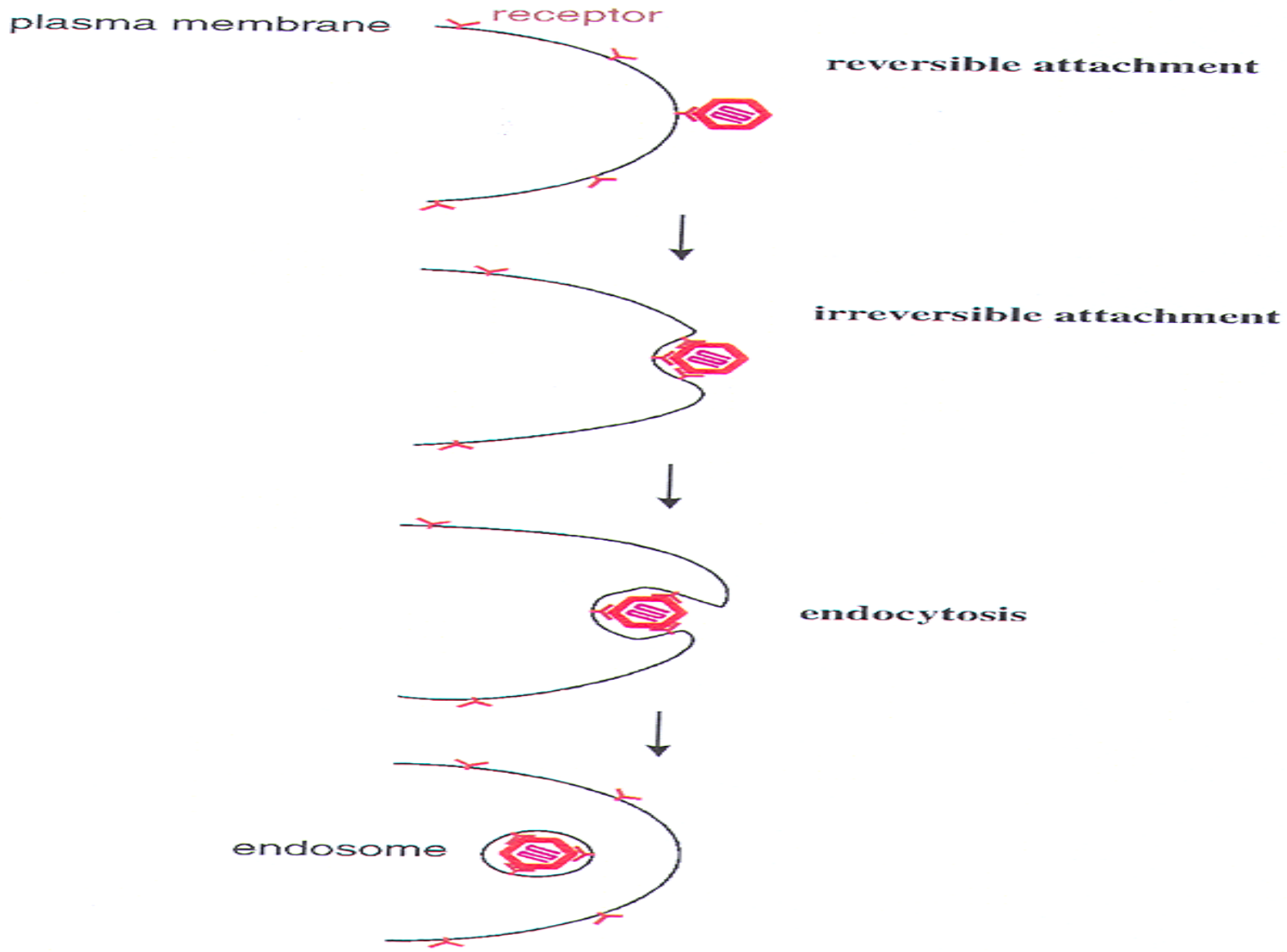
**POX**

**IOI**



Παρακάτω παρουσιάζονται σχηματικά η διείσδυση των ιών που δεν φέρουν περίβλημα (A) και των ιών με περίβλημα (B).

A)



**B)**

plasma membrane

receptor

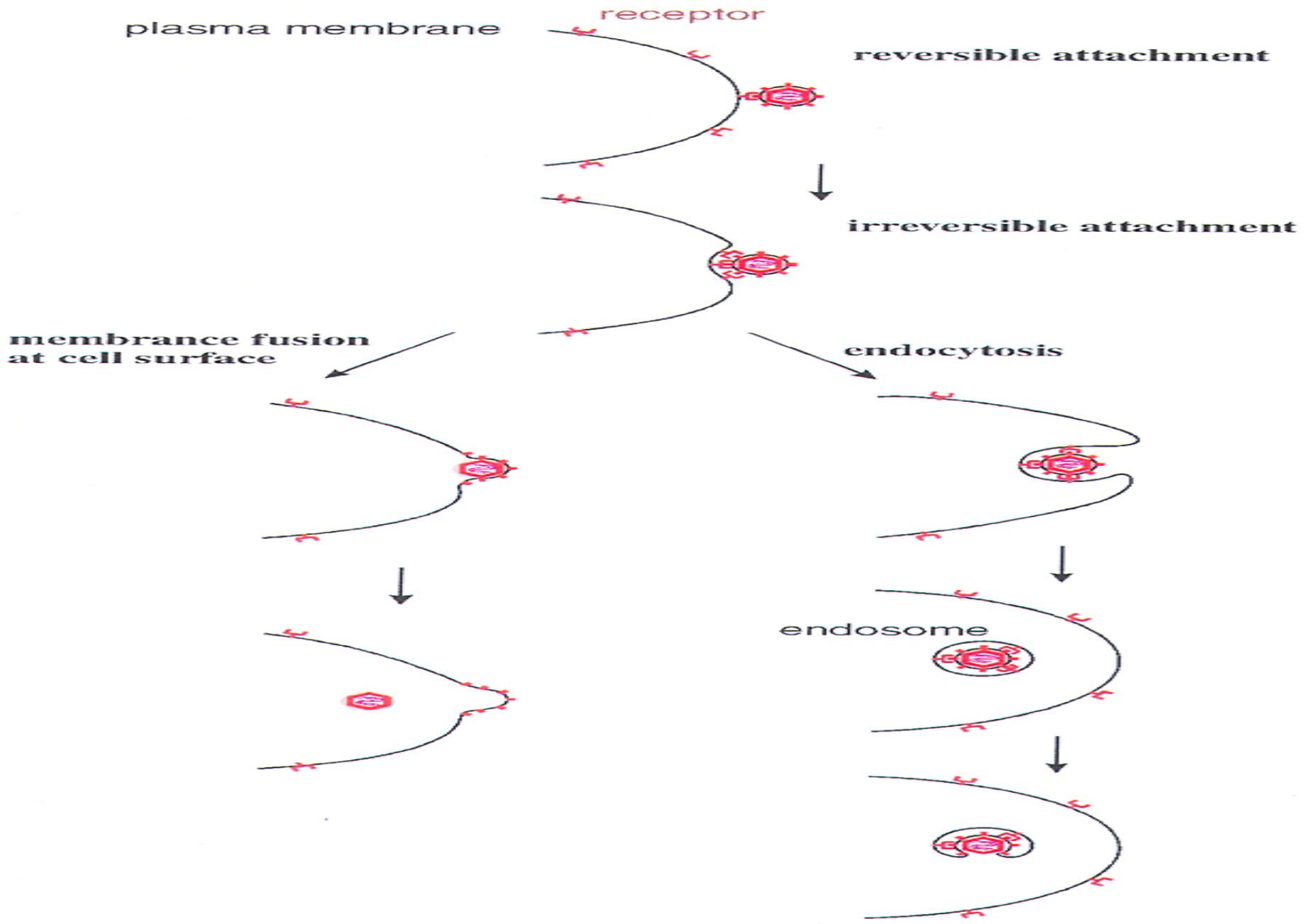
**reversible attachment**

**irreversible attachment**

**membrane fusion at cell surface**

**endocytosis**

**endosome**



# ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

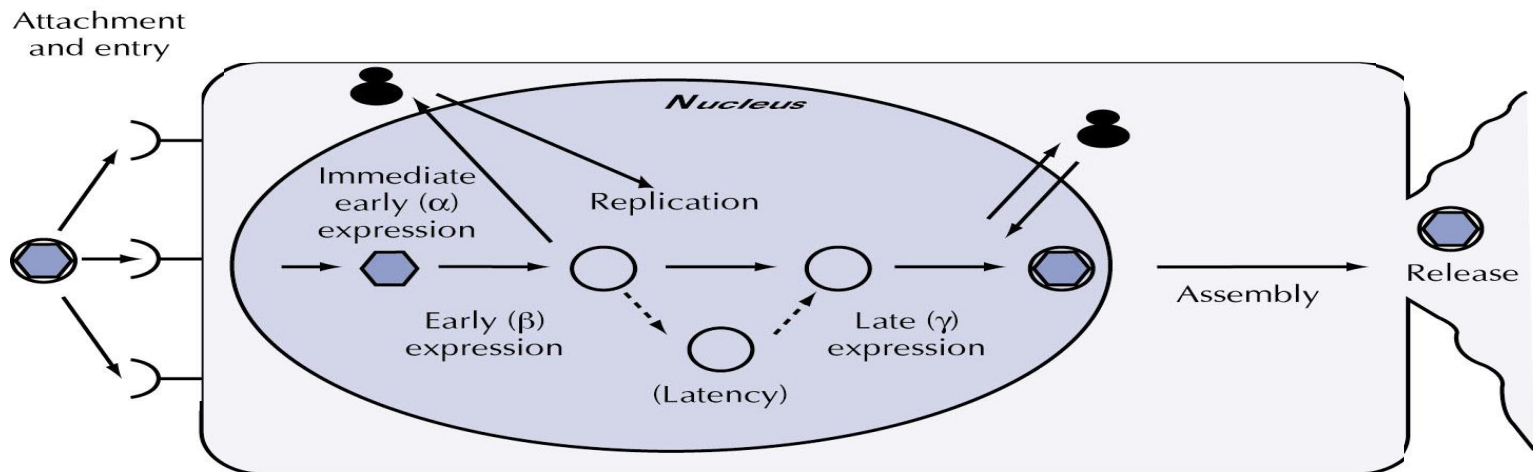
Η στρατηγική της αντιγραφής του κάθε ιού εξαρτάται από την φύση του γενετικού του υλικού. Σε αυτήν την βάση , όλοι οι ιοί μπορούν να διαιρεθούν σε επτά ομάδες σύμφωνα με την πρόταση του **David Baltimore** το 1971.

Μια σχηματική άποψη για τα βασικά γεγονότα κατά την διάρκεια της αντιγραφής των διαφορετικών ιικών γενωμάτων παρουσιάζονται στα κατωτέρω σχήματα .

**Τάξη I: Δίκλωνο DNA.** Αυτή η τάξη μπορεί να υποδιαιρεθεί σε δυο περαιτέρω ομάδες:

(α) Η αντιγραφή είναι εξ' ολοκλήρου πυρηνική. Η αντιγραφή αυτών των ιών είναι σχετικά εξαρτημένη από τους κυτταρικούς παράγοντες.

## Class I: Double-stranded DNA

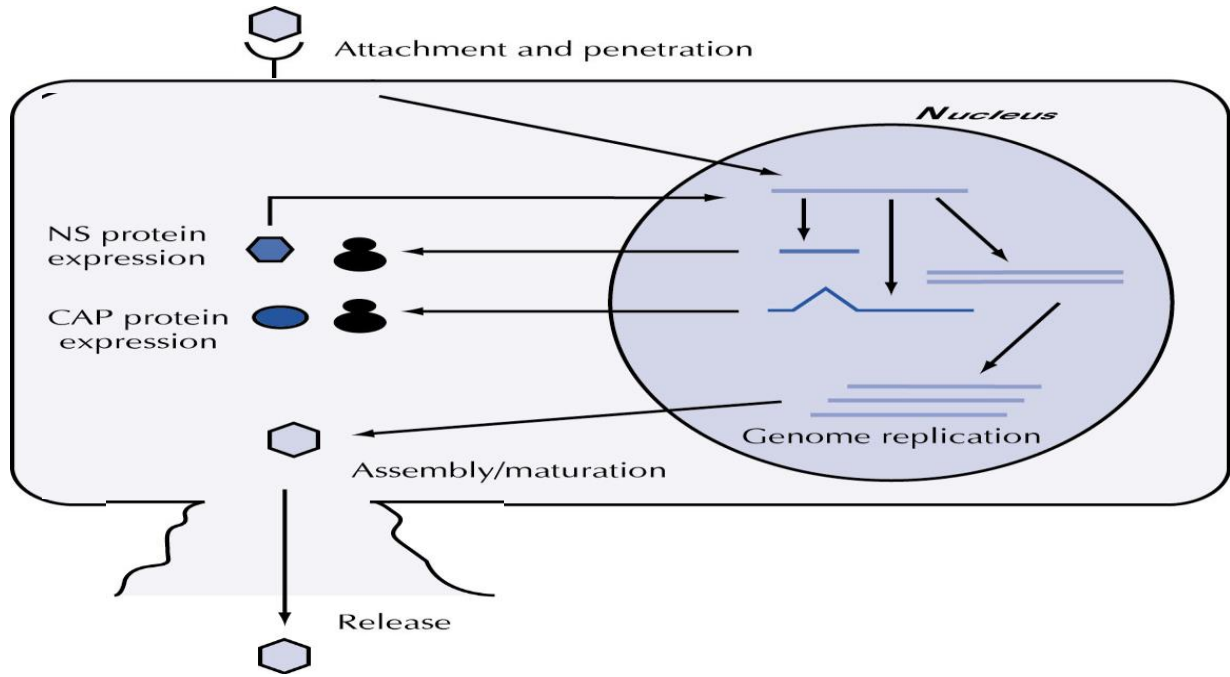


(β) Η αντιγραφή συμβαίνει στο κυτταρόπλασμα (Poxviridae). Αυτοί οι ιοί έχουν αναπτύξει (ή αποκτήσει) όλους τους απαραίτητους παράγοντες για την αντιγραφή και την μεταγραφή των γενωμάτων τους και επομένως είναι σχετικά ανεξάρτητοι από τους κυτταρικούς μηχανισμούς.

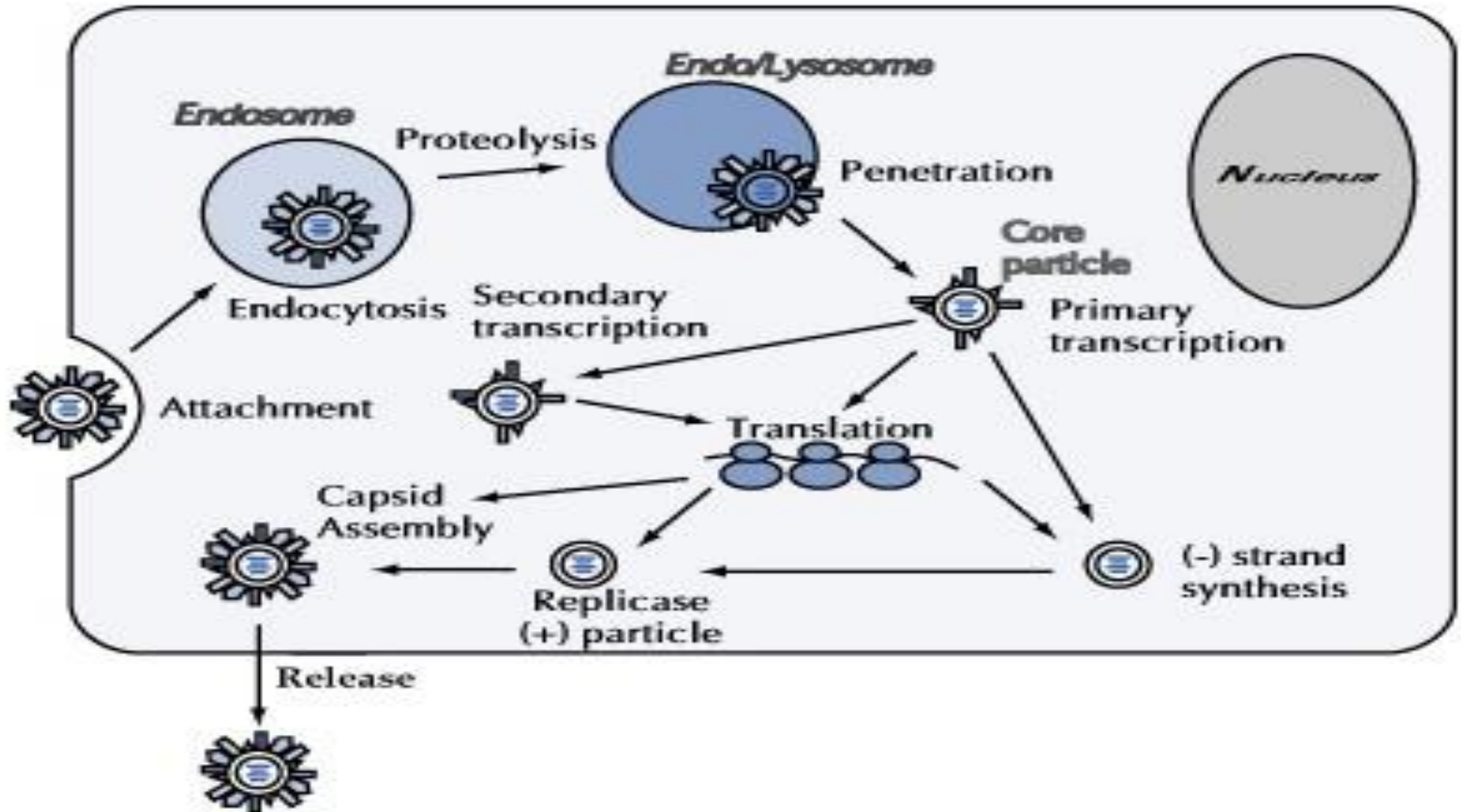
Τάξη II: Μονόκλωνο DNA . Η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στον πυρήνα, που περιλαμβάνει τον σχηματισμό ενός ενδιάμεσου δίκλωνου μορίου DNA το οποίο λειτουργεί ως μήτρα για την σύνθεση του μονόκλωνου DNA και το οποίο θα περιέχεται εντός του νουκλεοκασιδίου

# Class II: Single-stranded DNA

- Replication occurs in the nucleus, involving the formation of a double-stranded intermediate which serves as a template for the synthesis of single-stranded progeny DNA:

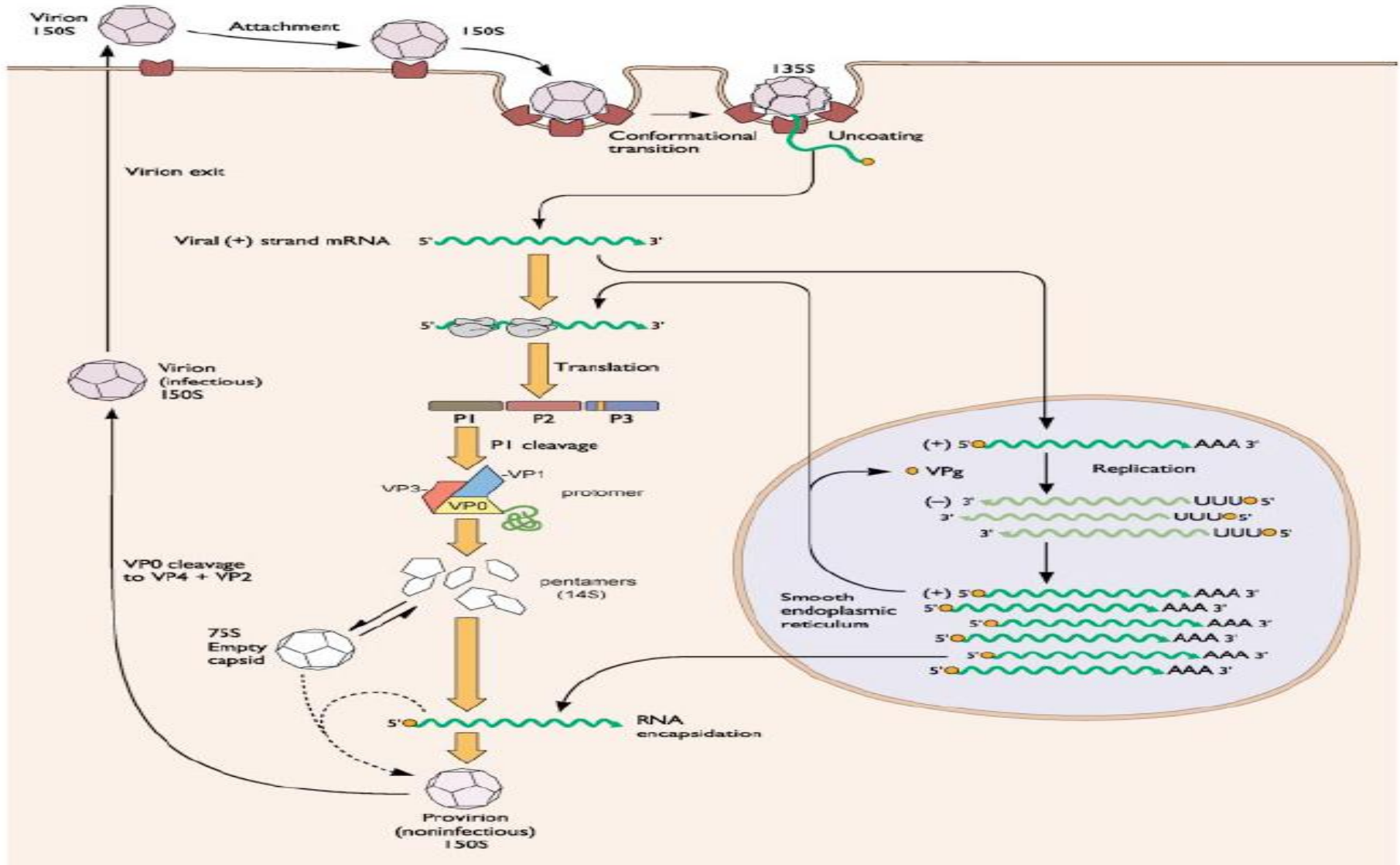


Τάξη III: Δίκλωνο RNA . Αυτοί οι ιοί έχουν τεμαχισμένα γενώματα (segmented genomes). Κάθε τεμάχιο μεταγράφεται ξεχωριστά για την παραγωγή ξεχωριστών επίσης μονοκιστρονικών (monocistronic) mRNAs.



Τάξη IV: Μονόκλωνο (+) πολικότητας RNA. Υποδιαιρούνται σε δυο ομάδες:  
(α).

Το RNA γένωμα σχηματίζει το mRNA. Αυτό μεταφράζεται για να σχηματίσει μια πολυπρωτεΐνη η οποία ακολούθως διασπάται για να σχηματίσει τις ώριμες πρωτεΐνες.

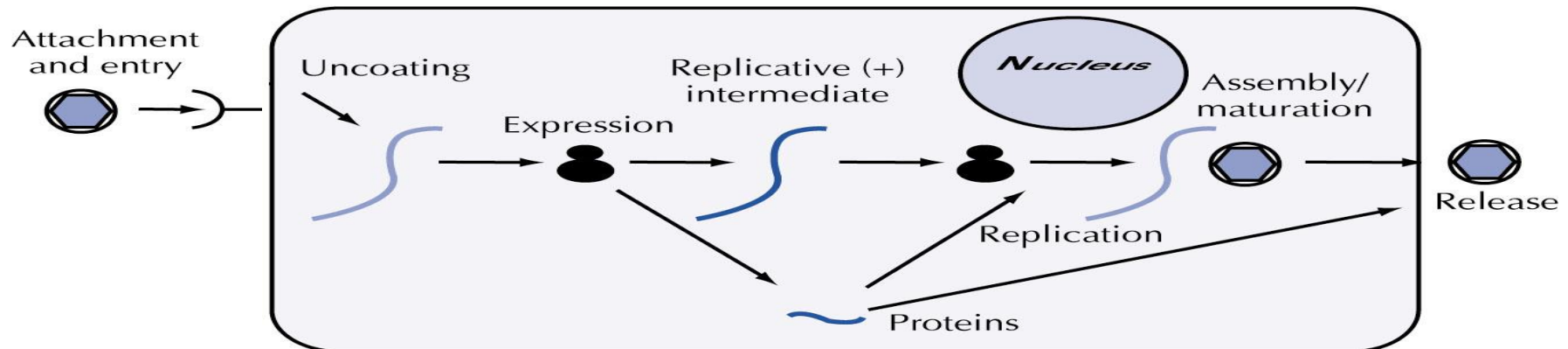


(β). Ιοί με σύνθετη μεταγραφή. Δυο γύροι μετάφρασης (π.χ, Togavirus) είναι απαραίτητοι για την παραγωγή του γενωμικού RNA.

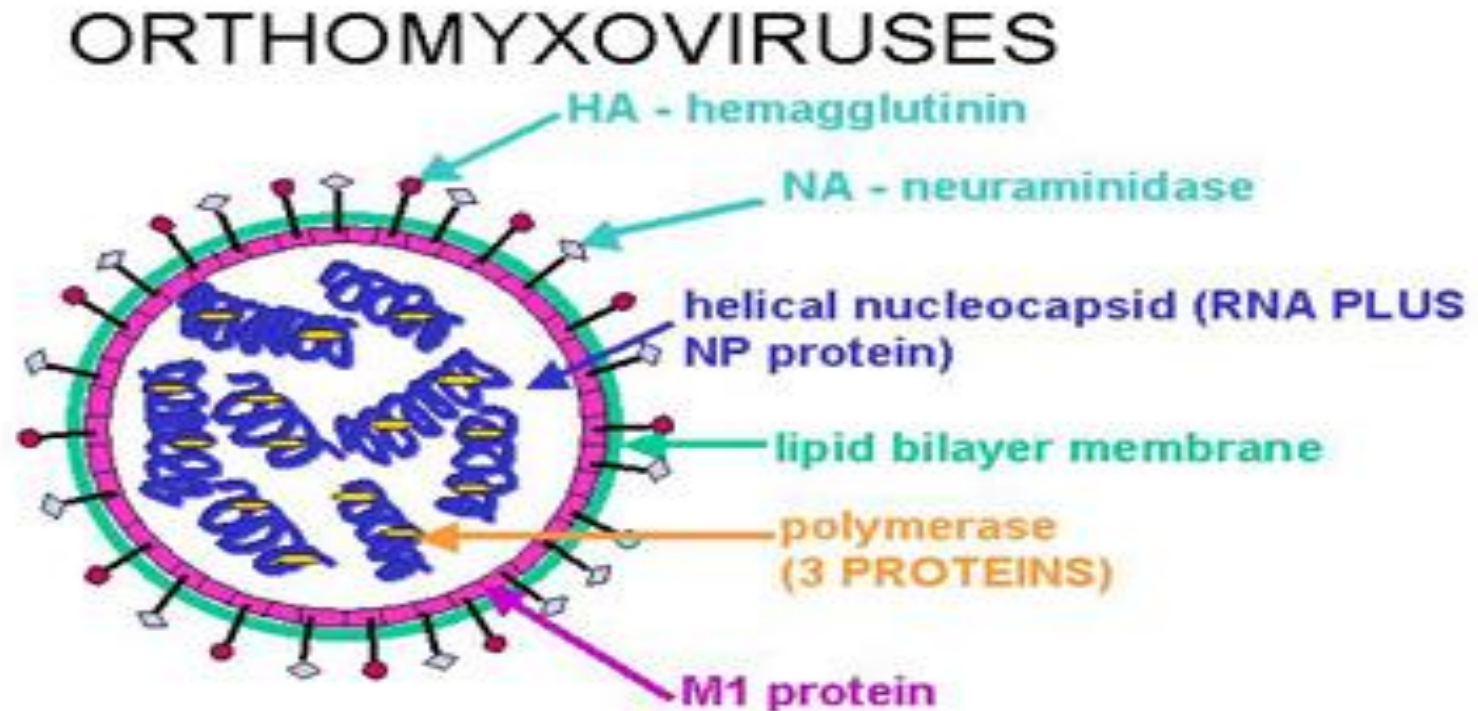
Τάξη V: Μονόκλωνο (-) πολικότητας RNA. Τα γενώματα αυτών των ιών διαιρούνται σε δυο τύπους:

(α). Μη τεμαχισμένα (non- segmented) γενώματα (σειρά Mononegvirales) . Το πρώτο βήμα στην αντιγραφή είναι η μεταγραφή του γενώματος (-) sense RNA από την ιική RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση για την παραγωγή monocistronic mRNAs, τα οποία θα χρησιμεύσουν ως μήτρα για την επακόλουθη αντιγραφή του γενώματος. Μερικοί από αυτούς τους ιούς επίσης έχουν μια αμφοτερόσημη (ambisense) οργάνωση.

## Class V: Single-stranded (-) sense RNA



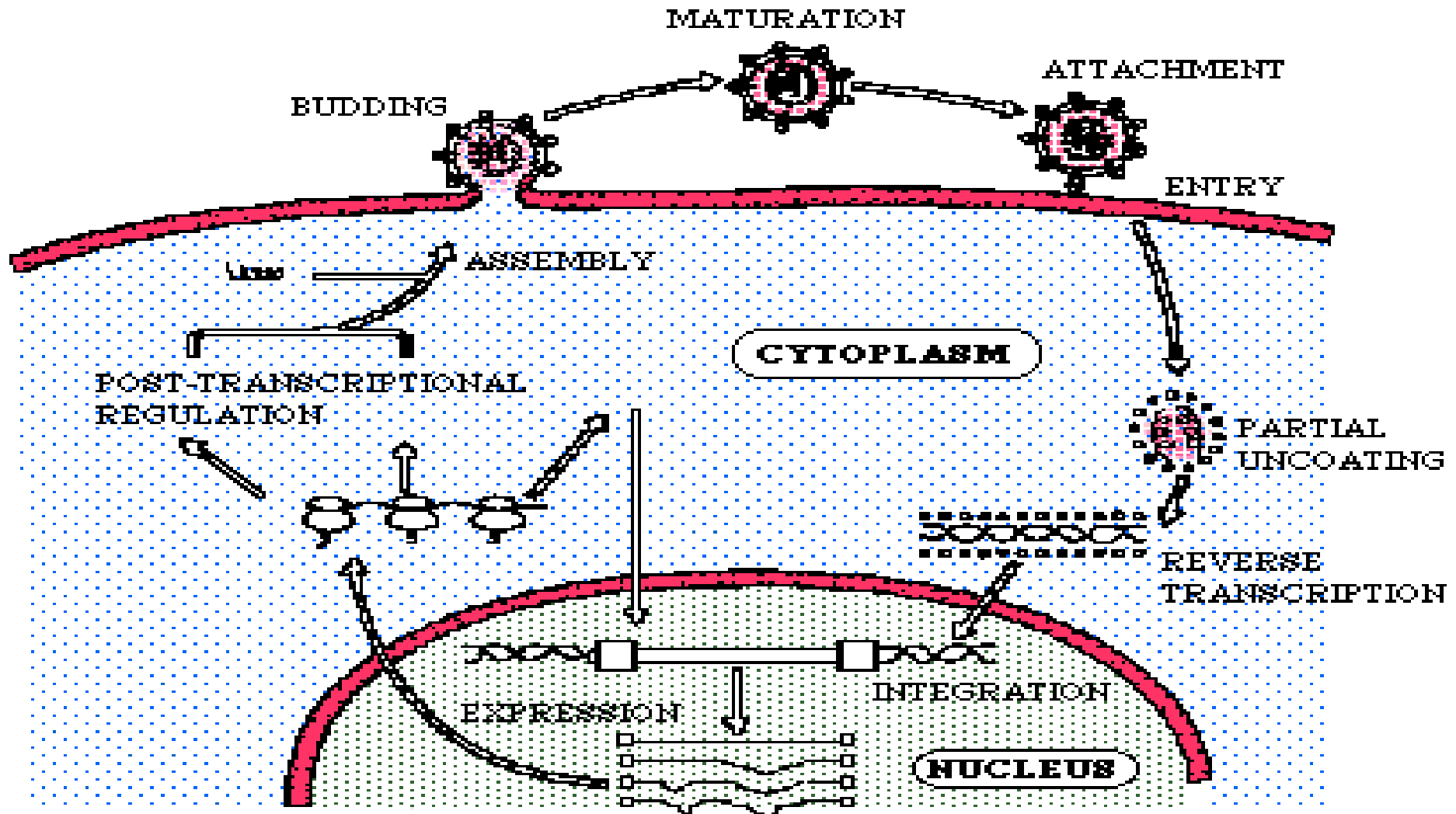
(β). Τεμαχισμένα γενώματα (segmented genomes) , (Orthomyxoviridae). Η αντιγραφή συμβαίνει στον πυρήνα, με την παραγωγή monocistronic mRNAs για κάθε τεμαχισμένο γονίδιο. Το γένωμα του ιού της Γρίπης αποτελείται από 12000-15000 νουκλεοτίδια (nt) τα οποία κατανέμονται σε 8 τεμάχια. μήκους από 800-2500 νουκλεοτιδίων. Το γένωμα παρουσιάζει τελικές επαναλήψεις στα άκρα του κάθε τεμαχίου 12-13 νουκλεοτιδίων στο 5'- άκρο και 9-11 νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο.



type A, B, C : NP, M protein  
sub-types: HA or NA protein



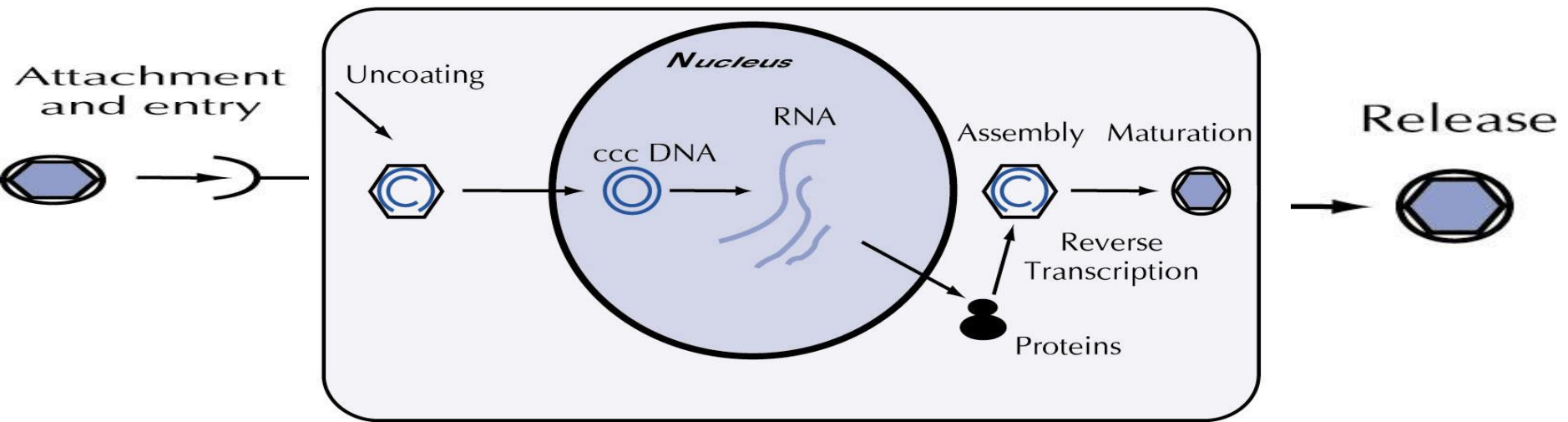
Τάξη VI: Μονόκλωνο (+) πολικότητας RNA με DNA ενδιάμεσο . Τα γενώματα των ρετροϊών είναι (+) πολικότητας RNA αλλά είναι διπλοειδή και δεν χρησιμεύουν αμέσως ως mRNA, αλλά ως μήτρα για την αντίστροφη μεταγραφή σε DNA.



Τάξη VII: Δίκλωνο DNA με RNA ενδιάμεσο . Αυτή η ομάδα ιών επίσης βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή, αλλά διαφορετικά σε σχέση με τους ρετροϊούς (τάξη VI), μια που αυτό το γεγονός συμβαίνει μέσα στα στελέχη του ιού κατά την διάρκεια της ωρίμανσης. Κατά την μόλυνση ενός νέου κυττάρου, το πρώτο βήμα είναι η επιδιόρθωση του κενού τμήματος του γενώματος, η οποία ακολουθείται από την μεταγραφή.

## Class VII: Double-stranded DNA with RNA Intermediate

- This group of viruses also relies on reverse transcription.
- Unlike the retroviruses (class VI), this occurs inside the virus particle during maturation.
- On infection of a new cell, the first event to occur is repair of the gapped genome, followed by transcription:



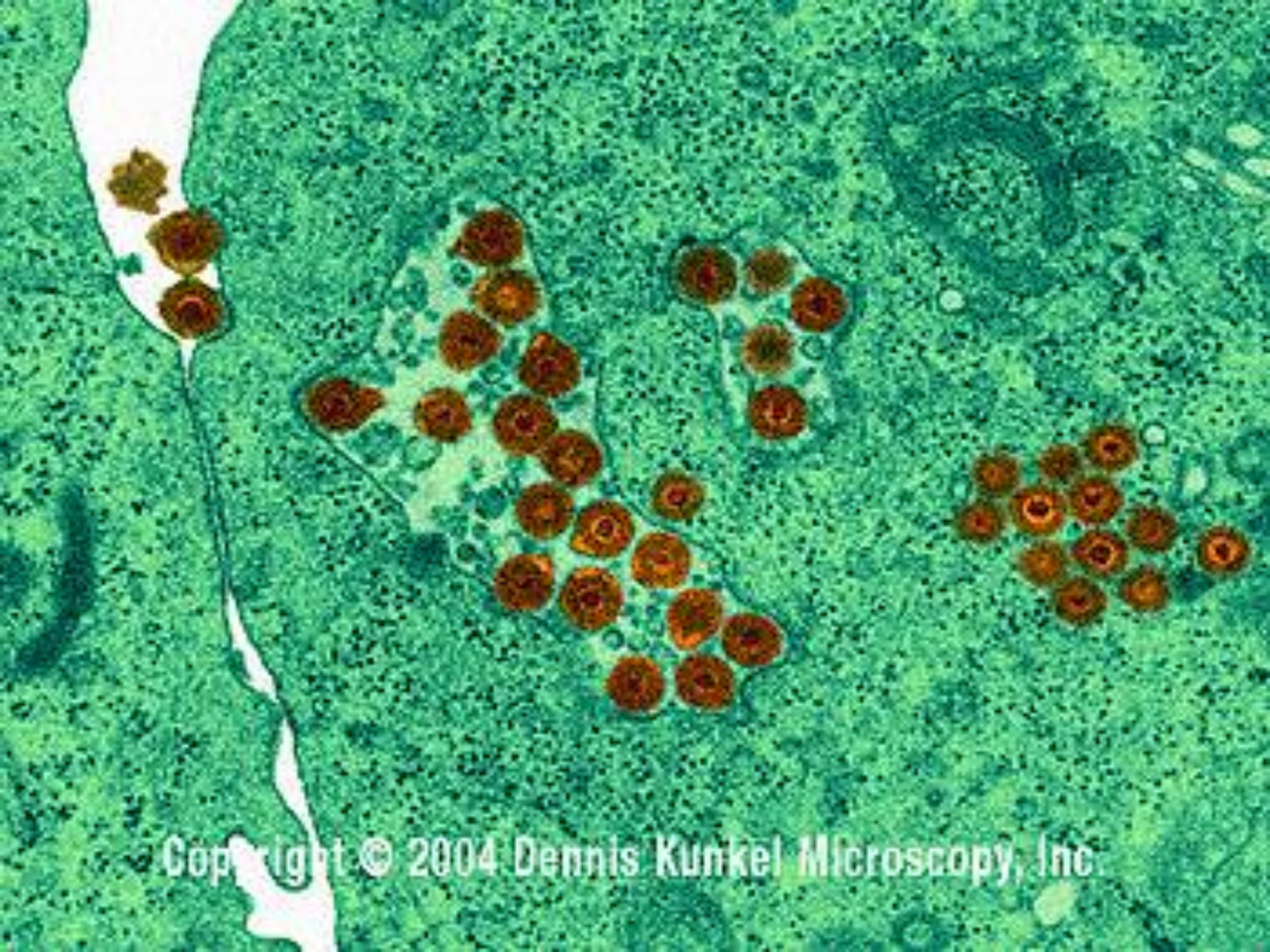
## ΣΥΝΑΡΜΟΛΟΓΗΣΗ

Η διαδικασία της συναρμολόγησης περιλαμβάνει την συλλογή όλων των συστατικών που είναι απαραίτητα για τον σχηματισμό του ώριμου ιικού σωματιδίου (virion) σε μια συγκεκριμένη θέση στο κύτταρο. Η θέση της συναρμολόγησης εξαρτάται από την θέση της αντιγραφής μέσα στο κύτταρο και από τους μηχανισμούς βάσει των οποίων ο ιός τελικώς απελευθερώνεται από το κύτταρο, δηλ. ποικίλει για τους διαφορετικούς ιούς.

Για παράδειγμα στους picornaviruses, στους roxviruses και στους reoviruses η συναρμολόγηση γίνεται στο κυτταρόπλασμα ενώ στους adenoviruses, herpesviruses, στους polyomaviruses και στους parvoviruses η συναρμολόγηση του καψιδίου γίνεται στον πυρήνα.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, στις κυτταρικές μεμβράνες συναθροίζονται πρωτεΐνες του ιού και αυτό αποτελεί την εκκίνηση της διαδικασίας της συναρμολόγησης. Γενικώς, θεωρείται ότι όταν τα αυξανόμενα ενδοκυτταρικά επίπεδα των πρωτεϊνών του ιού και των μορίων του γενώματος φθάσουν σε μια κρίσιμη συγκέντρωση ενεργοποιείται η διαδικασία συναρμολόγησης.

Πολλοί ιοί συγκεντρώνουν υψηλά επίπεδα των νεοσυντιθέμενων δομικών τους στοιχείων σε υποκυτταρικά διαμερίσματα, τα οποία είναι γνωστά ως κυτταρικά έγκλειστα (inclusion bodies). Το μέγεθος και η τοποθεσία των κυτταρικών εγκλείστων στα μολυσμένα κύτταρα είναι συχνά χαρακτηριστικό γνώρισμα συγκεκριμένων ιών, όπως π.χ. ο ιός της Λύσας δημιουργεί μεγάλα περιξ του πυρήνα έγκλειστα γνωστά ως 'Negri bodies', που παρατηρήθηκαν αρχικά από τον Adelchi Negri το 1903.



Copyright © 2004 Dennis Kunkel Microscopy, Inc.

## ΩΡΙΜΑΝΣΗ

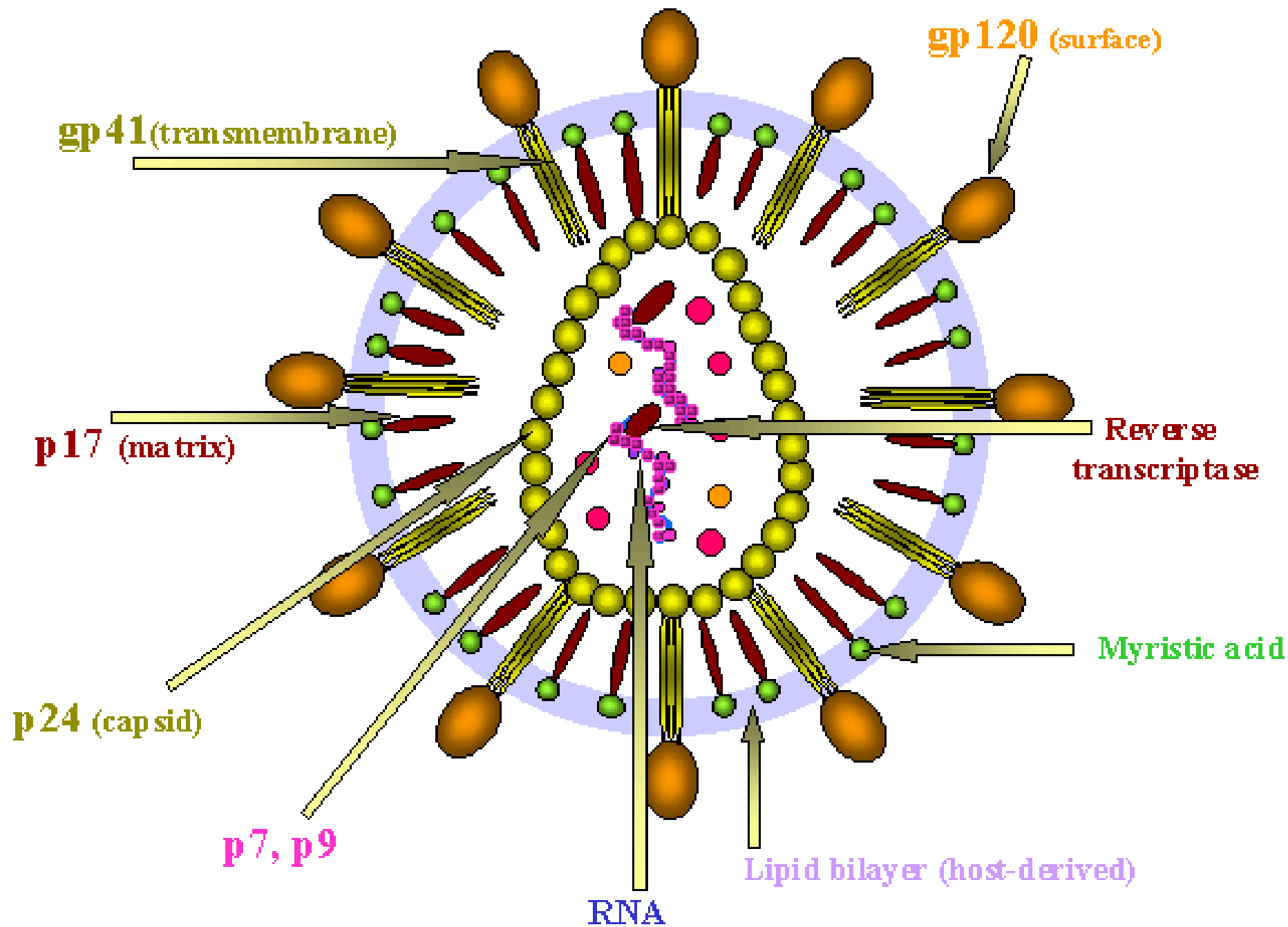
Αυτό είναι το στάδιο του κύκλου ζωής κατά το οποίο ο ιός γίνεται μεταδοτικός. Η ωρίμανση συνήθως περιλαμβάνει δομικές αλλαγές στο ιικό σωματίδιο που προκύπτουν είτε από την πρωτεολυτική πέψη ορισμένων πρωτεϊνών του καψιδίου είτε αλλαγές στην στερεοδιαμόρφωση των πρωτεϊνών του κατά την διάρκεια της συναρμολόγησης.

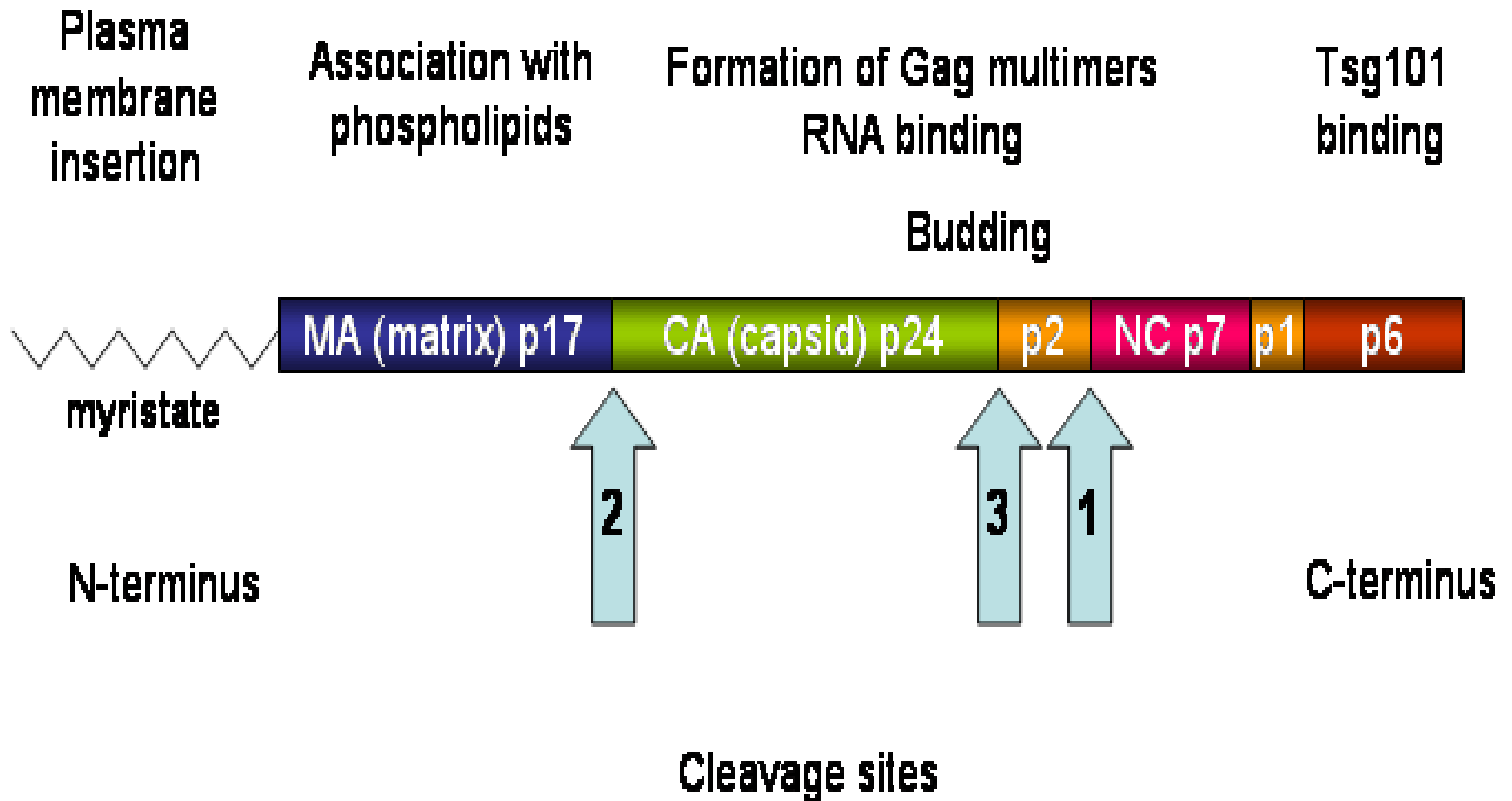
Ιικές πρωτεάσες συχνά εμπλέκονται στην ωρίμανση, παρόλο που τα κυτταρικά ένζυμα ή και αμφότερα συμβάλλουν στην ωρίμανση. Οι ιικές πρωτεάσες παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση για συγκεκριμένες αλληλουχίες αμινοξέων και ενίοτε περικλείονται κατά την συναρμολόγηση στα ιικά σωματίδια και ενεργοποιούνται μόνο όταν βρεθούν σε στενή επαφή με την αλληλουχία που έχουν ως στόχο μέσω αλλαγών όπως ένα τοπικό υδρόφοβο περιβάλλον ή αλλαγών του pH κλπ.

Στο νουκλεοκαψίδιο των ρετροϊών το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες του γονιδίου gag η ιική πρωτεάση συγκεντρώνεται στον «πυρήνα» του καψιδίου πριν την απελευθέρωση από το κύτταρο του ιικού σωματιδίου μέσω της εκβλάστησης.

Η πρωτεάση διασπά τότε τις ανώριμες (πρόδρομες) πρωτεΐνες δημιουργώντας τις ώριμες πρωτεΐνες του καψιδίου, του νουκλεοκαψιδίου κλπ.

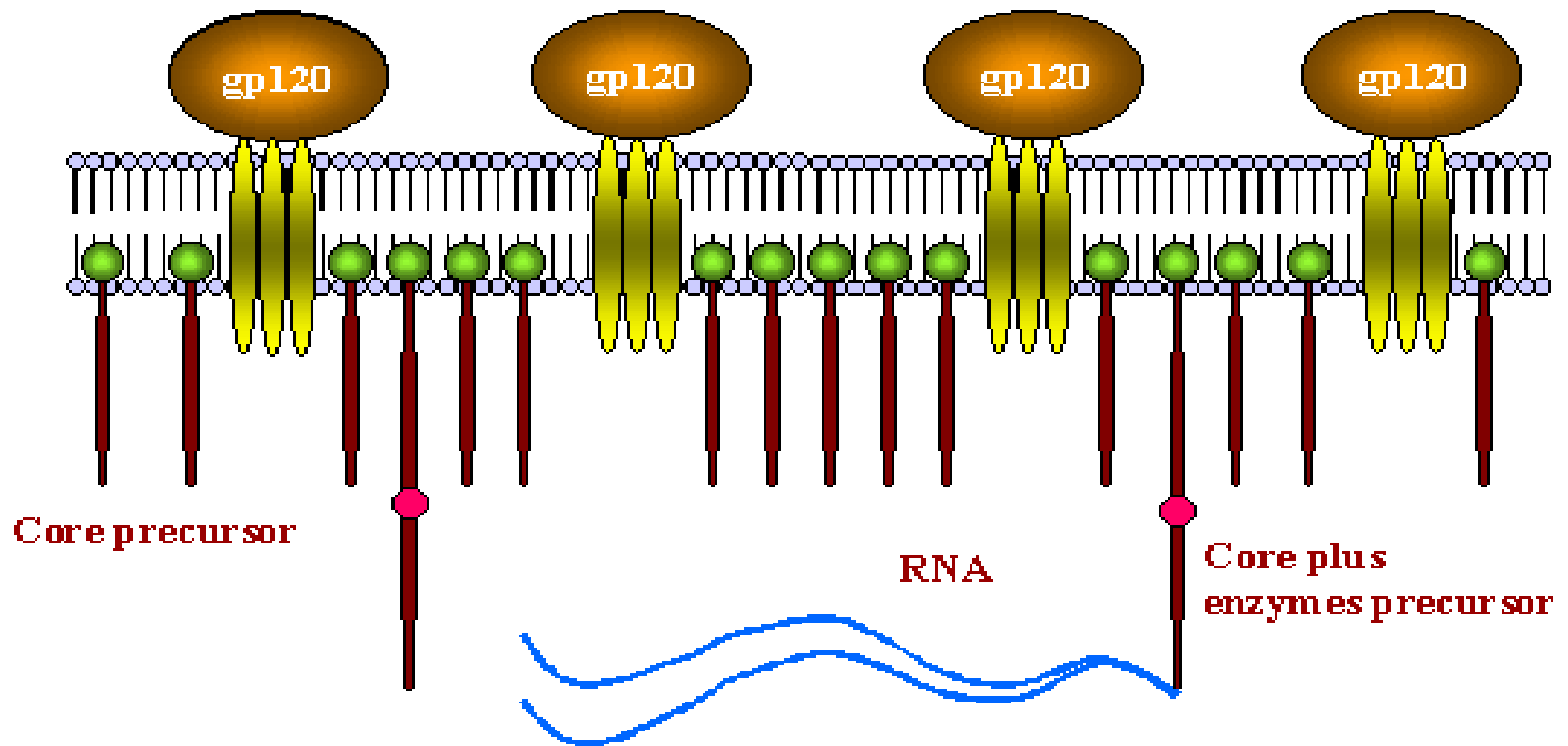
Οι γλυκοπρωτεΐνες του εξωτερικού περιβλήματος φαίνεται επίσης να διασπώνται από κυτταρικά ένζυμα ώστε να λάβουν την τελική ώριμη μορφή τους σε γλυκοπρωτεΐνες της επιφάνειας (SU) και διαμεμβρανικές (transmembrane -TM) πρωτεΐνες.





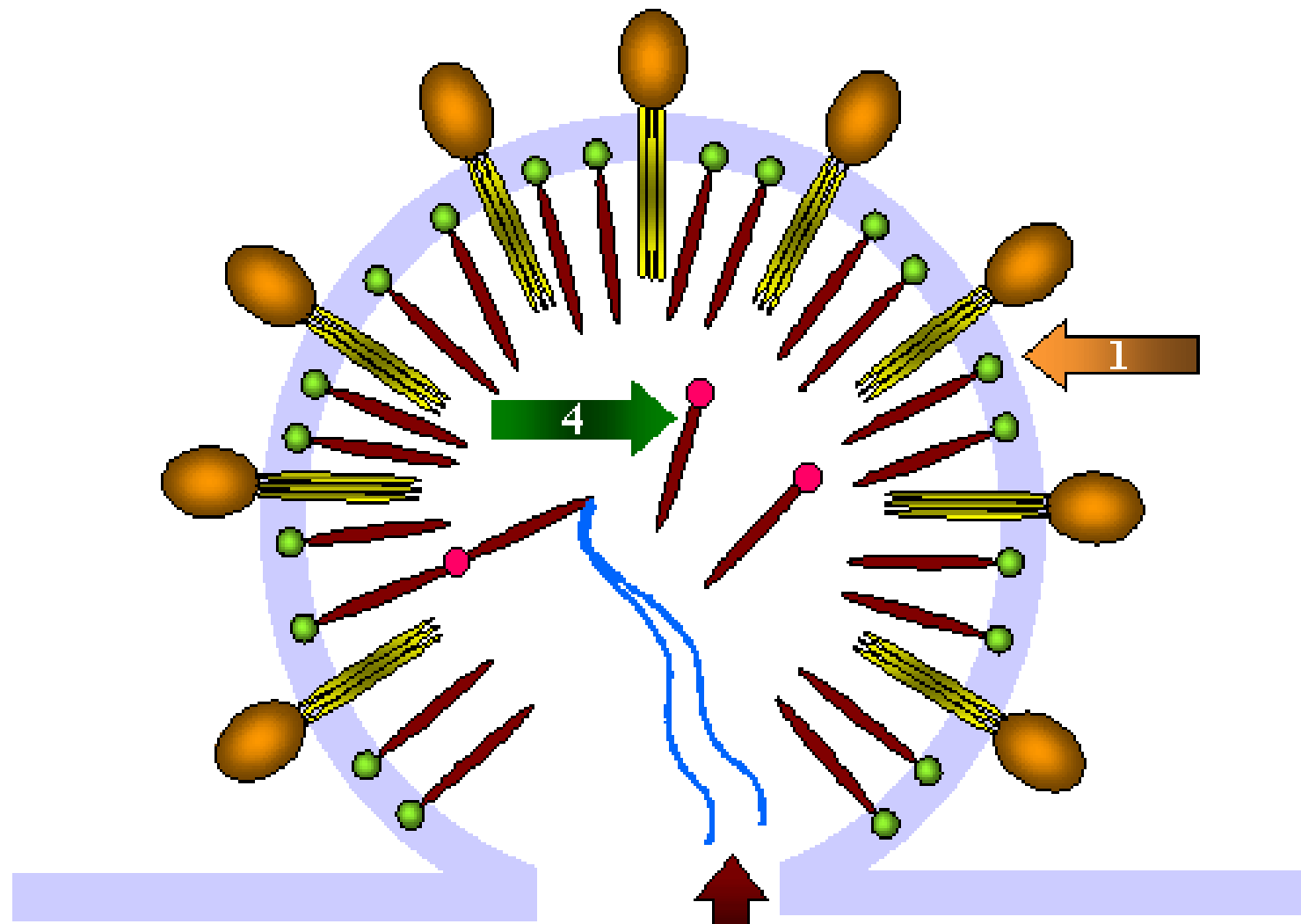
The group-specific antigen is made as a polyprotein and is cleaved during or after budding of the virus by a virally-encoded protease encoded by the *pol* gene.

# ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ HIV



Assembly of the new virion takes place at the cell membrane. Three types of protein make up the virion. These are the membrane protein (gp120 and gp41 complex) plus two precursor proteins of different sizes





1. Proteins aggregate at cell membrane

2. Membrane pinches off

3. Precursor protein draws two strands of RNA into nascent virion

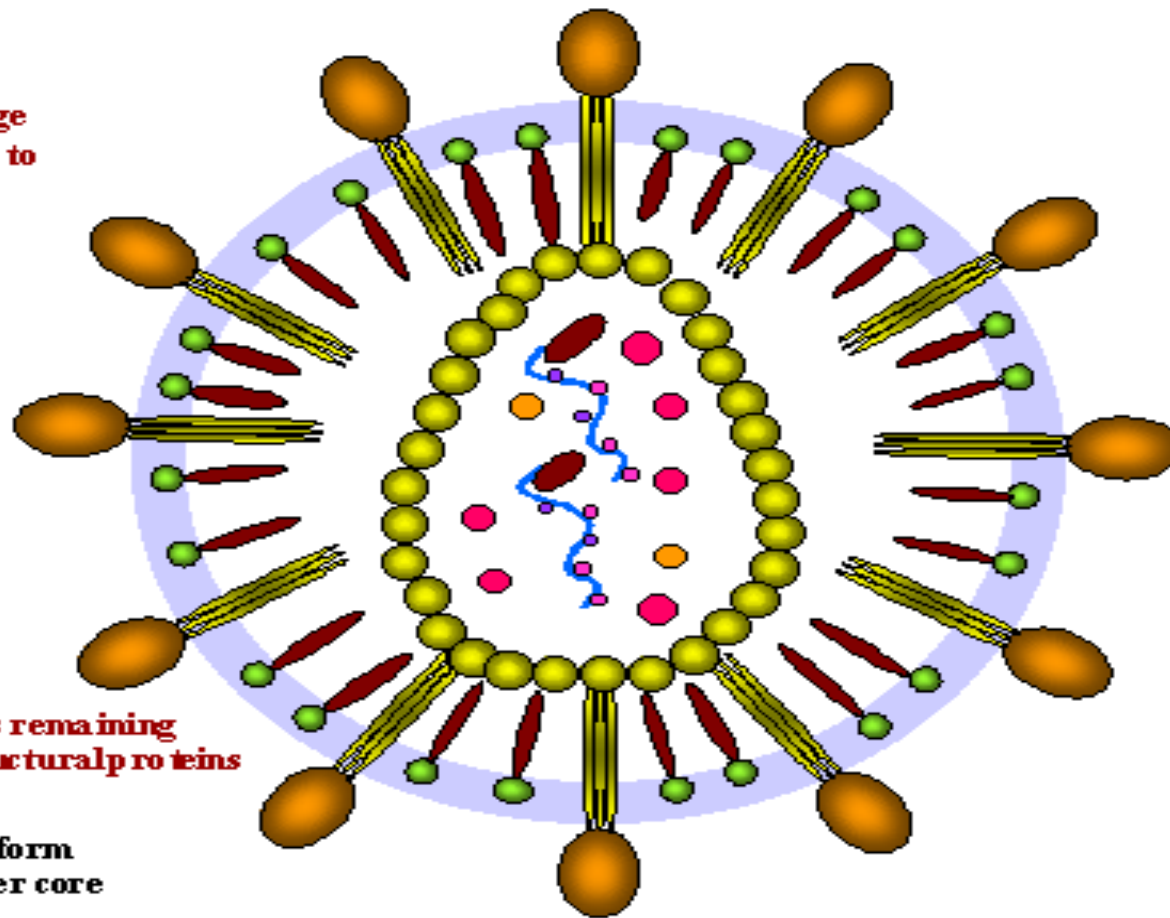
4. Protease cuts itself free

**1. Protease completes cleavage of large precursor to other enzymes**

**Reverse transcriptase/  
ribonuclease**

**Integrase**

**More protease**



**2. Protease cleaves remaining short precursor to structural proteins**

**P24, p7 and p9 form  
bullet-shaped inner core**

Όπως ήδη αναφέρθηκε για μερικούς ιούς, η συναρμολόγηση και η ωρίμανση συμβαίνουν μέσα στο κύτταρο, ενώ για άλλους, τα γεγονότα της ωρίμανσης συμβαίνουν κατά την απελευθέρωση του στελέχους του ιού από το κύτταρο. Σε όλες τις περιπτώσεις, η διαδικασία της ωρίμανσης ετοιμάζει το ιικό σωματίδιο για την μόλυνση των επόμενων κυττάρων.

## **ΑΠΕΛΕΥΘΕΡΩΣΗ**

Όπως περιγράφηκε ήδη , οι ιοί των φυτών αντιμετωπίζουν ιδιαίτερες δυσκολίες οι οποίες επιβάλλονται από την δομή των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων όταν έρχεται η στιγμή να αφήσει ο ιός τα κύτταρα και να μολύνει άλλα.

**Όλοι οι άλλοι ιοί απελευθερώνονται από το κύτταρο με έναν από τους ακόλουθους δυο μηχανισμούς.**

**Για τους λυτικούς ιούς (όπως οι περισσότεροι ιοί χωρίς εξωτερικό περίβλημα), η απελευθέρωση είναι μια απλή διαδικασία - το μολυσμένο κύτταρο λύεται και απελευθερώνονται οι ιοί .**

**Οι ιοί με εξωτερικό περίβλημα αποκτούν την λιποειδή μεμβράνη τους καθώς ο ιός εξέρχεται από το κύτταρο μέσω της κυτταρικής μεμβράνης ή μέσω ενός ενδοκυτταρικού έγκλειστου πριν την απελευθέρωση του .**

**Η διαδικασία της εκβλάστησης είναι δυνατόν άλλοτε να καταστρέψει το κύτταρο ( rhabdoviruses, togaviruses ) αλλά και άλλοτε να μην το καταστρέψει όπως ενίοτε στους ρετροϊούς.**

ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ

ΤΩΝ

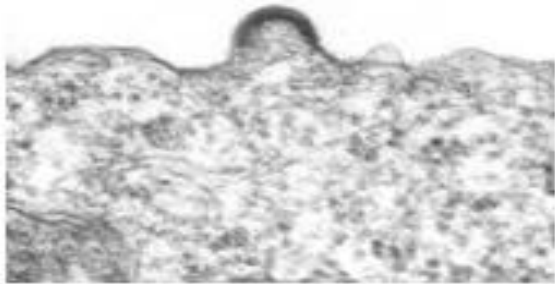
ΡΕΤΡΟΙΩΝ

A , B : ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗ

C: ΑΡΧΗ ΩΡΙΜΑΝΣΗΣ ΤΟΥ ΗΙV

D: ΩΡΙΜΑ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

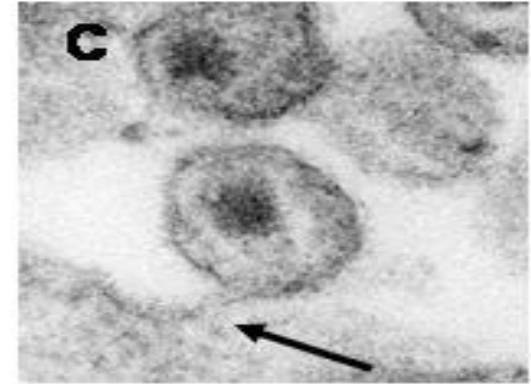
**A**



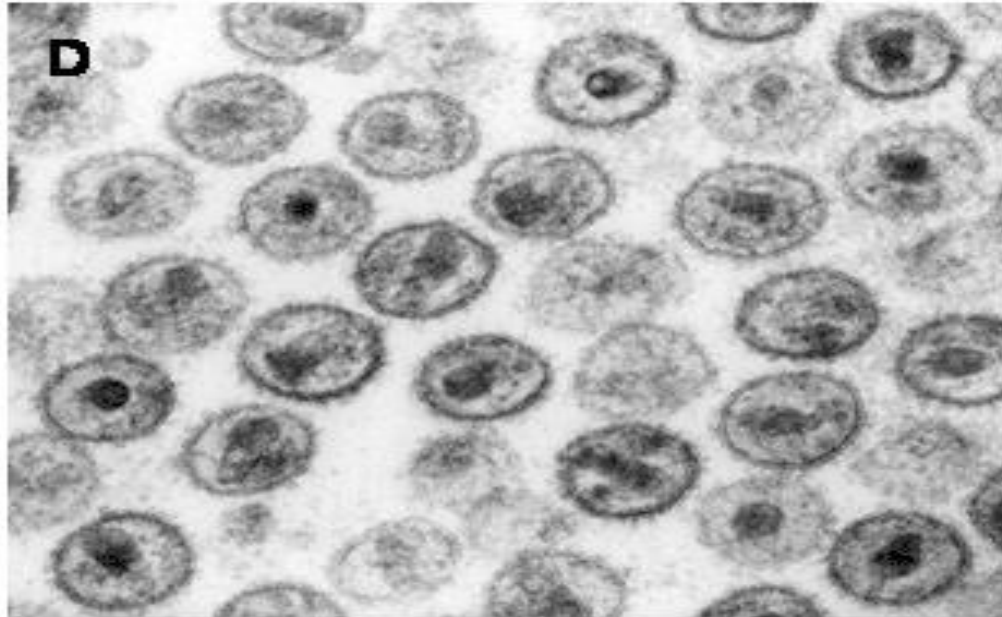
**B**



**C**



**D**



Όπως τονίσθηκε νωρίτερα, η συναρμολόγηση, η ωρίμανση και η απελευθέρωση είναι σχεδόν ταυτόχρονες διαδικασίες για τους ιούς οι οποίοι απελευθερώνονται μέσω της εκβλάστησης.

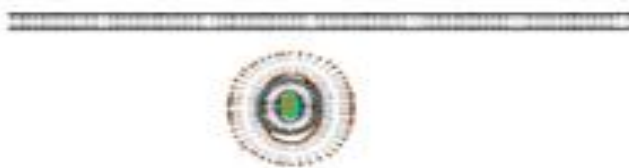
Στις περισσότερες περιπτώσεις, στην εκβλάστηση εμπλέκονται κυτταροπλασματικές μεμβράνες (retroviruses, togaviruses, orthomyxoviruses), αλλά σε μερικές περιπτώσεις εμπλέκεται επίσης η μεμβράνη του πυρήνα (herpesviruses).

### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΙΩΝ



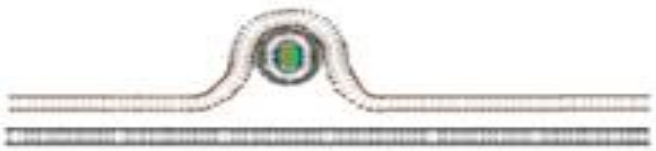
pm

5 Outer membrane fuses with plasma membrane - virus leaves with a part of the nuclear membrane



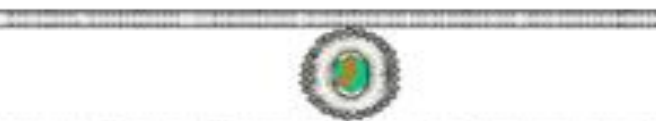
pm

4 Double membrane virus interacts with another cellular membrane (e.g. plasma membrane)



onm  
inm

3 Enveloped virus buds through outer nuclear membrane (onm)



onm

2 Enveloped virus between two nuclear membranes

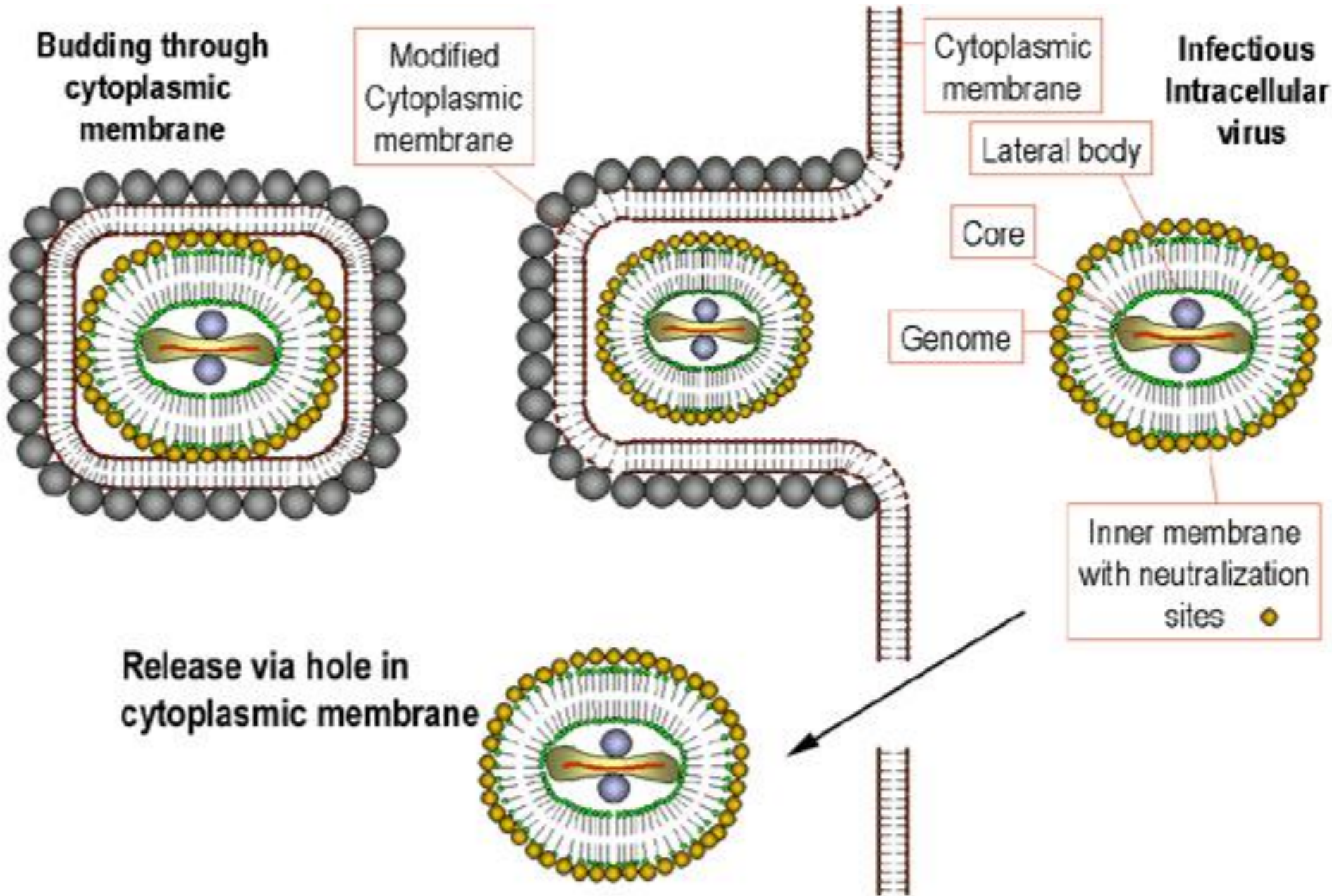


onm

inm

1 Nucleocapsid buds through inner nuclear membrane (inm) to form enveloped virus

# ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΡΟΧ ΙΩΝ



## ΕΚΦΡΑΣΗ

### ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

Η αντιγραφή του ιού τελεί υπό τον στενό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων του.

Οι μηχανισμοί οι οποίοι εμπλέκονται περιλαμβάνουν:

Ισχυρά θετικά και αρνητικά σήματα τα οποία προωθούν ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων.

«Συμπιεσμένα» γενώματα στα οποία η μερική τουλάχιστον επικάλυψη των ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης είναι συνηθισμένη.

Σήματα ελέγχου τα οποία συχνά εντοπίζονται μέσα σε άλλα γονίδια.

Διάφορες στρατηγικές που καταλήγουν στην δημιουργία πολλαπλών πεπτιδίων από ένα μόνο αγγελιοφόρο RNA.

Η έκφραση γονιδίων περιλαμβάνει ρυθμιστικές περιοχές που δρουν μέσω σημάτων τα οποία λειτουργούν *in cis* (επηρεάζοντας την ενεργότητα των γειτονικών γενετικών περιοχών) ή *in trans* (μέσω προϊόντων τα οποία δρουν σε ρυθμιστικές θέσεις είτε αυτές είναι γειτονικές με την θέση από την οποία παράγονται είτε όχι).

Για παράδειγμα, οι επαγωγείς της μεταγραφής δρουν σε *cis* αλληλουχίες που είναι παρακείμενες των γονιδίων των οποίων ελέγχουν την μεταγραφή, ενώ πρωτεΐνες όπως οι 'παράγοντες μεταγραφής', οι οποίοι προσδένονται σε συγκεκριμένες DNA αλληλουχίες του κυττάρου, είναι παραδείγματα παραγόντων που δρουν *in trans*.

## **ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΥΣ ΕΥΚΑΡΥΩΤΕΣ**

**Το πρώτο επίπεδο ελέγχου γίνεται πριν την μεταγραφή και εξαρτάται από την τοπική στερεοδιαμόρφωση του DNA. Το DNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα έχει μια περίπλοκη δομή, σχηματίζοντας συμπλέγματα με πολλές πρωτεΐνες για να σχηματίσει την χρωματίνη, σημαντικότερη δομή στον έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων. Η πέψη της χρωματίνης με την DNase I δεν δίνει ένα ενιαίο προφίλ πέψης, αλλά αποκαλύπτει συγκεκριμένες υπερευαίσθητες θέσεις πέψης για την DNase I και πιστεύεται ότι οι θέσεις αυτές αποδεικνύουν διαφορές στην λειτουργία των ποικίλων περιοχών της χρωματίνης.**

**Είναι πιθανό, για παράδειγμα, οι ρετροϊοί να ενσωματώνονται κατά προτίμηση στο γένωμα του κυττάρου ξενιστή σε αυτές τις θέσεις.**

**Το μεταγραφικώς ενεργό DNA είναι επίσης υπομεθυλιωμένο (hypomethylated), συγκρινόμενο με την συχνότητα μεθυλίωσης στις μεταγραφικώς αδρανείς περιοχές του γενώματος.**

**Το δεύτερο επίπεδο ελέγχου προκύπτει από την διαδικασία της ίδιας της μεταγραφής.**

**Υπάρχουν τρεις μορφές RNA πολυμεράσης στα ευκαρυωτικά κύτταρα και οι οποίες διακρίνονται από τις σχετικές τους ευαισθησίες στην  $\alpha$ -amanitin και εμφανίζουν ιδιαιτερότητες για διαφορετικές τάξεις γονιδίων.**



RNA polymerase	sensitivity to $\alpha$ -amanatin	Cellular genes transcribed	Virus genes transcribed
I	Unaffected	Ribosomal RNAs	---
II	Highly sensitive	Most single-copy genes	Most DNA virus genomes
III	Moderately sensitive	5S rRNA, tRNAs	Adenovirus VA RNAs

Η έναρξη της μεταγραφής επηρεάζεται δραματικά από αλληλουχίες οι οποίες ευρίσκονται πριν του σημείου έναρξης της μεταγραφής, και λειτουργούν ως θέσεις αναγνώρισης για ομάδες πρωτεϊνών οι οποίες συνδέονται στο DNA, γνωστές ως 'παράγοντες μεταγραφής'. Αμέσως πριν το σημείο έναρξης της μεταγραφής τοποθετείται μια σχετικά μικρή περιοχή γνωστή ως επαγωγέας. Σε αυτό το σημείο τα «σύμπλοκα της μεταγραφής», αποτελούμενα από RNA πολυμεράση και από πρωτεϊνικούς παράγοντες, προσδένονται στο DNA και η μεταγραφή αρχίζει.

**Ωστόσο και οι αλληλουχίες που ευρίσκονται πριν τον επαγωγέα επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα με την οποία τα «σύμπλοκα της μεταγραφής» σχηματίζονται και ο ρυθμός της μεταγραφής εξαρτάται κατά συνέπεια και από τον συνδυασμό των παραγόντων μεταγραφής και του επαυξητή ( enhancers) της μεταγραφής. Οι ιδιότητες αυτών των αλληλουχιών επαυξητών είναι αξιοσημείωτες μια που μπορούν να ασκήσουν την επίδραση τους ακόμα και σε απόσταση μερικών χιλιάδων βάσεων. Η μεταγραφή των ευκαρυωτικών γονιδίων καταλήγει στην παραγωγή μονοκιστρονικών mRNAs, καθένα από τα οποία μεταγράφεται από τον δικό του ατομικό επαγωγέα .**

**Στο επόμενο στάδιο, η έκφραση των γονιδίων επηρεάζεται από την δομή του παραγώμενου mRNA. Η σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNA ποικίλει σημαντικά, μερικά έχουν συγκριτικά μεγάλους χρόνους ημι-ζωής στο κύτταρο (π.χ. πολλές ώρες). Οι μέσοι χρόνοι ημι-ζωής των mRNAs τα οποία κωδικοποιούν για ρυθμιστικές πρωτεΐνες είναι κατά κανόνα λίγα λεπτά της ώρας . Η σταθερότητα των ευκαρυωτικών mRNAs εξαρτάται από την ταχύτητα με την οποία αποδομούνται .**

**Η ταχύτητα αποδόμησης εξαρτάται από παράγοντες όπως οι τελικές τους αλληλουχίες, οι οποίες αποτελούνται από μια μεθυλιωμένη καλύπτρα ( methylated cap) στο άκρο 5' και μια poly A ουρά στο 3' άκρο καθώς επίσης και από την συνολική δευτεροταγή δομή του mRNA.**

Η διαδικασία της μετάφρασης προσφέρει επίσης ευκαιρίες για έλεγχο της έκφρασης. Η αποτελεσματικότητα με την οποία διαφορετικά mRNAs μεταφράζονται ποικίλει πολύ. Αυτές οι διαφορές οφείλονται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματικότητα με την οποία τα ριβοσώματα δένονται στα διάφορα mRNAs, την ικανότητά τους να αναγνωρίζουν την αλληλουχία AUG ( κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ) σε διαφορετικού περιεχομένου αλληλουχίες και δευτεροταγών δομών και τελικά την ταχύτητα με την οποία οι διάφορες αλληλουχίες μετατρέπονται σε πρωτεΐνη.

## **ΣΤΡΑΤΗΓΙΚΕΣ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΙΙΚΩΝ ΓΕΝΩΜΑΤΩΝ**

Οι επτά τάξεις του ιικού γενώματος που περιγράφηκαν ανωτέρω θα περιγραφθούν ξανά, αλλά αυτή την φορά θα εξετασθεί ο τρόπος με τον οποίο η γενετική πληροφορία της κάθε τάξης εκφράζεται.

### **ΤΑΞΗ I : ΔΙΚΛΩΝΟ DNA**

Αυτή η τάξη των ιικών γενωμάτων υποδιαιρείται σε δυο επιπλέον ομάδες : Σε αυτές στις οποίες η αντιγραφή του γενώματος είναι αποκλειστικά πυρηνική (π.χ. Adenoviridae, Polyomaviridae, Herpesviridae) και σε αυτή στην οποία η αντιγραφή λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Poxviridae).

# POLYOMAVIRUSES ΚΑΙ PAPILLOMAVIRUSES

**Οι papillomaviruses** γενικά εξαρτώνται από το κύτταρο για την αντιγραφή, η οποία λαμβάνει χώρα μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα και όχι σε άλλους τύπους κυττάρων.

**Οι polyomaviruses** κωδικοποιούν τους trans-acting παράγοντες (T- αντιγόνα) τα οποία διεγείρουν την μεταγραφή και την αντιγραφή του γενώματός τους .

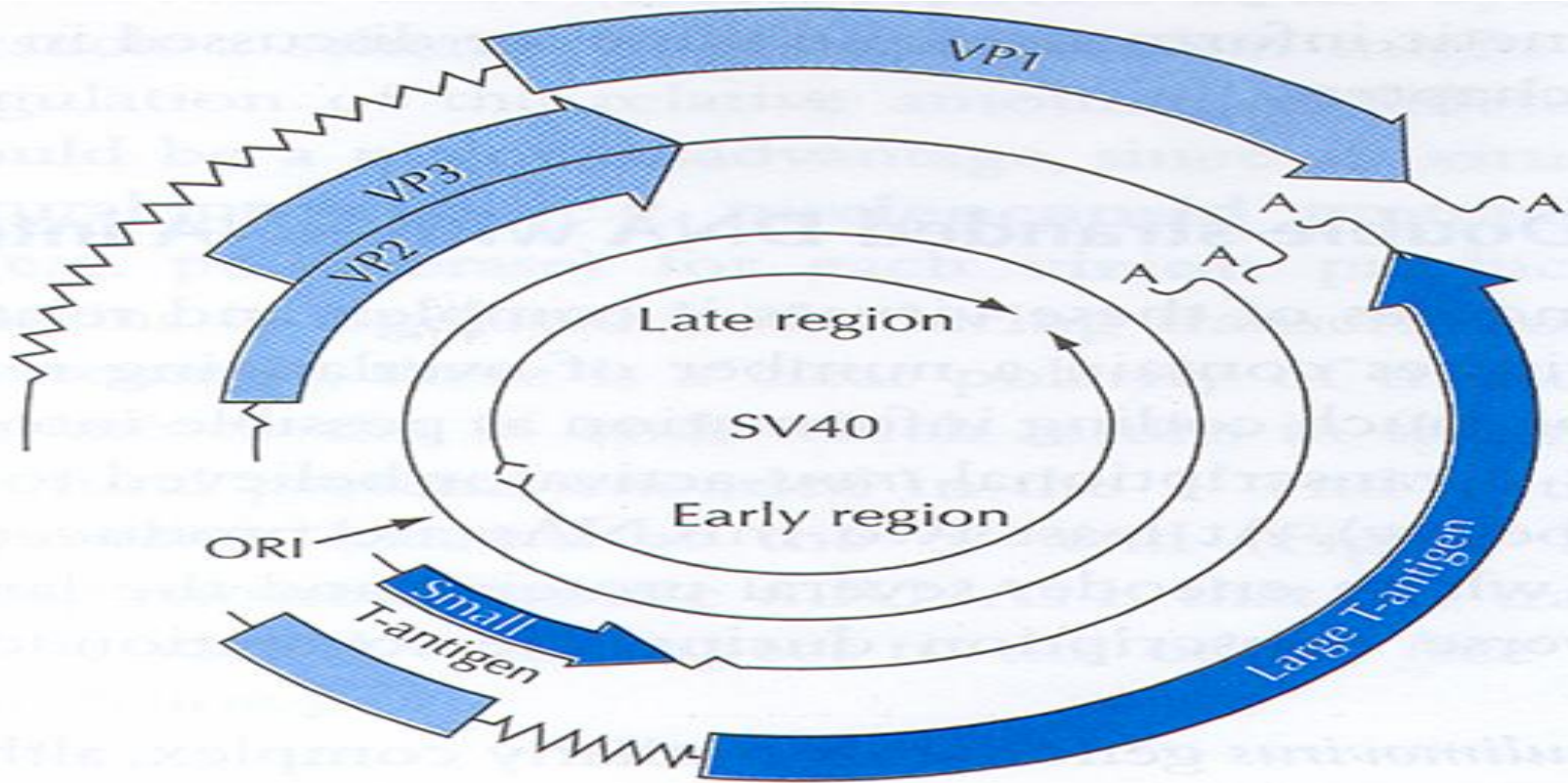
Ο ιός εισέρχεται μαζί με το καψίδιο, το οποίο αποδομείται στο κυτταρόπλασμα και το DNA του μεταναστεύει στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Στη συνέχεια, ο ιός χρησιμοποιεί τον αντιγραφικό και μεταγραφικό/μεταφραστικό μηχανισμό του κυττάρου για να πολλαπλασιασθεί και να συνθέσει τις ιϊκές πρωτεΐνες, με σκοπό τη συγκρότηση των νέων ιϊκών σωματιδίων.

Στον κύκλο ζωής του SV40 μέσα στο ξενιστικό κύτταρο διακρίνουμε δύο φάσεις: την **πρώιμη** (Early) και την **όψιμη ή καθυστερημένη** (Late) φάση .

Σε κάθε μία από αυτές τις δύο φάσεις, μεταγράφεται διαφορετική περιοχή του κυκλικού DNA του ιού: κατά την πρώιμη φάση μεταγράφεται η «πρώιμη περιοχή» και κατά την καθυστερημένη φάση μεταγράφεται η «καθυστερημένη περιοχή». Αυτές οι δύο περιοχές έχουν κοινό σημείο έναρξης της μεταγραφής (ori), μεταγράφονται δε προς αντίθετες κατευθύνσεις.

Η πρώτη περιοχή του γονιδιώματος κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες, ονομαζόμενες T οι οποίες πρωτεΐνες, προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα από ένα κοινό αρχικό μετάγραφο. Η πρωτεΐνη T, είναι απαραίτητη για την έναρξη της αντιγραφής του DNA του SV40 και παίζει σημαντικό ρόλο στο μετασχηματισμό των κυττάρων

Η μεταγραφή της καθυστερημένης περιοχής του γονιδιώματος οδηγεί στη σύνθεση των τριών πρωτεϊνών του καψιδίου, VP1, VP2 και VP3. Και εδώ έχουμε διαφορετικό μάτισμα του ίδιου αρχικού μεταγράφου.



Η αντιγραφή του δίκλωνου DNA γενώματος του SV40 λαμβάνει χώρα στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή. Η μεταγραφή του γενώματος γίνεται από την RNA polymerase II του ξενιστή και το μεγάλο T-αντιγόνο παίζει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της μεταγραφής του γενώματος του ιού. Το μικρό T-αντιγόνο δεν είναι απαραίτητο για την αντιγραφή του ιού, αλλά επιτρέπει στο DNA του ιού να συσσωρεύεται στον πυρήνα. Και τα δυο αντιγόνα φέρουν αλληλουχίες αναγνώρισης για τις αλληλουχίες του DNA του κυττάρου ξενιστή όπου μεταναστεύουν αφού συντεθούν στο κυτταρόπλασμα.

Αμέσως μετά την μόλυνση των ανεκτικών κυττάρων, τα πρώιμα mRNAs εκφράζονται από τον πρώιμο επαγωγέα , ο οποίος περιέχει ένα δυνατό μεταγραφικό επαυξητή , μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 72 bp .

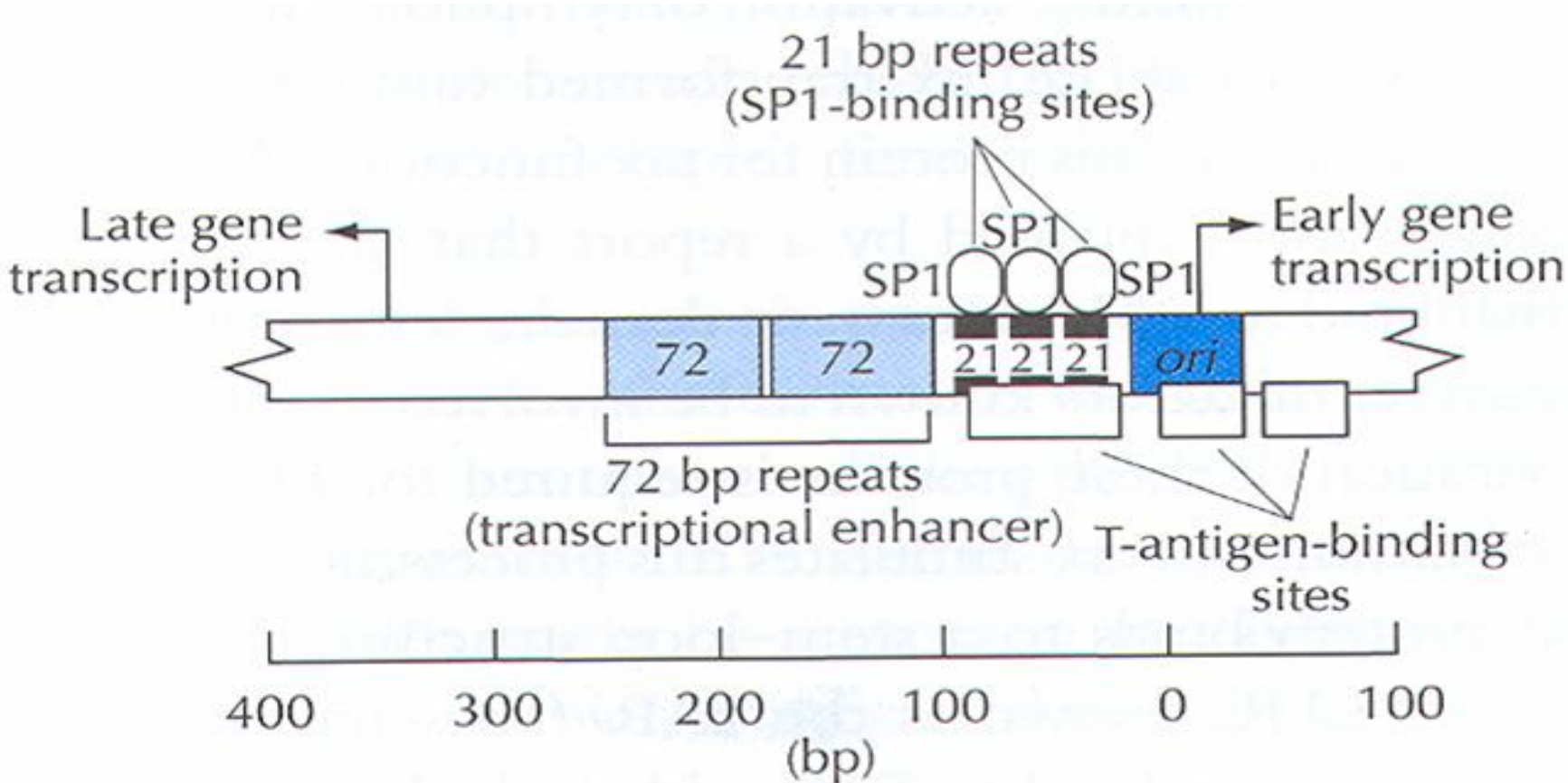
Οι πρώιμες πρωτεΐνες που συντίθενται είναι τα δύο T-αντιγόνα.

Καθώς η συγκέντρωση του μεγάλου T-αντιγόνου αυξάνει στον πυρήνα, η μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων καταστέλλεται από την σύνδεση του αντιγόνου στην αρχή της μεταγραφής του γενώματος του ιού, αποτρέποντας πλέον την μεταγραφή από τον πρώιμο επαγωγέα και προκαλώντας έτσι την «στροφή» προς την όψιμη φάση της μόλυνσης.

Ακολουθεί η αντιγραφή του DNA και τέλος η μεταγραφή των όψιμων γονιδίων λαμβάνει χώρα από τον όψιμο επαγωγέα και καταλήγει στην σύνθεση των δομικών πρωτεϊνών, VP1,VP2 και VP3.

Δεδομένου ότι το γένωμα του SV40 είναι πολύ μικρό, είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος το κύτταρο ξενιστής να εισέλθει στην φάση S όπου κύτταρο και ιός αντιγράφονται συγχρόνως.

Έτσι, ο πρώτος ρόλος του T-αντιγόνου του SV40 είναι ο έλεγχος της μεταγραφής του γενώματος ώστε να αποτελέσει ένα είδος «διακόπτη της μεταγραφής» και ο δεύτερος ρόλος του είναι η τροποποίηση του κυτταρικού μικροπεριβάλλοντος ώστε να επιτραπεί η αντιγραφή του ιϊκού γενώματος.



**Οι papillomaviruses** γενικά εξαρτώνται από το κύτταρο για την αντιγραφή, η οποία λαμβάνει χώρα μόνο σε τελικώς διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα και όχι σε άλλους τύπους κυττάρων.

Οι HPV είναι ιοί χωρίς φάκελο με καψίδιο εικοσαεδρικής δομής που αντιγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή.

Το DNA του ιού βρίσκεται συνδεδεμένο με κυτταρικές ιστόνες και σχηματίζει σύμπλοκα παρόμοια με την χρωματίνη.

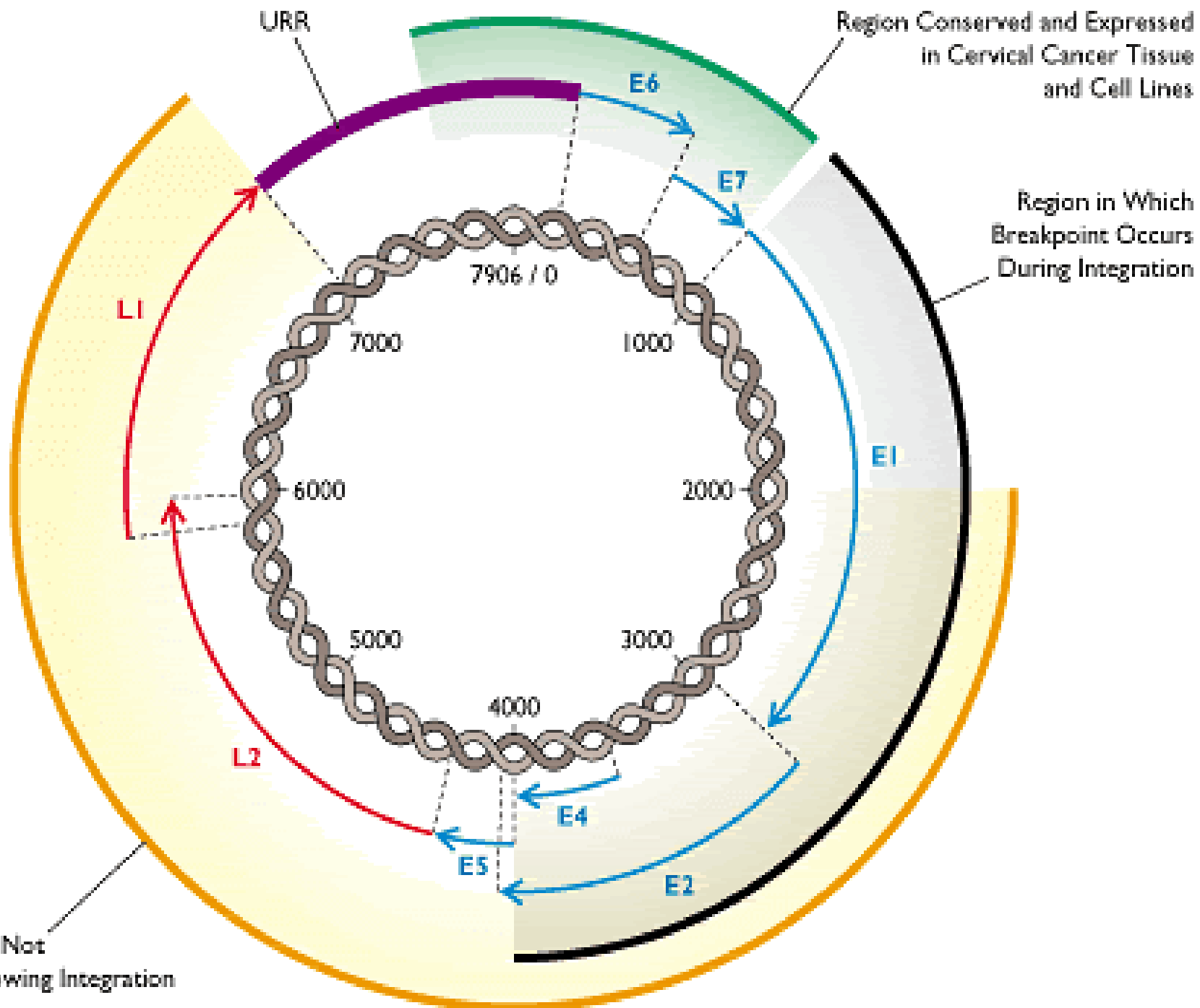
Το γένωμα τους περιέχει περίπου 8 ORFs τα οποία εκφράζονται από πολυκιστρονικά mRNA που μεταγράφονται μόνο από τον ένα κλώνο DNA.

**Στους HPV υψηλού κινδύνου έχουν αναγνωριστεί δυο σημαντικοί εκκινητές εκ των οποίων:**

**Ο ένας βρίσκεται upstream του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις πρώιμες πρωτεΐνες (HPV 16 και 31 → p97 ενώ HPV 18 → p105).**

**Ο 2ος εκκινητής βρίσκεται downstream του E6 ORF και κωδικοποιεί για τις όψιμες πρωτεΐνες (πρωτεΐνες καψιδίου) περίπου στη θέση 742 → στον HPV 31**



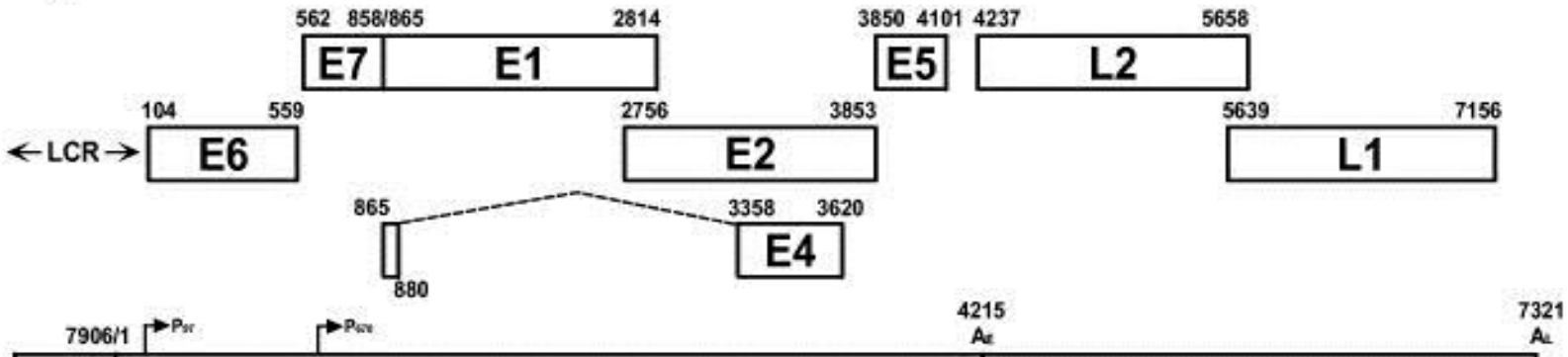


Region Conserved and Expressed in Cervical Cancer Tissue and Cell Lines

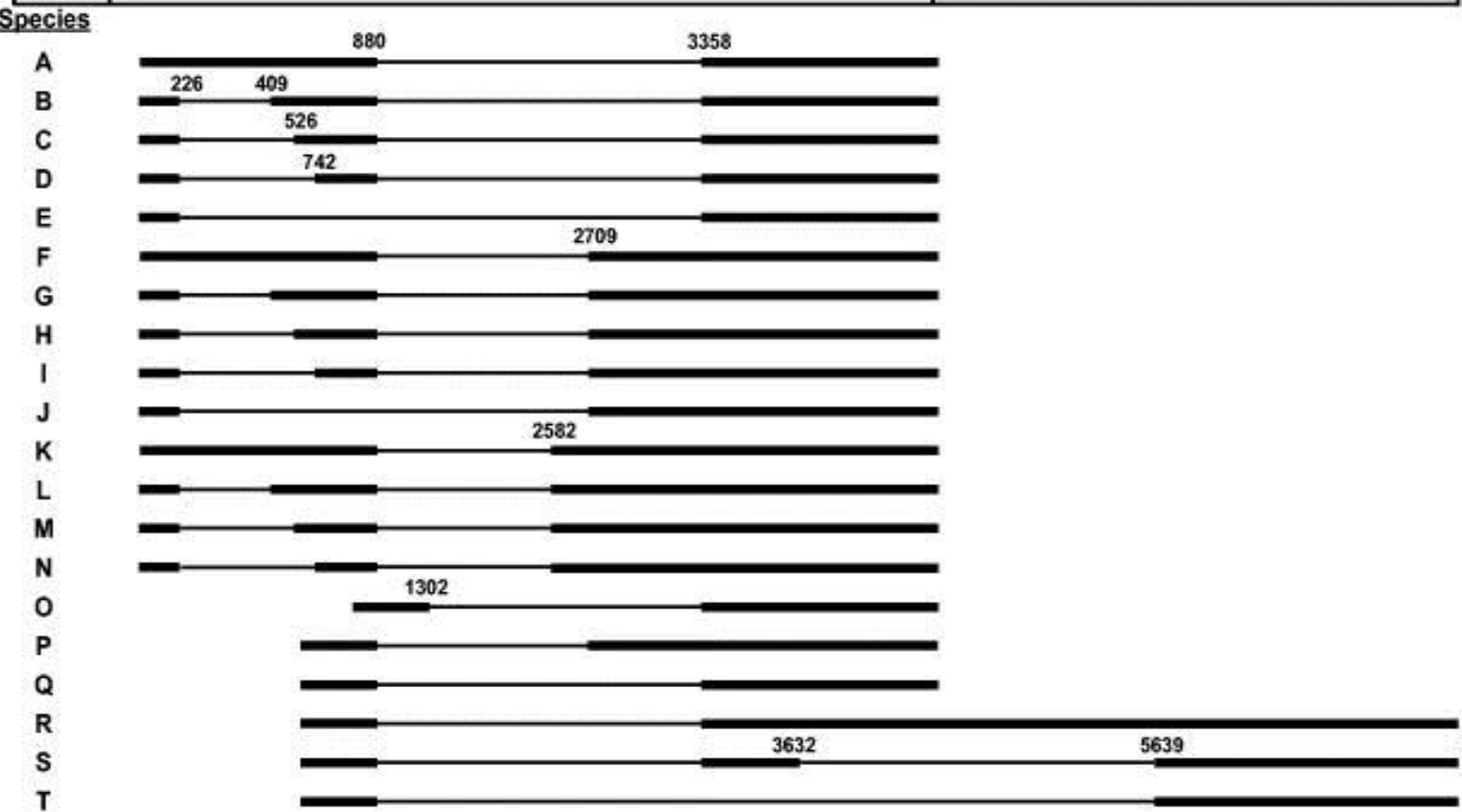
Region in Which Breakpoint Occurs During Integration

Region Lost or Not Expressed Following Integration

**Fig. 2**



1  
2  
3  
|  
F  
R  
A  
M  
E



**Coding Potential**

E6, E7, E1<sup>^</sup>E4, E5  
 E6<sup>^</sup>I, E7, E1<sup>^</sup>E4, E5  
 E6<sup>^</sup>II, E7, E1<sup>^</sup>E4, E5  
 E6<sup>^</sup>E7, E1<sup>^</sup>E4, E5  
 E6<sup>^</sup>III, E5  
 E6, E7, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>I, E7, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>II, E7, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>E7, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>IV, E2, E5  
 E6, E7, E1C, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>I, E7, E1C, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>II, E7, E1C, E2, E5  
 E6<sup>^</sup>E7, E1C, E2, E5  
 E2C, E5  
 E1<sup>^</sup>, E2, E5  
 E1<sup>^</sup>E4, E5  
 E1<sup>^</sup>E4, E5, L2, L1  
 E1<sup>^</sup>E4, L1  
 L1

# Γενωμικός Χάρτης και Χάρτης Μεταγραφής του HPV16

Ο χάρτης παρουσιάζει μια ευθύγραμμη απεικόνιση του γενώματος για λόγους απλούστευσης.

Τα βέλη δηλώνουν την θέση των επαγωγέων P97 και P670 για τα πρώιμα E (Early) και όψιμα L (Late) γονίδια του ιού αντίστοιχα και οι θέσεις AE και AL, θέσεις πολυαδενυλίωσης για τα πρώιμα E (Early) και όψιμα L (Late) επίσης γονίδια του ιού. Τα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) απεικονίζονται στο άνω μέρος του χάρτη και η αρίθμηση αντιστοιχεί στο 1<sup>ο</sup> νουκλεοτίδιο του κωδικονίου έναρξης και στο τελευταίο νουκλεοτίδιο του κωδικονίου τερματισμού της μετάφρασης. Π.Χ.το E4 ORF απαιτεί για την δημιουργία του την ένωση 2 εξωνίων μέσω ματίσματος (διακεκομμένη γραμμή).

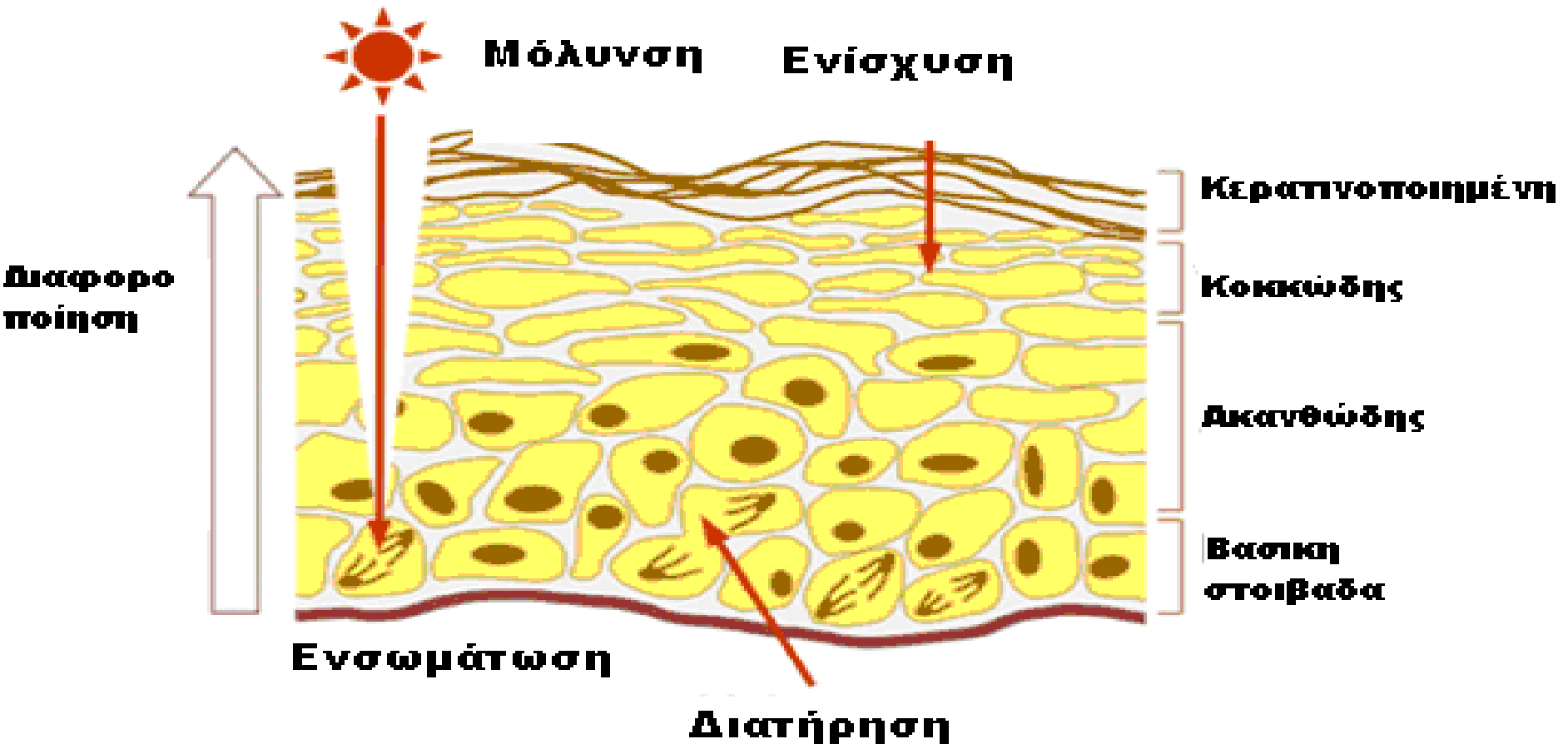
Στο κάτω μέρος του σχήματος απεικονίζονται μια σειρά από εναλλακτικά ματίσματα. Απεικονίζονται με έντονη μαύρη γραμμή τα εξώνια, με λεπτή μαύρη γραμμή τα εσώνια. Η αρίθμηση αντιστοιχεί στο νουκλεοτίδιο δότη (αριστερό άκρο) και νουκλεοτίδιο δέκτη (δεξί άκρο) του ιικού γενώματος.

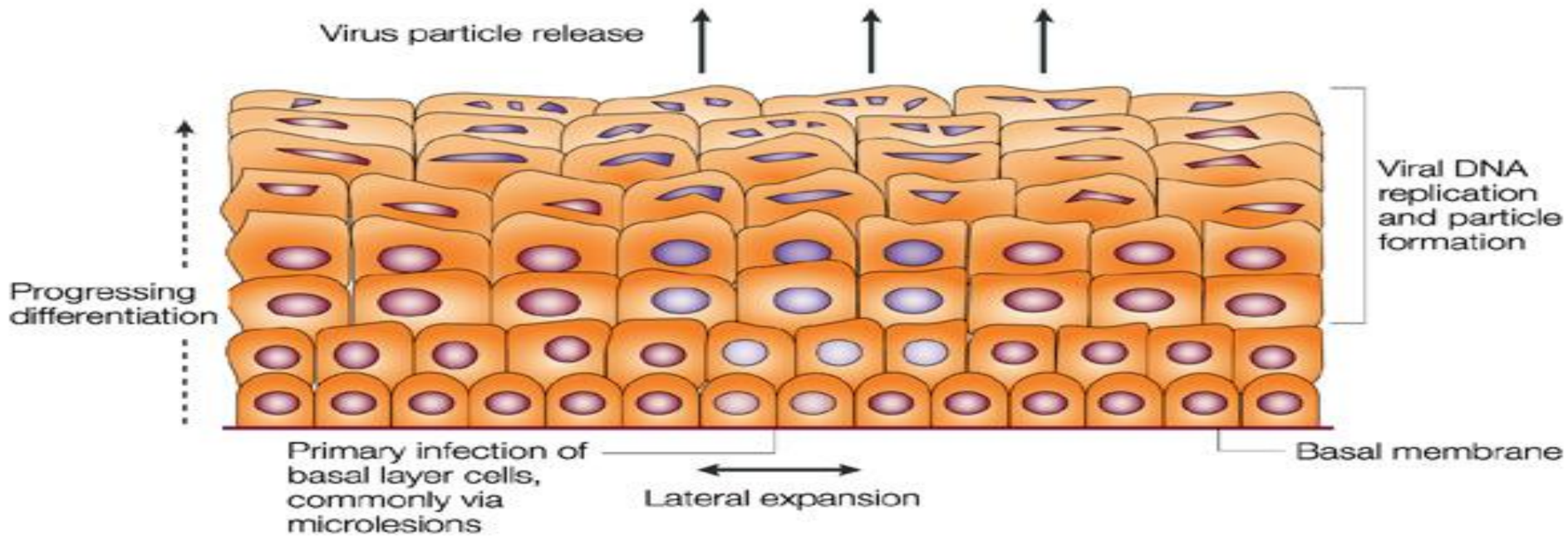
Τα μετάγραφα όλων των πρώιμων γονιδίων ξεκινούν από το νουκλεοτίδιο 97 ενώ τα μετάγραφα των όψιμων γονιδίων από το νουκλεοτίδιο 670.

Η μόλυνση, από τους HPV, συμβαίνει μέσω μικροτραυματισμών του επιθηλίου, εκθέτοντας τα κύτταρα της βασικής στιβάδας στον ιό.

Ο υποδοχέας για την είσοδο του ιού είναι άγνωστος .

Η παραγωγή των ώριμων ιικών σωματιδίων περιορίζεται στα διαφοροποιημένα κύτταρα πάνω από τη βασική στιβάδα. Ο κύκλος ζωής των ιών HPV ακολουθεί το πρόγραμμα διαφοροποίησης των κερατινοκυττάρων του ξενιστή





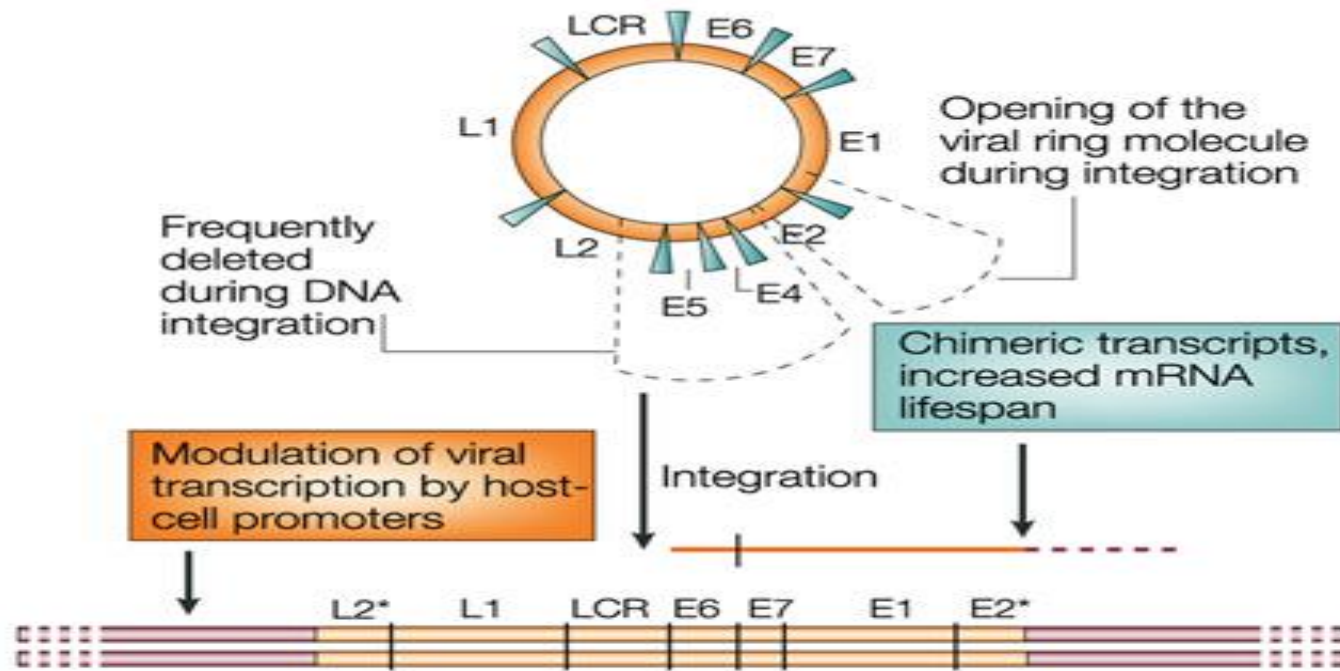
Nature Reviews | Cancer

Η μόλυνση των κυττάρων της βασικής στιβάδας από HPV οδηγεί:

**Στην ενεργοποίηση της έκφρασης ενός καταρράκτη ιικών γονιδίων με αποτέλεσμα την παραγωγή ~20-100 αντιγράφων ιικού DNA ανά κύτταρο.**

**Στην συνέχιση του κυτταρικού κύκλου και στην διατήρηση του πυρήνα σε όλες τις στιβάδες του επιθηλίου. Έχει παρατηρηθεί, ότι το γονιδίωμα του ιού βρίσκεται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή σε δύο μορφές. Μπορεί να είναι ενσωματωμένο στο DNA του κυττάρου, καθώς επίσης μπορεί να βρίσκεται σε μορφή επισώματος, χωρίς να αποκλείεται η ταυτόχρονη παρουσία και των δύο μορφών.**

Η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάρρηξης της συνέχειας του γονιδίου E2 με μεγαλύτερη συχνότητα στην θέση μεταξύ των νουκλεοτιδίων 3243 και 3539. Μελέτες ακόμα έχουν δείξει, ότι σε ορισμένες σπάνιες περιπτώσεις η ενσωμάτωση του ιικού DNA γίνεται μέσω διάσπασης της συνέχειας της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας σε θέσεις του γονιδίου E1, E4 και E5 γονίδια κατά κανόνα χάνονται κατά την ενσωμάτωση.



Το γένωμα των HPV περιέχει 6800 – 8000 ζεύγη βάσεων και διαιρείται σε 8 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης – E6, E7, E1, E2, E4, E5, and L2 and L1 – τα οποία κωδικοποιούν για τις πρώιμες 'early' (E) ή όψιμες 'late' (L) λειτουργίες. Κατά την διάρκεια της ενσωμάτωσης μέρος των γονιδίων E2 και L2 καταστρέφεται ενώ τα γονίδια E4 και E5 χάνονται τελείως. Τα μετάγραφα των E6 και E7 γονιδίων είναι πάντοτε παρόντα και η μεταγραφή τους δύναται να τροποποιηθεί ( αυξηθεί) από παρακείμενους κυτταρικούς επαγωγείς.

LCR, long control region περιοχή όπου προσδένονται πάρα πολύ μεταγραφικοί παράγοντες.

Η επόμενη φάση του πολλαπλασιασμού του ιικού γενώματος συμβαίνει κατά την διαίρεση των κυττάρων της βασικής στοιβάδας στην φάση S. Στην φάση αυτή το ιικό DNA αντιγράφεται μαζί με την αντιγραφή του DNA του κυττάρου ξενιστή, δημιουργώντας δύο αντίγραφα ένα σε κάθε θυγατρικό κύτταρο.

Η τελευταία φάση αντιγραφής του ιικού γενώματος συμβαίνει στα μολυσμένα κύτταρα των ανώτερων στοιβάδων. Σε αυτά τα κύτταρα παρατηρείται έξαρση της αντιγραφής του ιικού γενώματος με σκοπό την σύνθεση του ιικού DNA που θα εισέλθει εντός των νεοσχηματιζόμενων ιικών σωματιδίων .

Τα πρώτα γονίδια τα οποία εκφράζονται μετά από την μόλυνση είναι τα E1 και E2, τα οποία επάγουν την αντιγραφή του DNA, με την πρωτεΐνη E2 να δρά ως μεταγραφικός ενεργοποιητής ή καταστολέας, ρυθμίζοντας την δράση των γονιδίων E6 και E7.

Έχει παρατηρηθεί, ότι γενετικές αλλαγές, όπως είναι η ενσωμάτωση του ιικού γενώματος στο χρωμόσωμα του κυττάρου ξενιστή (απενεργοποίηση του E2) ή μεταλλάξεις στο γονίδιο E2 οδηγούν στην αυξημένη έκφραση των ογκοπρωτεϊνών E6 και E7, που επάγουν τον κυτταρικό μετασχηματισμό .

**Τα ερεθίσματα τα οποία επάγουν την δημιουργία νέων ιών στην όψιμη φάση φαίνεται να εξαρτώνται από αλλαγές στο κυτταρικό περιβάλλον καθώς τα μολυσμένα κύτταρα κινούνται προς την επιθηλιακή επιφάνεια. Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων της βασικής στοιβάδας οφείλεται στην έκφραση των ιικών ογκογονιδίων E6 και E7. Η ενεργοποίηση αυτών των γονιδίων επιτρέπει στα μολυσμένα κύτταρα να πολλαπλασιάζονται με γρήγορους ρυθμούς και τα μολυσμένα κερατινοκύτταρα χάνουν την δυνατότητα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου καθώς επίσης και την ιδιότητα τους να διαφοροποιούνται.**

**Στα αδιαφοροποίητα κερατινοκύτταρα εκφράζονται έξι μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες (E1,E2,E4,E5,E6, και E7) από την πρώιμη περιοχή του ιικού γενώματος.**

**Τα έξι πρώιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης των γονιδίων E1 E2 E4 E5 και E6 E7 βρίσκονται υπό τον άμεσο έλεγχο του πρώιμου μεταγραφικού ενεργοποιητή (p97 για τον HPV-16 & HPV 31 και p105 για τον HPV 18). Ο παράγοντας p97 εντοπίζεται ανοδικά του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του E6 και είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση όλων των πρώιμων γονιδίων.**

**Από την άλλη πλευρά στα διαφοροποιημένα κερατινοκύτταρα εκφράζονται από την όψιμη περιοχή του ιικού γενώματος οι καψιδιακές πρωτεΐνες L1 και L2, οι οποίες είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό του ιικού καψιδίου και το πακετάρισμα του ιικού γενώματος στα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια.**

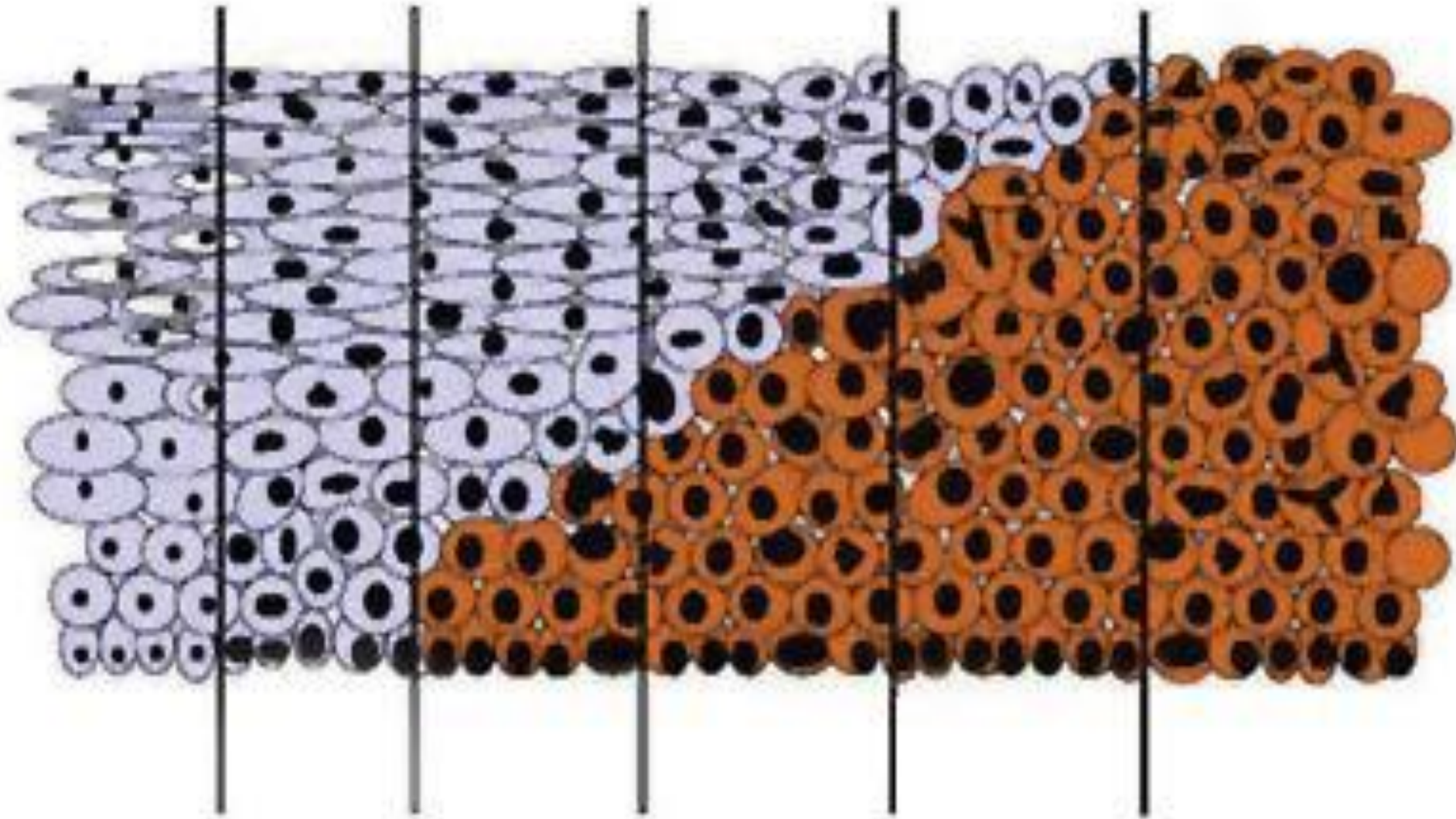
**Τα όψιμα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης L1 και L2 βρίσκονται υπό τον έλεγχο του μεταγραφικού ενεργοποιητή p670. Ο παράγοντας αυτός βρίσκεται εντός του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης του γονιδίου E7 και είναι υπεύθυνος για την έκφραση όλων των όψιμων ιικών γονιδίων.**



**Η συναρμολόγηση των νέων μολυσματικών ιικών σωματιδίων στην ανώτερη επιθηλιακή στοιβάδα απαιτεί την παρουσία των καψιδιακών πρωτεϊνών L1,L2 καθώς συμβάλουν στην τοποθέτηση του ιικού γενώματος εντός των καψιδίων. Έχει παρατηρηθεί ότι η καψιδιακή πρωτεΐνη L2 εντοπίζεται στον πυρήνα ενώ η καψιδιακή πρωτεΐνη L1 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και είναι υπεύθυνη, για τον σχηματισμό των L1 πενταμερών, που είναι η βασική δομική μονάδα του καψιδίου των HPV .**

**Η ωρίμανση των ιικών σωματίων συμβαίνει όταν τα μολυσμένα από τον ιό κύτταρα ανέρθουν στην επιθηλιακή στοιβάδα. Τελικά ο ιός απελευθερώνεται από το κερατινοποιημένο κάλυμμα που έχει σχηματιστεί στην κυτταρική επιφάνεια. Ο HPV δεν προκαλεί λύση των μολυσμένων κερατινοκυττάρων . Στην διαδικασία αυτή ίσως εμπλέκεται η πρωτεΐνη E1^E4. Η πρωτεΐνη αυτή αλληλεπιδρά και καταστρέφει το δίκτυο ινιδίων κερατίνης, που αναπτύσσεται στην επιφάνεια των μολυσμένων κερατινοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αποδεσμεύονται και να απελευθερώνονται τα νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματία από το κύτταρο. Οι αρχικές αλλοιώσεις στο επιθήλιο, που ιστολογικά ταξινομούνται ως CIN1, σχετίζονται με συνεχή αναπαραγωγή και διείσδυση του ιού. Η μετάπτωση σε μεγαλύτερου βαθμού δυσπλασίες (CIN 2,3) και τελικά σε καρκίνο σχετίζεται συνήθως με τη μετάπτωση του ιικού γονιδιώματος από επισωματική σε ενσωματωμένη μορφή. Η ενσωμάτωση του γενετικού υλικού του ιού στο γονιδίωμα του κυττάρου ξενιστή από μόνη της δεν αρκεί για την κακοήθη εξαλλαγή. Η κακοήθης εξαλλαγή είναι ένα πολύπλοκο γεγονός στο οποίο συμβάλλουν και πολλοί άλλοι παράγοντες.**

Φυσιολογικό ΜΟΛΥΝΣΗ CIN 1 HPV+ CIN 2 HPV + CIN2/3 HPV + CIN 3 HPV+

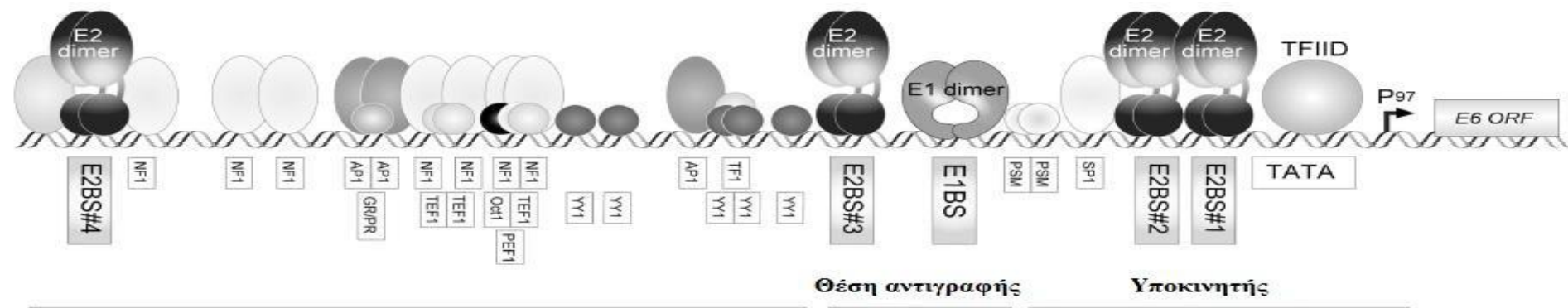


# Ρόλος των ιικών Πρωτεϊνών

## E2:

Πρωτεΐνη πρόσδεσης στο DNA σε εξειδικευμένες αλληλουχίες και στρατολόγηση της E1 στην αφετηρία έναρξης αντιγραφής ⇒ δημιουργία συμπλόκου ⇒ στρατολόγηση DNA πολυμεράσης και άλλων πρωτεϊνών με σκοπό την έναρξη της αντιγραφής

Ρόλο στη ρύθμιση της μεταγραφής του ιικού γενώματος από τον πρώιμο επαγωγέα.



## E1:

Δραστικότητα 3'-5' ελικάσης

Δραστικότητα ATPάσης

## E6 και E7:

Όγκοπρωτεΐνες στους HPV υψηλού κινδύνου αλλά όχι στους HPV χαμηλού κινδύνου.

## E4 και E5:

Ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών

## L1 και L2

Εκφράζονται κατά την όψιμη φάση και σχηματίζουν τα καψίδια.

**Σε μολύνσεις χαμηλού βαθμού το γένωμα των HPV υψηλού κινδύνου είναι σαν επίσωμα ενώ κατά την πρόοδο σε καρκίνωμα ενσωματώνεται στο γένωμα του κυττάρου (συνήθως στο E2 ORF) ⇒ υπερέκφραση των E6 και E7.**

**Ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των HPV**

**Δύο κύριοι επαγωγείς κατευθύνουν την έκφραση των ORFs των HPV κατά τη διάρκεια των πρώιμων και όψιμων σταδίων του κύκλου ζωής τους.**

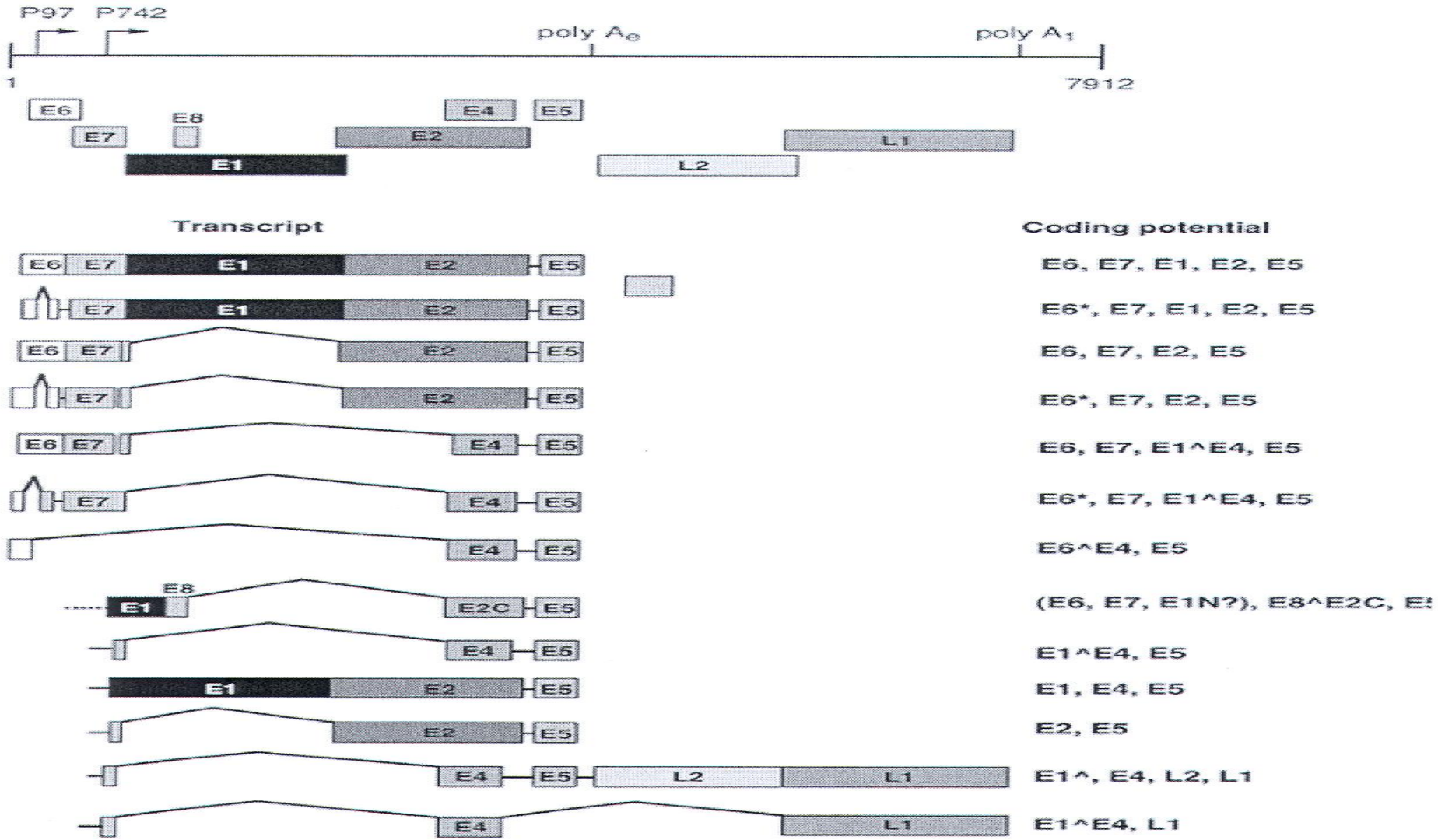
**Η έκφραση των πρώιμων γονιδίων ρυθμίζεται εν μέρει με το εναλλακτικό μάτισμα.**

**Ο κύριος επαγωγέας (P97) των HPV υψηλού κινδύνου κατευθύνει την μεταγραφή σε σημεία upstream του E6 ORF.**

**Παράγοντες μεταγραφής που ελέγχουν τον πρώιμο επαγωγέα προσδέονται σε μια περιοχή μεγέθους 1Kb που βρίσκεται upstream του E6 ORF και ονομάζεται URR ή LCR (upstream regulator region ή longue control region).**

**Κάποιες τέτοιες θέσεις πρόσδεσης είναι κοινές σε όλους τους HPV τύπους ενώ κάποιες άλλες είναι μοναδικές (π.χ η πρόσδεση των Sp-1 και AP-1 παραγόντων upstream των TATA boxes είναι κοινές σε όλους τους HPV).**

**Η μεταγραφή των όψιμων γονιδίων ενεργοποιείται κατά τη διαφοροποίηση των επιθηλιακών κυττάρων σε σημεία έναρξης μέσα στο E7 ORF (P742).**



## Χάρτης μεταγραφής του ιού HPV 31 .

Τα μετάγραφα τα οποία εκκινούν από τον πρώιμο επαγωγέα P97 εκφράζονται στα μη τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα της βασικής επιθηλιακής στοιβάδας , ενώ τα μετάγραφα τα οποία εκκινούν από την θέση P742 ή P670 εκφράζονται στα κύτταρα τα οποία μπορούν να υποστηρίξουν την αντιγραφή , το πακετάρισμα και τέλος την απελευθέρωση των ώριμων ιϊκών σωματιδίων.

(A)



p97



p670



(B)



E4  
E4/L1

E4

E7/E4

E7

Virus Release

Packaging

Genome  
Amplification

Proliferation

Genome  
Maintenance

## **ΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΠΟ ΤΟΝ ΗΡV16**

**Το διαφοροποιούμενο επιθήλιο απεικονίζεται στο αριστερό άκρο της εικόνας ενώ η έκφραση των γονιδίων απεικονίζεται στο δεξί άκρο της εικόνας.**

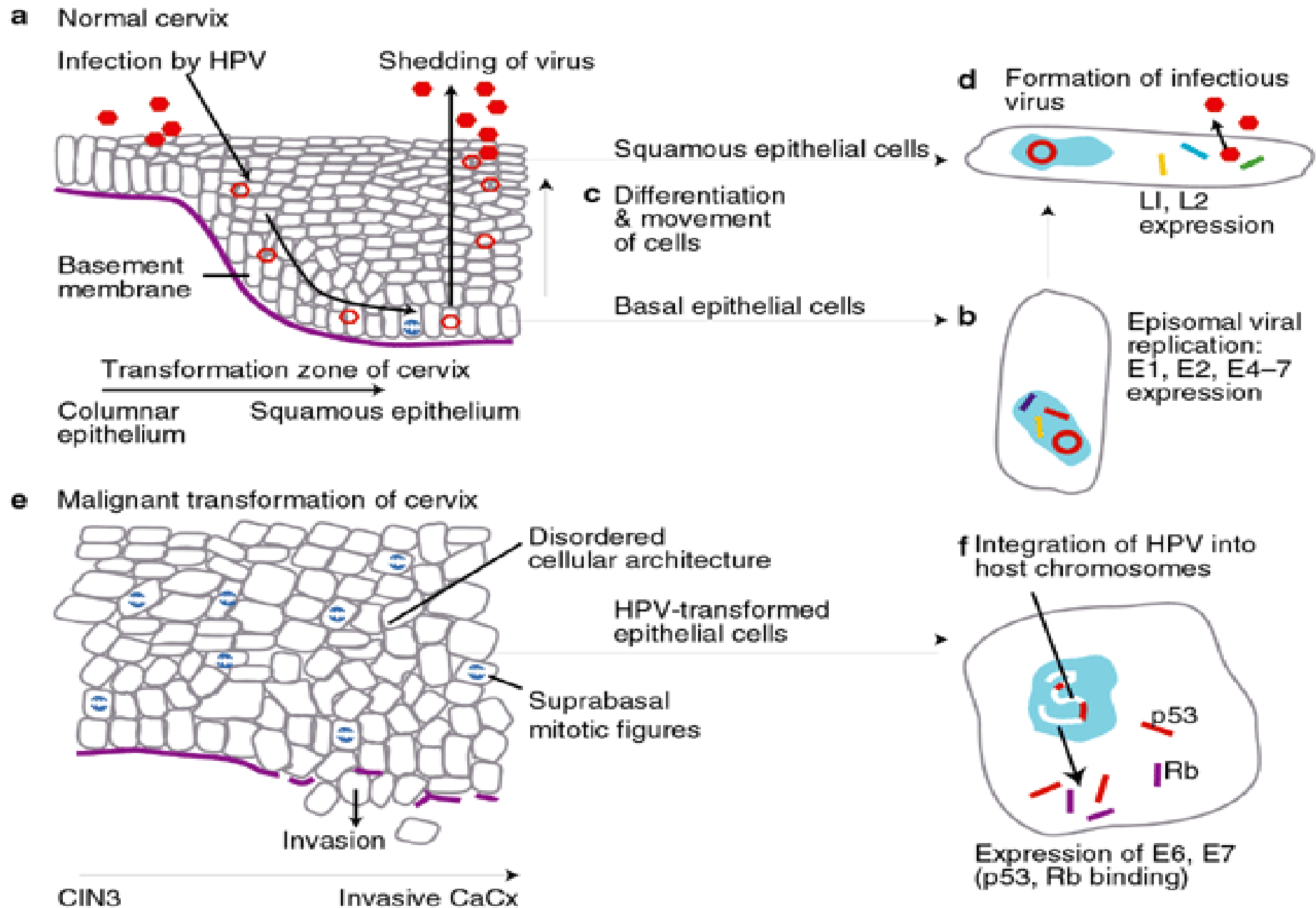
**Ο ιός εισέρχεται μέσω μικροτραυματισμού στην βασική στοιβάδα του επιθηλίου και εγκαθίσταται υπό μορφή επισώματος. Τα κύτταρα (στην απεικόνιση με τον κόκκινο πυρήνα) εκφράζουν τις πρωτείνες E6 και E7 από τον επαγωγέα P97 (κόκκινο βέλος).**

**Τα κύτταρα (στην απεικόνιση με μπλέ πυρήνα) εκφράζουν τα μη μολυσμένα κύτταρα.**

**Η έκφραση των γονιδίων τα οποία απεικονίζονται με το πράσινο βέλος επάγεται κυρίως από τον επαγωγέα P670 καθώς η έκφραση των γονιδίων E6 και E7 παύει.**

**Τα κύτταρα με το πράσινο χρώμα στην απεικόνιση εκφράζουν την E4 πρωτεΐνη καθώς και τα προϊόντα όλων των πρώιμων γονιδίων τα οποία απαιτούνται για αντιγραφή του ιού.**

**Η έκφραση των καψιδιακών πρωτεϊνών ( με πορτοκαλί βέλος) ακολουθεί την ολοκλήρωση της αντιγραφής του ιού και λαμβάνει χώρα σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν την E4 πρωτεΐνη.**



**Human papillomavirus infection & replication in cervical epithelial cells**  
 Expert Reviews in Molecular Medicine



## **Λειτουργίες της E6 ογκοπρωτεΐνης**

Η E6 έχει περίπου 150 αα και περιέχει δύο περιοχές πρόσδεσης Zn με το μοτίβο Cys-X-X-Cys.

Εντοπίζεται σε πυρήνα και κυτταρόπλασμα και προσδένεται σε περισσότερες από 12 διαφορετικές πρωτεΐνες εκ των οποίων η πιο σημαντική είναι η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53.

Η p53 ρυθμίζει την έκφραση πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου όπως της p21 (αναστολέας κινάσης κυκλίνης).

Σε περίπτωση μόλυνσης από HPV υψηλού κινδύνου παρεμποδίζεται η προαποπτωτική δραστηριότητα της p53 με αποτέλεσμα την ακύρωση των G1/S και G2/M σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, την διαιώνιση των DNA βλαβών (όπως χρωμοσωμικοί αναδιπλασιασμοί ) και την αυξημένη πιθανότητα καρκινογένεσης.

## **Λειτουργίες της E7 ογκοπρωτεΐνης**

Βρίσκεται κυρίως στον πυρήνα και είναι περίπου 100 αα.

Κύρια δράση της είναι η αλληλεπίδρασή της με πρωτεΐνες της οικογένειας Rb.

Η Rb παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου.

Στην μη-φωσφορυλιωμένη μορφή της σχηματίζει σύμπλοκο με τους μεταγραφικούς παράγοντες E2F/DP1 → μέσω στρατολόγησης της HDAC αναστέλλεται η μεταγραφή γονιδίων που ευθύνονται για την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου → έξοδος κυττάρου από τον κυτταρικό κύκλο → διαφοροποίηση και τελικά απόπτωση.

Κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου από την G1 στην S, η Rb φωσφορυλιώνεται μέσω συμπλόκων κυκλίνης-κινάσης → ελευθέρωση της Rb από το σύμπλοκο → μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την σύνθεση του DNA.

Παρουσία της E7 η Rb απομακρύνεται από σύμπλοκο λόγω πρόσδεσής της στην E7 → συνεχής ενεργοποίηση των αντίστοιχων γονιδίων → συνεχής πρόοδος του κυτταρικού κύκλου → παραγωγικός πολλαπλασιασμός των κυττάρων των ανώτερων στιβάδων.

## **ΑΔΕΝΟΙΟΙ**

Εφαρμόζουν ποικίλους μηχανισμούς για την ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων τους. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν trans-acting μεταγραφικούς ενεργοποιητές όπως την πρωτεΐνη E1A, και μετα-μεταγραφική ρύθμιση της έκφρασης, η οποία επιτυγχάνεται από εναλλακτικό μάτισμα των mRNAs και των κωδικοποιούμενων από τον ιό VA (virus - associated) RNAs.

**Η μόλυνση των κυττάρων από τον αδενοϊό διαιρείται σε δύο στάδια, στην πρώιμη και την όψιμη φάση , η τελευταία φάση συμβαδίζει με την αντιγραφή του γενώματος του ιού.**

Τα πρώιμα γονίδια κωδικοποιούν trans-acting ρυθμιστικές πρωτεΐνες που εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση. Οι πρώτες πρωτεΐνες που εκφράζονται E1A και E1B, κωδικοποιούνται από μια μεταγραφική μονάδα στο r-strand στο αριστερό άκρο του γενώματος του αδενοϊού .

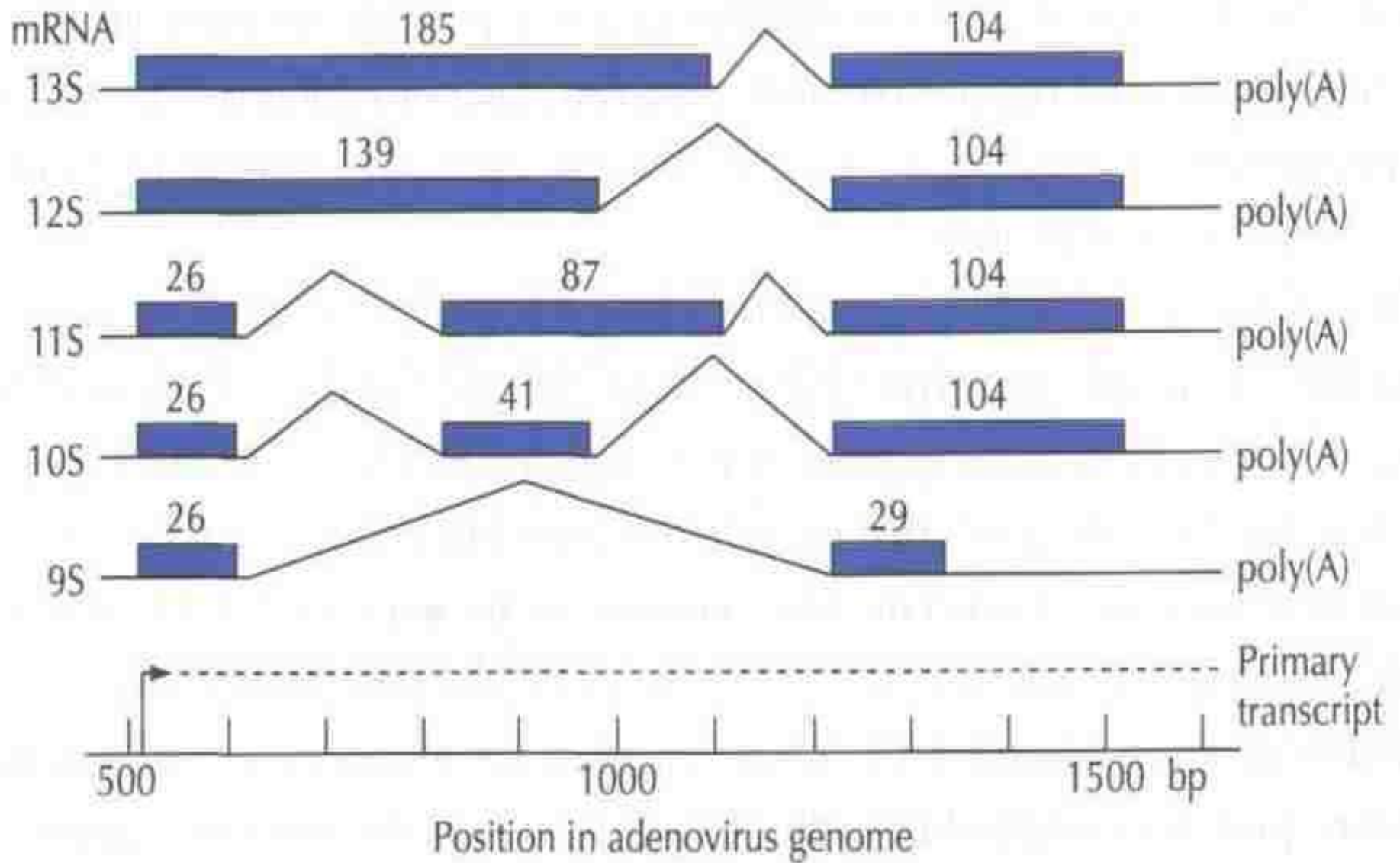
Αυτές οι πρωτεΐνες είναι trans - ρυθμιστικές πρωτεΐνες , αλλά εμπλέκονται επίσης και στον μετασχηματισμό των κυττάρων που έχουν μολυνθεί από αδενοϊό.

Παράγονται πέντε ματισμένα mRNAs που φέρουν polyA ουρά (13S, 12S, 11S, 10S, 9S) τα οποία κωδικοποιούν πέντε E1A πολυπεπτίδια (των 289, 243, 217, 171 και 55 αμινοξέων αντίστοιχα ).

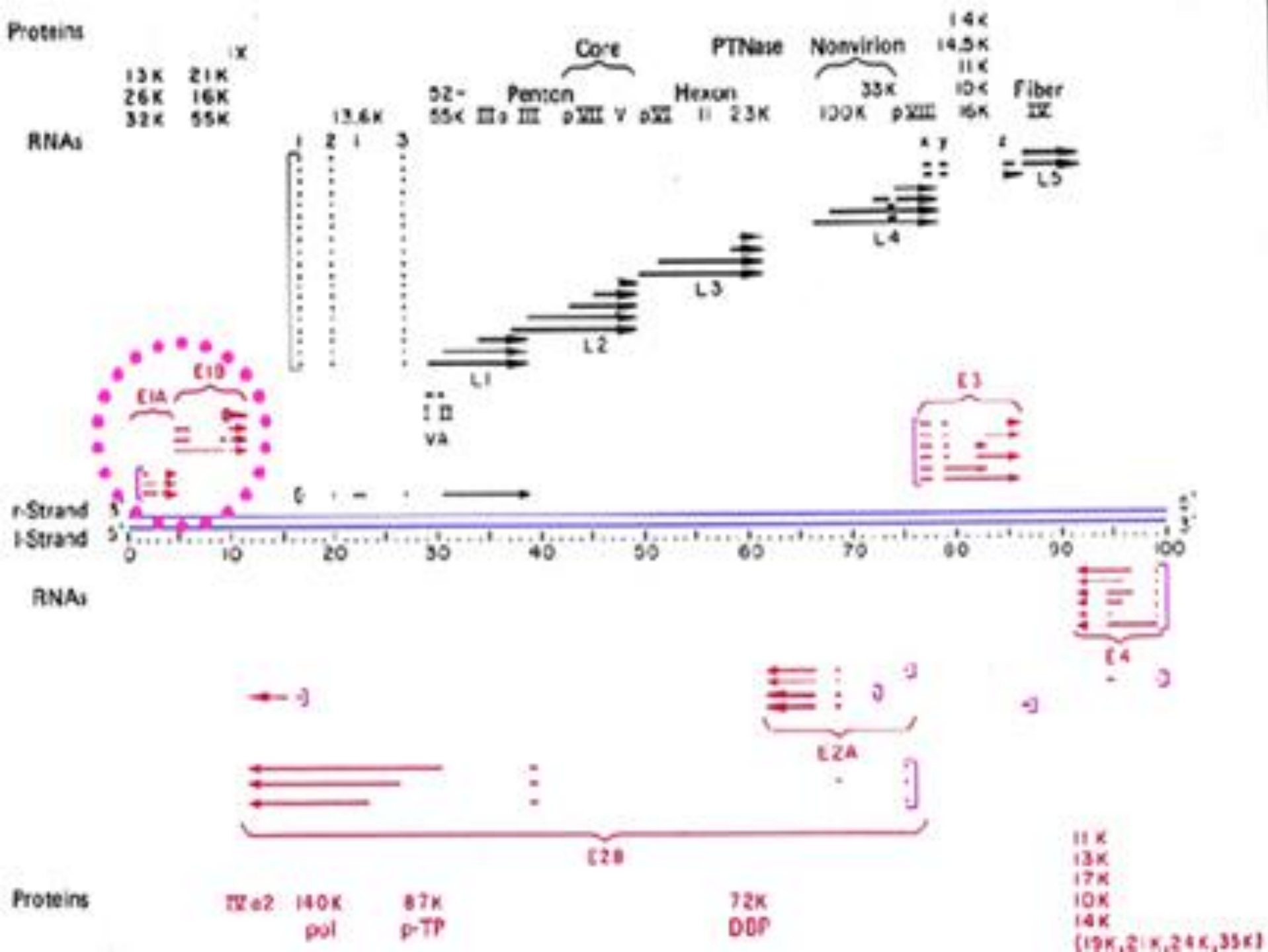
Όλες αυτές οι πρωτεΐνες μεταφράζονται από το ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο και έχουν τα ίδια αμινο- και καρβοξύ - τελικά άκρα.

Οι διαφορές μεταξύ τους είναι λόγω του εναλλακτικού ματίσματος της E1A μεταγραφικής μονάδας και οι οποίες καταλήγουν σε βασικές διαφορές στις λειτουργίες τους. Τα πεπτίδια των 289 και 243 αμινοξέων είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές.

Παρόλο που αυτές οι πρωτεΐνες ενεργοποιούν την μεταγραφή σε όλους τους πρώιμους επαγωγείς του αδενοϊού, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις ότι τα πεπτίδια αυτά προσδένονται απευθείας στο DNA.



**Η E1A μπορεί και να ενεργοποιήσει και να καταστείλει την μεταγραφή.**



Η σύνθεση της E1A ενεργοποιεί ένα καταρράκτη μεταγραφικής ενεργοποίησης μέσω της ενεργοποίησης της μεταγραφής των άλλων πρώιμων γονιδίων του αδενοϊού, E1B, E2, E3 και E4 .

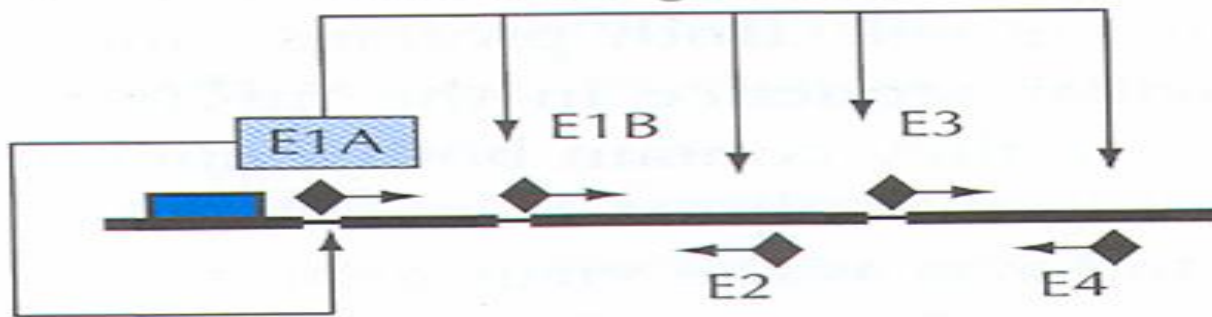
Η μεταγραφή της E1A από μόνη της είναι ένα ισορροπημένο, αυτορυθμιζόμενο σύστημα.

Τα άμεσα πρώιμα γονίδια των DNA ιών τυπικά έχουν ισχυρά στοιχεία επαύξησης των επαγωγέων τους και αυτό γιατί σε ένα προσφάτως μολυσμένο κύτταρο, δεν υπάρχουν πρωτεΐνες του ιού και ο επαυξητής απαιτείται για την αρχική έκφραση του γενώματος του ιού.

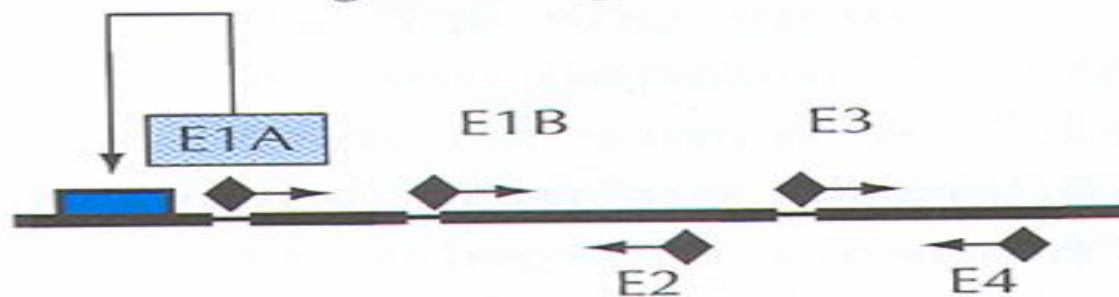
Οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες που συνθέτονται είναι μεταγραφικοί ενεργοποιητές που ενεργοποιούν την έκφραση και των άλλων γονιδίων του ιού, και η E1A λειτουργεί ακριβώς κατά αυτόν τον τρόπο.

Ωστόσο, παρόλο που η E1A trans - ενεργοποιεί τον επαγωγέα της , η πρωτεΐνη καταστέλει επίσης την λειτουργία του επαυξητή της και έτσι σε μεγάλες συγκεντρώσεις, αυτορυθμίζει την έκφρασή της.

Early gene expression:  
Positive regulation



Late gene expression:  
Negative regulation



■ Enhancer element    ◆ Promoters    → RNA transcripts

Το επόμενο στάδιο στο οποίο η έκφραση μπορεί να ρυθμιστεί είναι κατά την διάρκεια της εξαγωγής του mRNA από τον πυρήνα και κατά την διάρκεια της μετάφρασης που γίνεται στο κυτταρόπλασμα.

Τα VA (virus-associated genes) γονίδια κωδικοποιούν δυο μικρά (~160 nt) RNAs που μεταγράφονται από το r-strand του γενώματος από την RNA πολυμεράση III (της οποίας η φυσιολογική λειτουργία είναι να μεταγράφει παρόμοια μικρά RNAs όπως τα 5S ριβοσωμικά RNA και τα tRNAs).

Ο ευκαρυωτικός πυρήνας περιέχει τρία τέτοια ένζυμα: την RNA πολυμεράση I, την RNA πολυμεράση II, και την RNA πολυμεράση III.

Η RNA πολυμεράση I συνθέτει τους περισσότερους τύπους του rRNA.

Η RNA πολυμεράση II συνθέτει όλα τα mRNA και η RNA πολυμεράση III συνθέτει tRNA και 5S rRNA.

Αιτία αυτής της εξειδίκευσης είναι ότι κάθε τύπος RNA πολυμεράσης αναγνωρίζει μόνον εκείνους τους υποκινητές που εμφανίζονται με την ειδική τάξη γονιδίων.

Αμφότερα τα VA RNA I και τα VA RNA II παρουσιάζουν έντονη δευτεροταγή δομή και κανένα μόριο δεν κωδικοποιεί για κάποιο πολυπεπτίδιο ενώ υψηλά επίπεδα αυτών των VA συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων με αδενοϊό κυττάρων .

Η μόλυνση των κυττάρων από κάποιο ιό ενεργοποιεί την παραγωγή ιντερφερόνης. Μια από τις δράσεις των ιντερφερονών είναι να ενεργοποιήσουν μια κυτταρική πρωτεϊνική κινάση , γνωστή ως PKR , η οποία εμποδίζει την έναρξη της μετάφρασης των ιϊκών mRNAs. Τα αποτελέσματα των ιντερφερονών στα μολυσμένα κύτταρα είναι κυρίως η παρεμπόδιση της μετάφρασης των ιϊκών mRNAs.

Το VA RNA I προσδένεται στην κινάση , αποτρέποντας την ενεργοποίησή της και έτσι δεν καταστέλλει την μετάφραση των ιϊκών mRNAs . Τα VA RNAs προωθούν επιλεκτικά την μετάφραση των mRNAs του αδενοϊού εις βάρος των κυτταρικών mRNAs των οποίων η μετάφραση συνεχίζει να παρεμποδίζεται

# HERPESVIRUSES

Κωδικοποιούν πολλά ένζυμα που περιλαμβάνονται στον μεταβολισμό του DNA (π.χ. θυμιδίνη κινάση - thymidine kinase) και πολλούς trans-acting παράγοντες που ρυθμίζουν την χρονική έκφραση των γονιδίων του ιού, ελέγχοντας τις φάσεις της μόλυνσης. Η μεταγραφή του μεγάλου και σύνθετου γενώματος ρυθμίζεται με έναν τρόπο τύπου «καταρράκτη».

Περισσότερες από 50 κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες του ιού παράγονται μετά την μεταγραφή του γενώματος από την RNA πολυμεράση II του κυττάρου ξενιστή

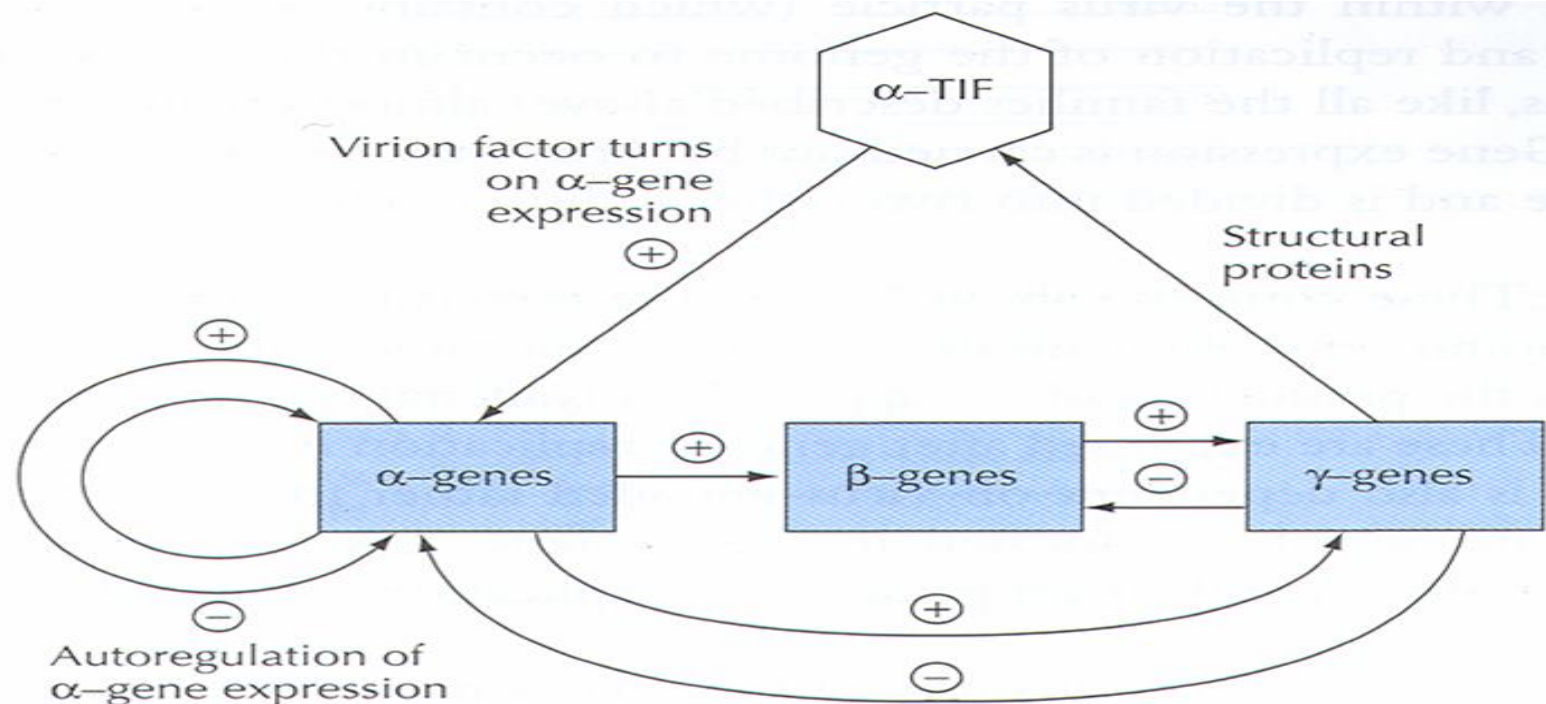


Τρεις διακριτές τάξεις m RNAs δημιουργούνται:

α: Αμέσως- πρώιμα (IE) mRNAs κωδικοποιούν πέντε trans-acting ρυθμιστές της μεταγραφής του ιού.

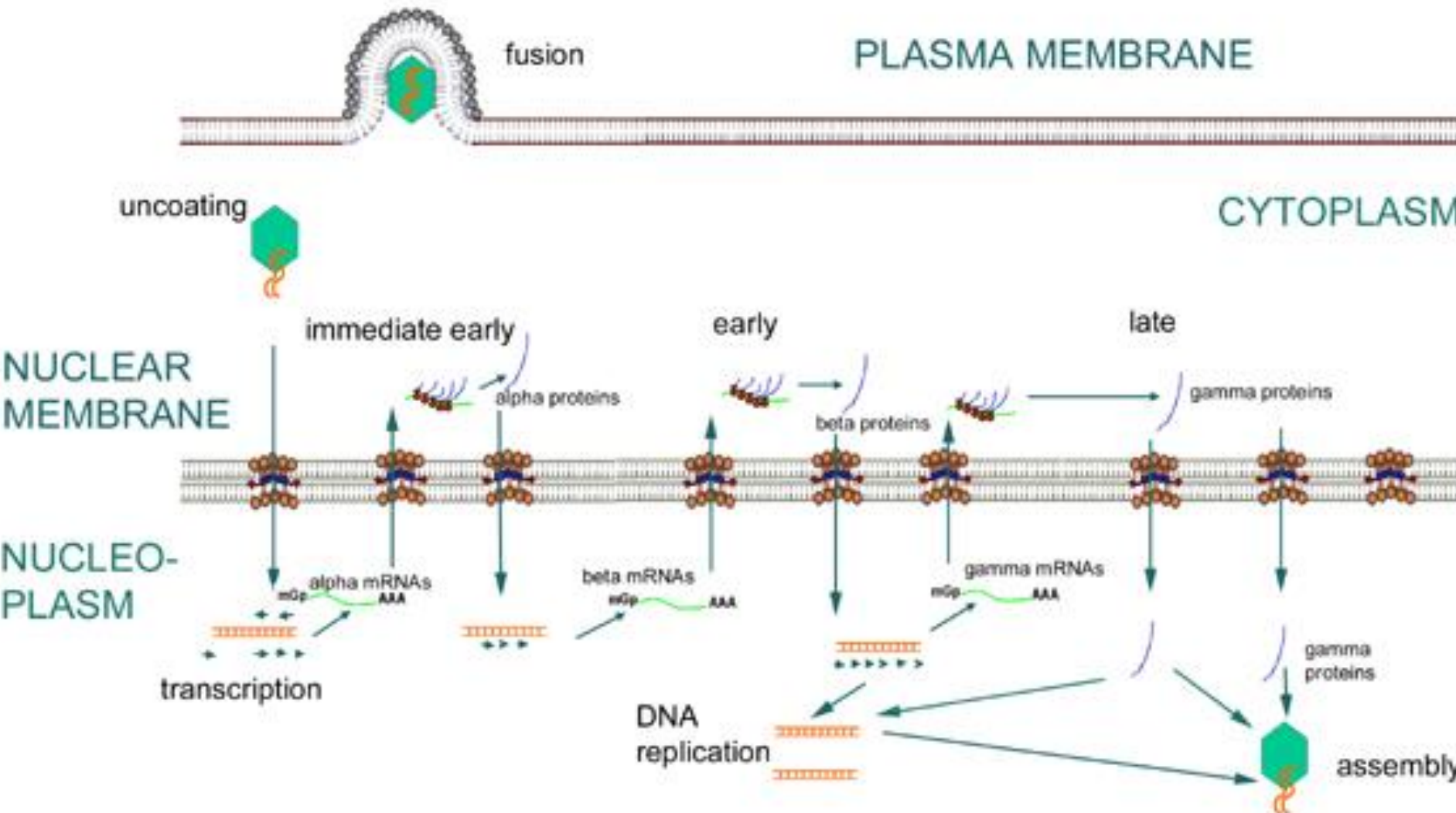
β: Πρώιμα m RNAs κωδικοποιούν κυρίως για μη δομικές ρυθμιστικές πρωτεΐνες και μερικές δομικές πρωτεΐνες.

γ: Καθυστερημένα mRNAs κωδικοποιούν τις βασικές δομικές πρωτεΐνες.



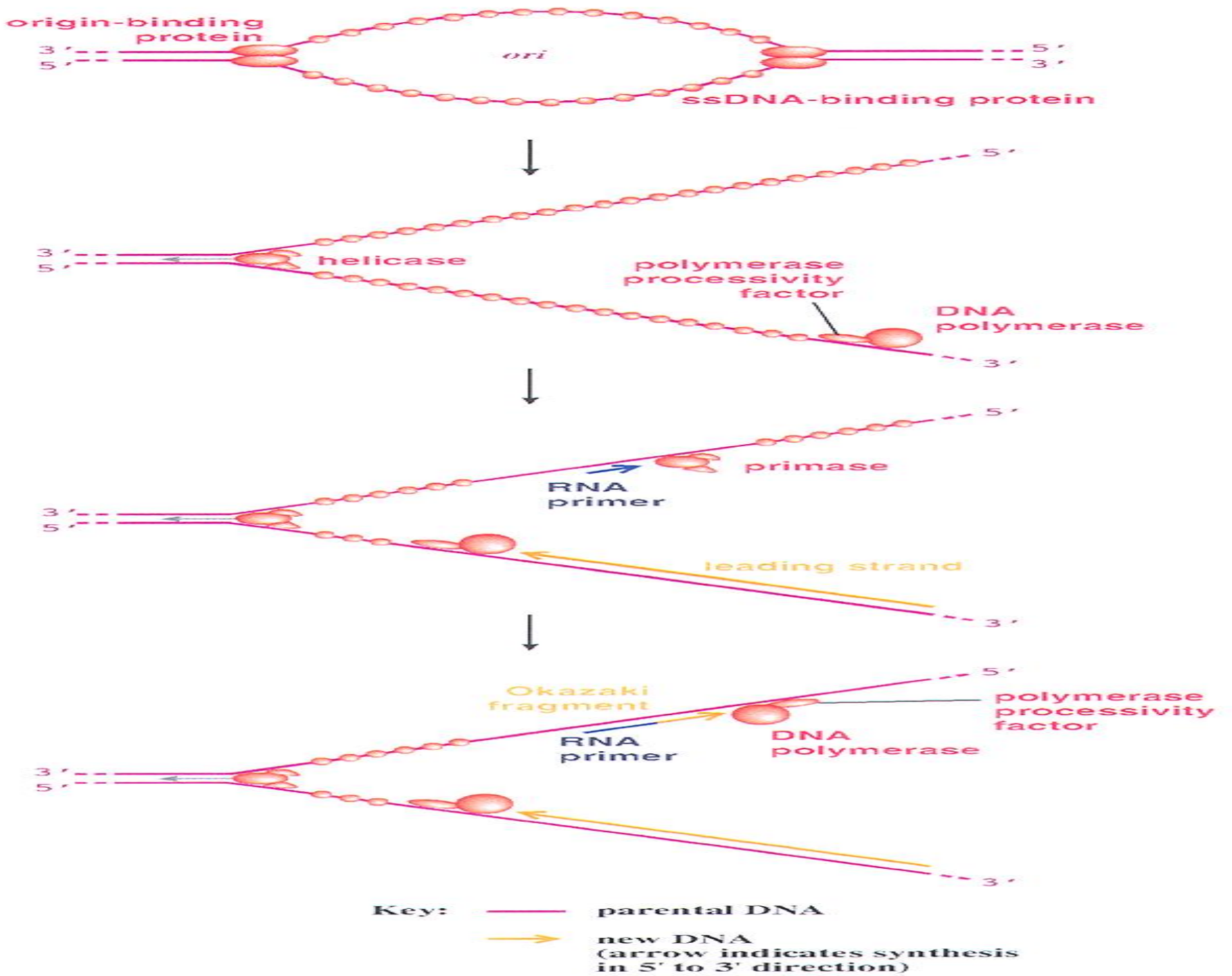
Τα ιικά σωματίδια των ερπητοιών περιέχουν την πρωτεΐνη  $\alpha$ -TIF ( $\alpha$ -gene transcription initiation factor) η οποία διεγείρει την έκφραση των  $\alpha$ -γονιδίων στα μολυσμένα κύτταρα .

Αμφότερες οι αμέσως- πρώιμες και οι πρώιμες πρωτεΐνες απαιτούνται για την έναρξη της αντιγραφής του γενώματος. Μια ιική DNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση και μια ιική DNA προσδέουσα πρωτεΐνη εμπλέκονται στην αντιγραφή του γενώματος, μαζί με πολλά ιικά ένζυμα όπως την θυμιδίνη κινάση .

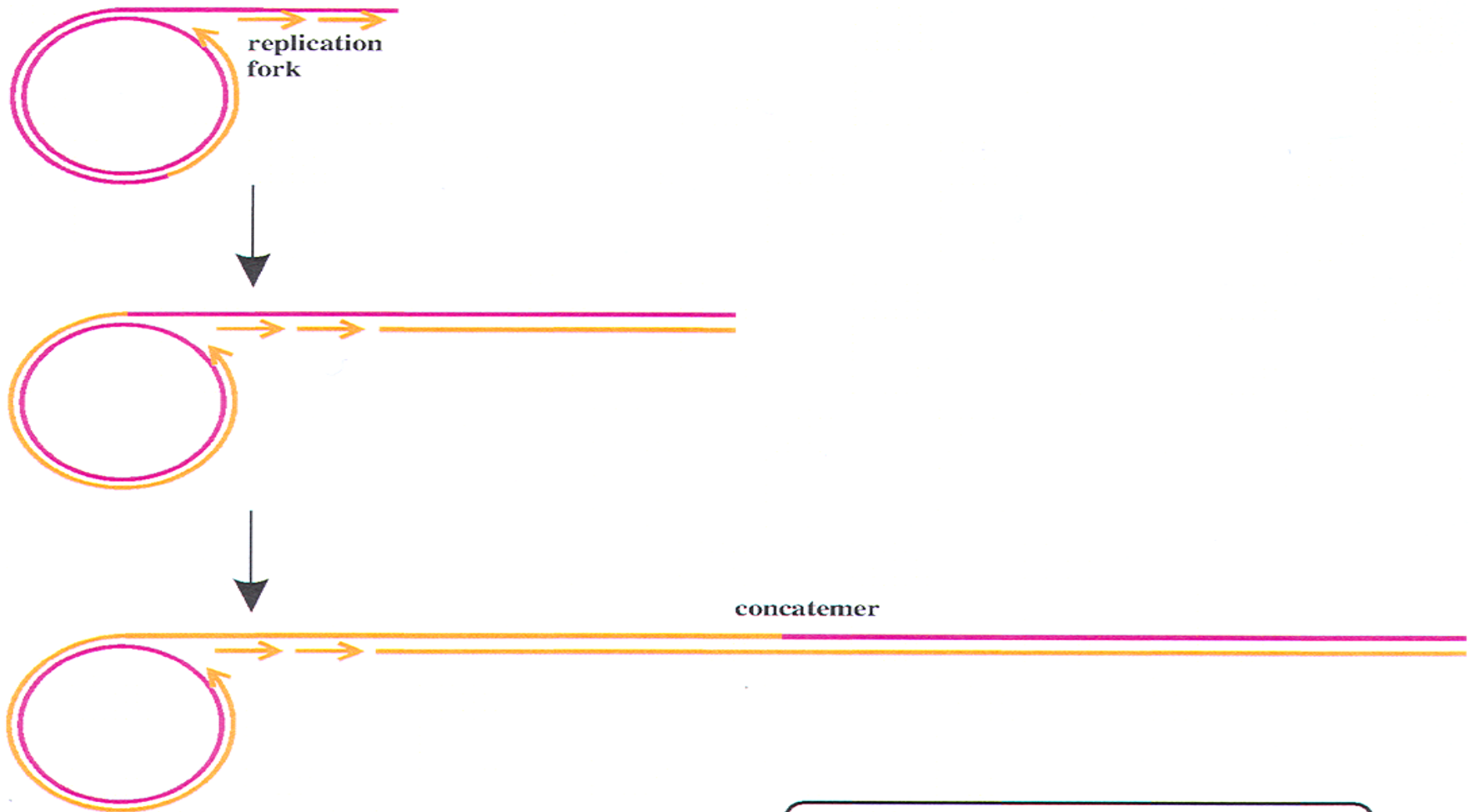


Η αντιγραφή του γενόματος αρχίζει με την σύνθεση των πρωτεϊνών E (  $\beta$  πρωτεϊνών , πρώιμων πρωτεϊνών Early ). Κάποιες από αυτές συνδέονται στις θέσεις ori ( έναρξης της αντιγραφής) και με την ενεργότητα ελικάσης που διαθέτουν ξετυλίγουν το DNA. Συγχρόνως πρωτεΐνες με συγγένεια για το μονόκλωνο τμήμα του DNA προσδένονται σε αυτό αποτρέποντας το επανασχηματισμό του δίκλωνου DNA. Στον προπορευόμενο κλώνο της φουρκέτας μια μικρή αλληλουχία RNA χρησιμεύει ως εκκινητής πάνω στο οποίο λειτουργεί το σύμπλοκο της DNA πολυμεράσης για να συνθέσει τον προπορευόμενο κλώνο. Στον άλλο κλώνο της φουρκέτας η πριμάση θα συνθέσει μικρά RNAs τα οποία θα αποτελέσουν τους εκκινητές για την σύνθεση των τεμαχίων Okazaki (fragments) του «καθυστερημένου κλώνου».

Η αντιγραφή θα οδηγήσει αρχικά σε μια δομή  $\Theta$  η οποία εν συνεχεία θα οδηγήσει στη δομή  $\sigma$  γνωστή και ως “rolling circle” και η οποία αποτελεί τον βασικό τρόπο αντιγραφής των ερπητοιών , δίνοντας μακριές επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες πολλαπλών αντιγράφων γνωστές ως “concatamers”.



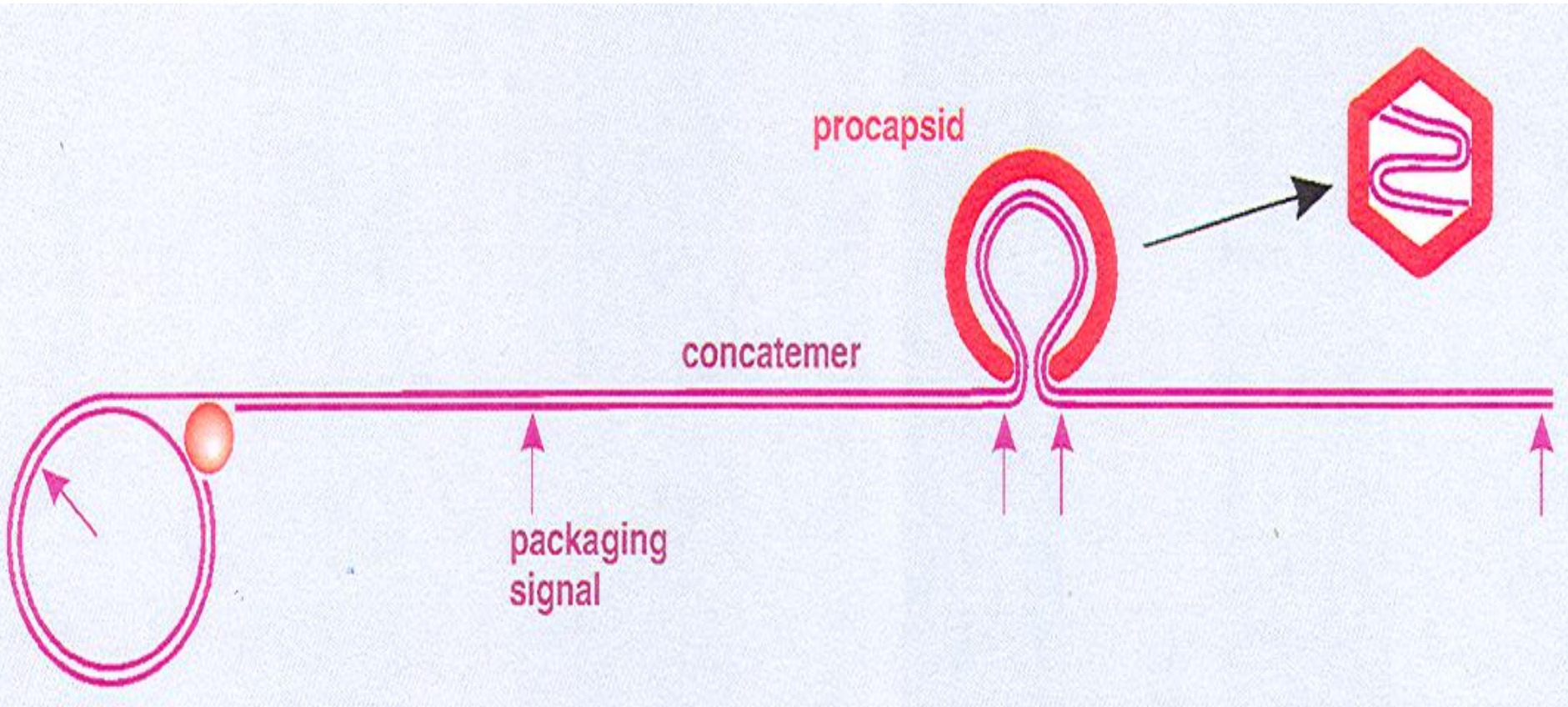
# ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ 'concatamers' ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΙΩΝ



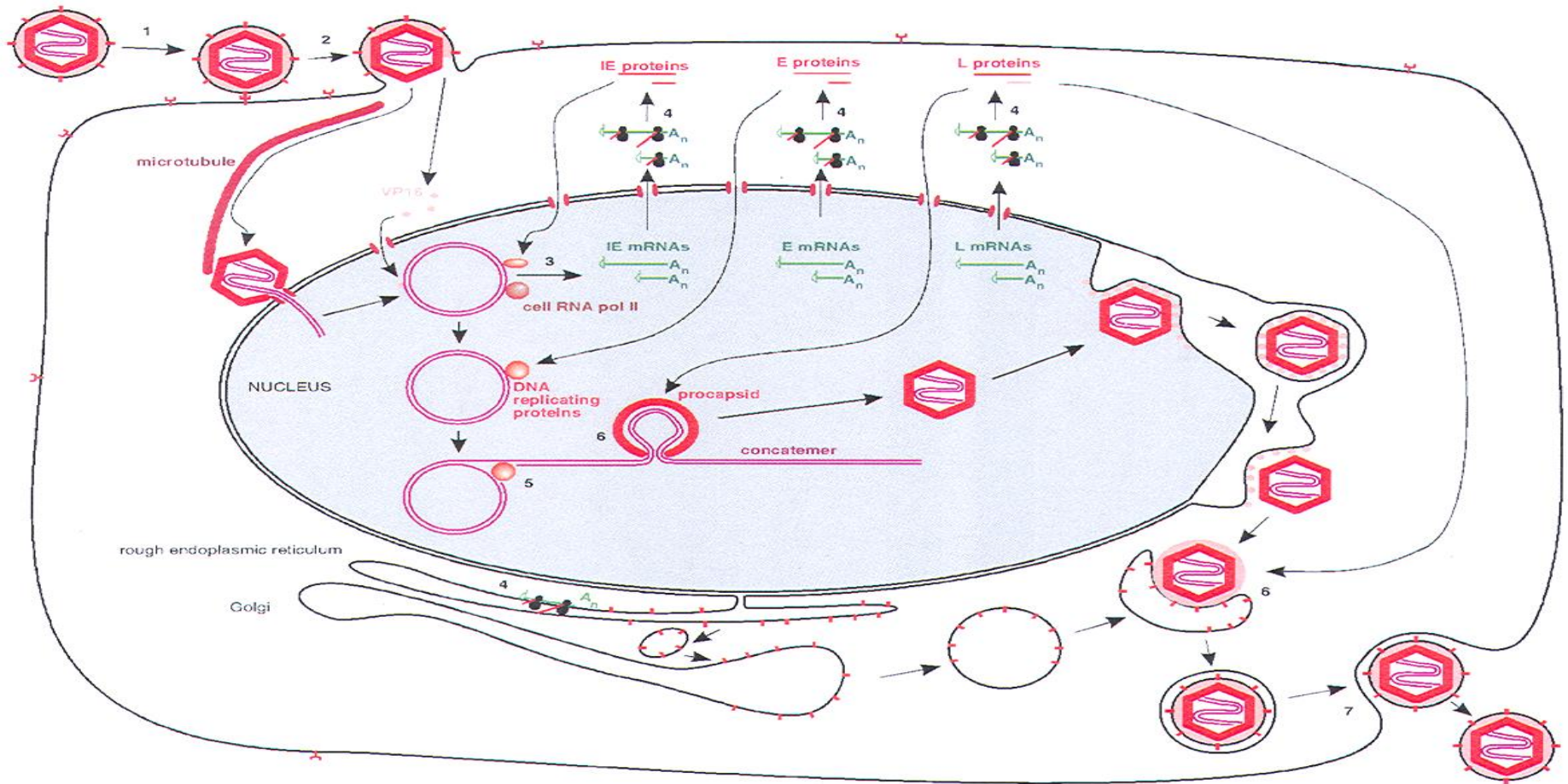
**Key:**

- parental DNA
- new DNA  
(arrow indicates synthesis in 5' to 3' direction)

Το γένωμα του ερπητοϊού εισέρχεται στο προκαψίδιο και κόβεται στην συνένωση μεταξύ των αντιγράφων του ιού αναγνωρίζοντας το σήμα πακεταρίσματος.



# Ο ΚΥΚΛΟΣ ΑΝΤΙΓΡΑΦΗΣ ΤΩΝ ΕΡΠΗΤΟΙΩΝ



1. Attachment
2. Entry
3. Transcription
4. Translation
5. Genome replication
6. Assembly
7. Exit

# POXVIRUSES

Η αντιγραφή του γενώματος και η έκφραση των γονιδίων στους poxviruses είναι σχεδόν ανεξάρτητη από τους κυτταρικούς μηχανισμούς, **εκτός από την χρησιμοποίηση από τον ιό των ριβοσωμάτων του κυττάρου ξενιστή.**

Τα γονίδια των pox ιών κωδικοποιούν πολλά ένζυμα που εμπλέκονται στην αντιγραφή του ιικού DNA, στην μεταγραφή και στην μετα-μεταγραφική τροποποίηση των mRNAs. Πολλά από αυτά τα ένζυμα είναι «πακεταρισμένα» μέσα στο ιικό σωματίδιο (το οποίο περιέχει > 100 πρωτεΐνες), επιτρέποντας στην μεταγραφή και στην αντιγραφή του γενώματος να λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα (παρά στον πυρήνα όπως για τις άλλες οικογένειες των DNA ιών), υπό τον έλεγχο του ιού. Η έκφραση των γονιδίων του ιού διεξάγεται από τα ιικά ένζυμα τα οποία συνδέονται με το νουκλεοκαψίδιο του ιικού σωματιδίου.

**Διακρίνονται δυο φάσεις:**

**Πρώιμα γονίδια:** Αυτά συνιστούν περίπου το 50% του γενώματος των pox ιών και εκφράζονται πριν την αντιγραφή του γενώματος μέσα σε ένα μερικώς «ανοικτό» νουκλεοκαψίδιο, καταλήγοντας στην παραγωγή της καλύπτρας στο 5' άκρο και της poly A ουράς στο 3' άκρο αλλά τα mRNAs ακόμη δεν έχουν υποβληθεί σε μάτισμα.

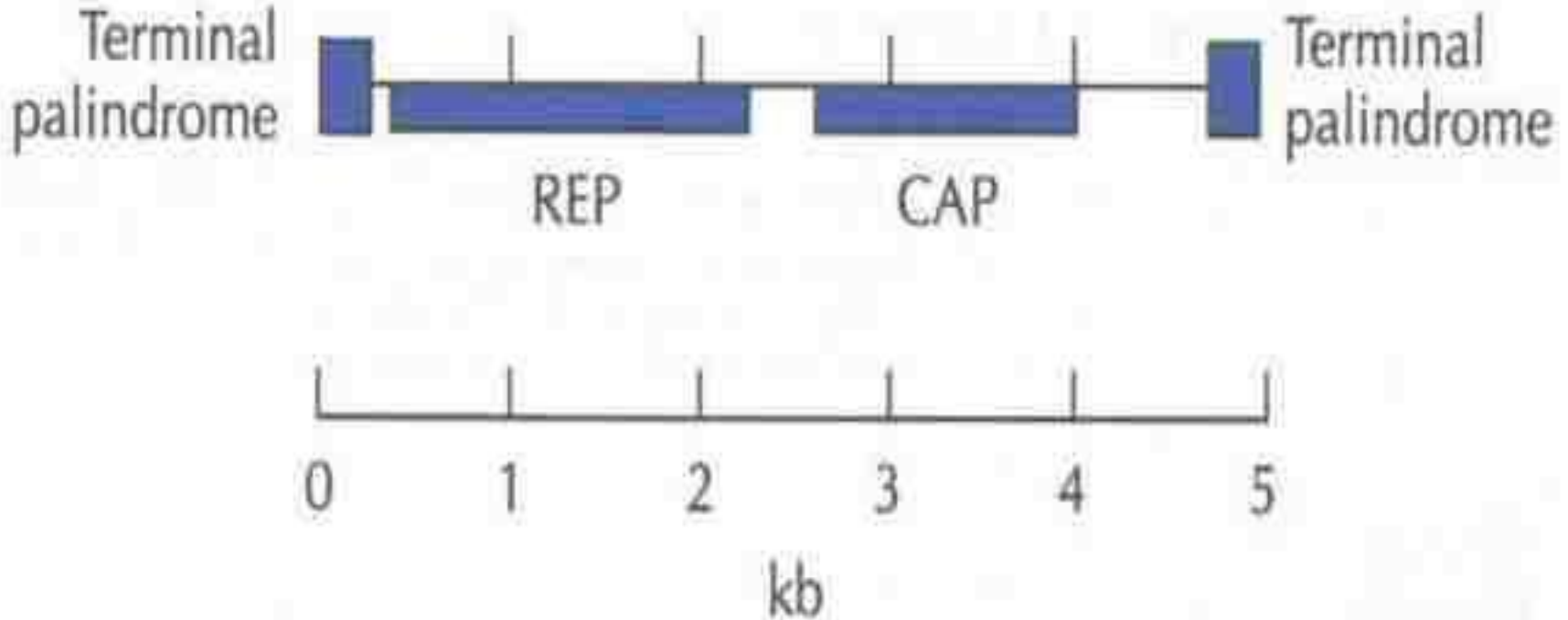
**Όψιμα γονίδια:** Αυτά εκφράζονται μετά την αντιγραφή του γενώματος στο κυτταρόπλασμα, αλλά η έκφρασή τους είναι εξαρτώμενη από τις κωδικοποιούμενες από τον ιό μεταγραφικές πρωτεΐνες παρά από εκείνες του κυττάρου ξενιστή.

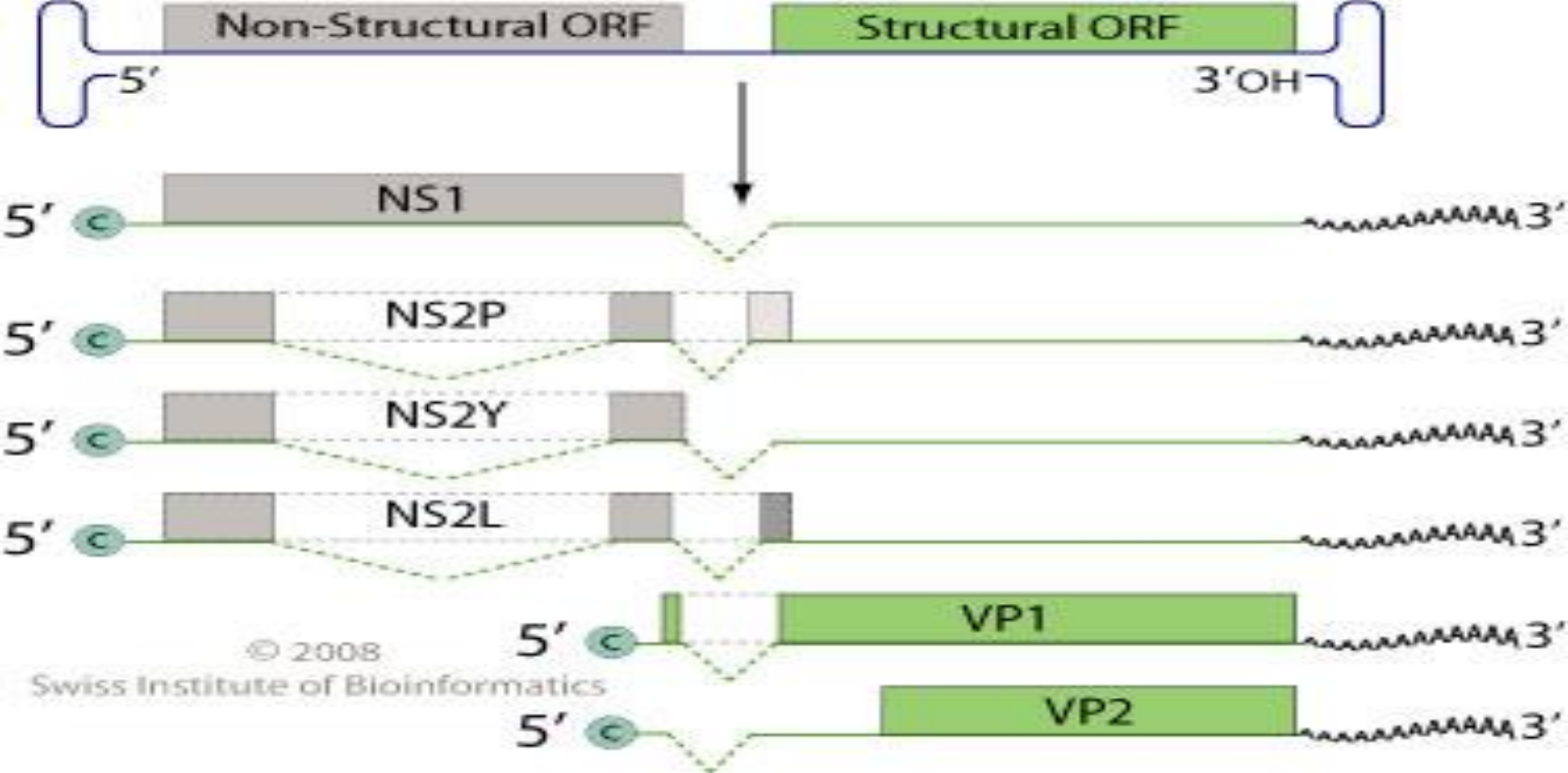
Όπως και στην περίπτωση των ερπητοιών, οι επαγωγείς των όψιμων γονιδίων προαπαιτούν την αντιγραφή του DNA για την ενεργοποίησή τους.



## ΤΑΞΗ II : ΜΟΝΟΚΛΩΝΟ DNA

Το πολύ μικρό μέγεθος του γενώματος των Παρνοϊών δεν τους επιτρέπει να κωδικοποιούν όλα τα απαραίτητα ένζυμα και τους παράγοντες για την μεταγραφή και αντιγραφή του γενώματος. Έτσι, εμφανίζουν να έχουν αναπτύξει μια ακραία μορφή παρασιτισμού, χρησιμοποιώντας τις διαθέσιμες λειτουργίες που υπάρχουν στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή για την έκφραση και την αντιγραφή των γονιδίων τους.





Στο άκρο του μονόκλωνου ssDNA υπάρχουν σύντομες συμπληρωματικές αλληλουχίες που σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές γνωστές ως inverted terminal repeats (ITRs). Ορισμένοι ραβνο ιοί έχουν όμοιες αλληλουχίες στα άκρα τους, ενώ σε άλλους ιούς η συμπληρωματικότητα των άκρων δεν παρουσιάζει την ίδια δομή και κατά συνέπεια παρουσιάζουν μια μοναδική δομή στο κάθε άκρο του γενώματος (unique sequences).

(a) 'Inverted repeats' at the termini



(b) Unique sequences at the termini



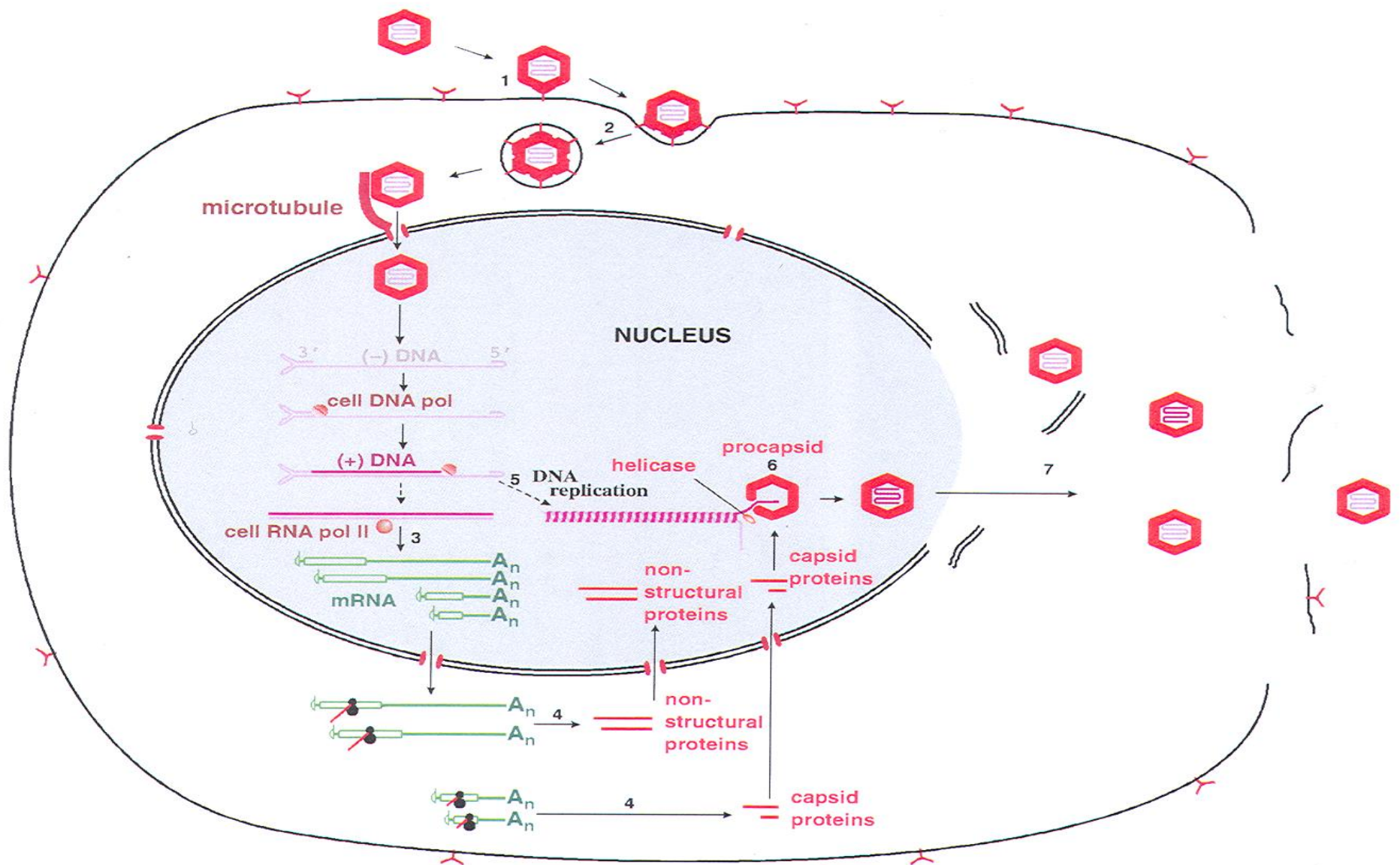
Virus	Sequences at the DNA termini <sup>1</sup>	% virions containing (+) DNA	% virions containing (-) DNA
B19 virus	ITRs	50	50
Dependoviruses	ITRs	50	50
Minute virus of mice	Unique	1	99

**Κατά την διάρκεια της αντιγραφής οι παρνοιοί με τερματικές αλληλουχίες ITRs δημιουργούν και ενσωματώνουν ίσες ποσότητες αντιγράφων με (+) και (-) κλώνους DNA κάτι το οποίο δεν συμβαίνει σε ιούς με μοναδικές ( unique) τερματικές αλληλουχίες.**

**Στην περίπτωση του παρνοιού B19 ο ιός εισέρχεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια μέσω ενδοκύτωσης και μεταφέρεται προς τους πόρους της πυρηνικής μεμβράνης όπου λόγω του μικρού μεγέθους του νουκλεοκαψιδίου (18-26 nm) εισέρχεται στον πυρήνα.**

**Στον πυρήνα το μονόκλωνο DNA μέσω της DNA πολυμεράσης του ξενιστή μετατρέπεται σε δίκλωνο DNA. Λόγω των ITRs στο 3' άκρο το ελεύθερο -OH λειτουργεί ως εκκινήτης για την λειτουργία της DNA πολυμεράσης του ξενιστή.**

**Η κυτταρική RNA πολυμεράση II μεταγράφει τα ιϊκά γονίδια τα οποία υποβάλλονται σε μάτισμα , μεταφράζονται και δημιουργούν τις μη δομικές και δομικές πρωτεΐνες του ιού. Αμφότερες επιστρέφουν στον πυρήνα για να σχηματίσουν, οι μεν δομικές το προκαψίδιο οι δε μη δομικές ( ελικάση) να ξετυλίξουν το δίκλωνο DNA ώστε κάθε ένας κλώνος είτε (+) είτε (-) να «πακεταρισθεί» στο καψίδιο.**



1. Attachment
2. Entry
3. Transcription
4. Translation
5. Genome replication
6. Assembly

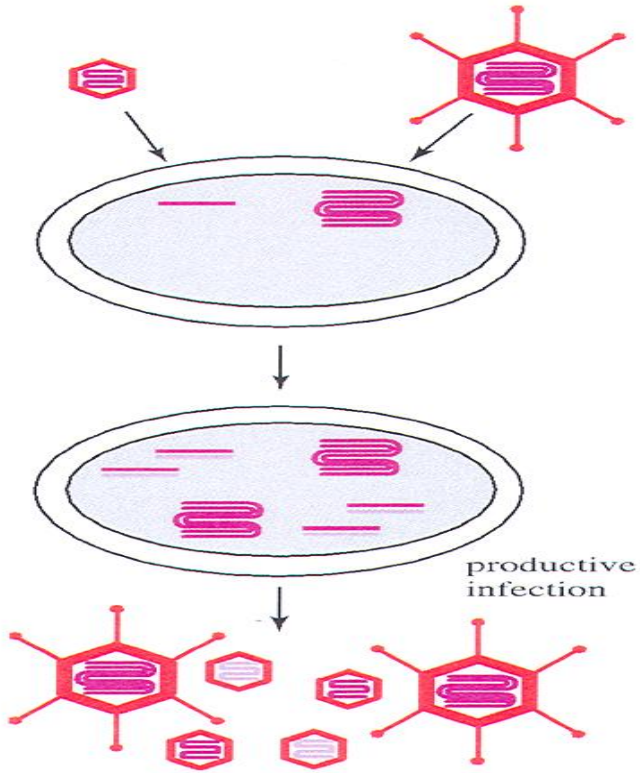
Τα μέλη του γένους Dependovirus της οικογένειας Parvoviridae με ελαττωματική αντιγραφή είναι εξ ολοκλήρου εξαρτώμενα στην υπερμόλυνση από τον αδενοϊό ή κάποιο ερπητοϊό για την παροχή βοηθητικών λειτουργιών ώστε να γίνει εφικτή η αντιγραφή τους.

Τα γονίδια του αδενοϊού που απαιτούνται ως βοηθητικά είναι τα πρώιμα ρυθμιστικά γονίδια όπως το γονίδιο E1A.

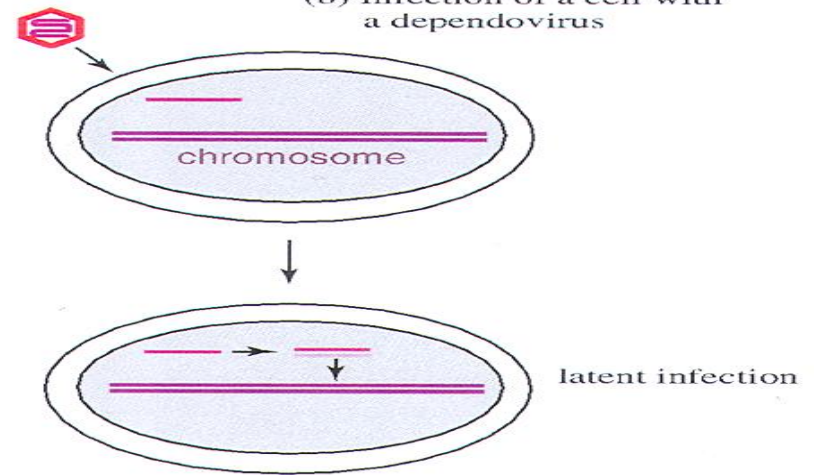
Στη φύση όταν ένας Dependovirus εισέρχεται σε ένα ευαίσθητο κύτταρο απουσία βοηθητικού ιού, μετά την μετατροπή του γενώματός του σε δίκλωνο DNA, είναι δυνατόν να ενσωματωθεί μέσω ανασυνδυασμού σε κάποιο από τα χρωμοσώματα του κυττάρου ξενιστή (συνήθως στο χρωμόσωμα 19) και να ακολουθήσει μια λανθάνουσα λοίμωξη.

Αν το ίδιο κύτταρο μολυνθεί τώρα από ένα βοηθητικό ιό τότε ακολουθεί μια παραγωγική λοίμωξη και για τους δυο ιούς.

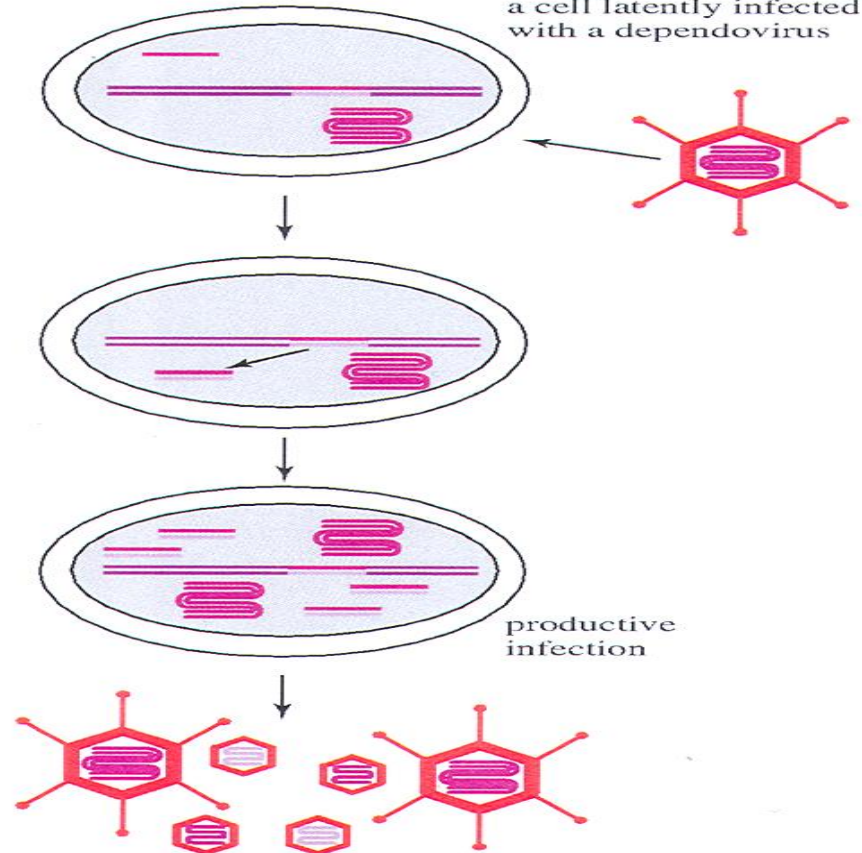
(a) Co-infection of a cell with a dependovirus and an adenovirus

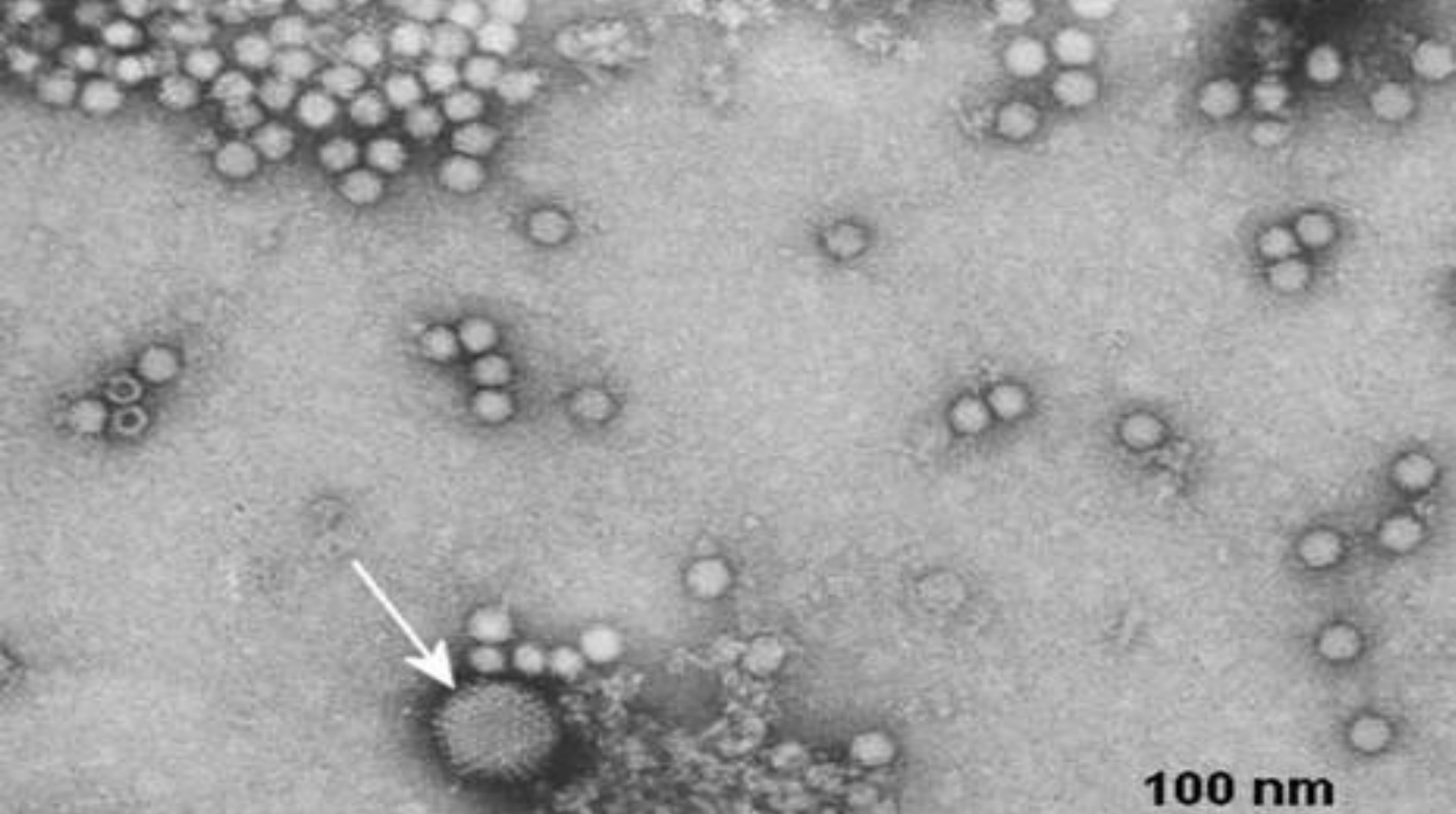


(b) Infection of a cell with a dependovirus



(c) Adenovirus infection of a cell latently infected with a dependovirus





**ΜΕ ΤΟ ΒΕΛΟΣ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΤΑΙ ΤΟ ΠΙΚΟ ΣΩΜΑΤΙΔΙΟ ΕΝΟΣ ΑΔΕΝΟΙΟΥ ΚΑΙ ΓΥΡΩ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΙΔΙΑ DEPENDO ΙΩΝ**



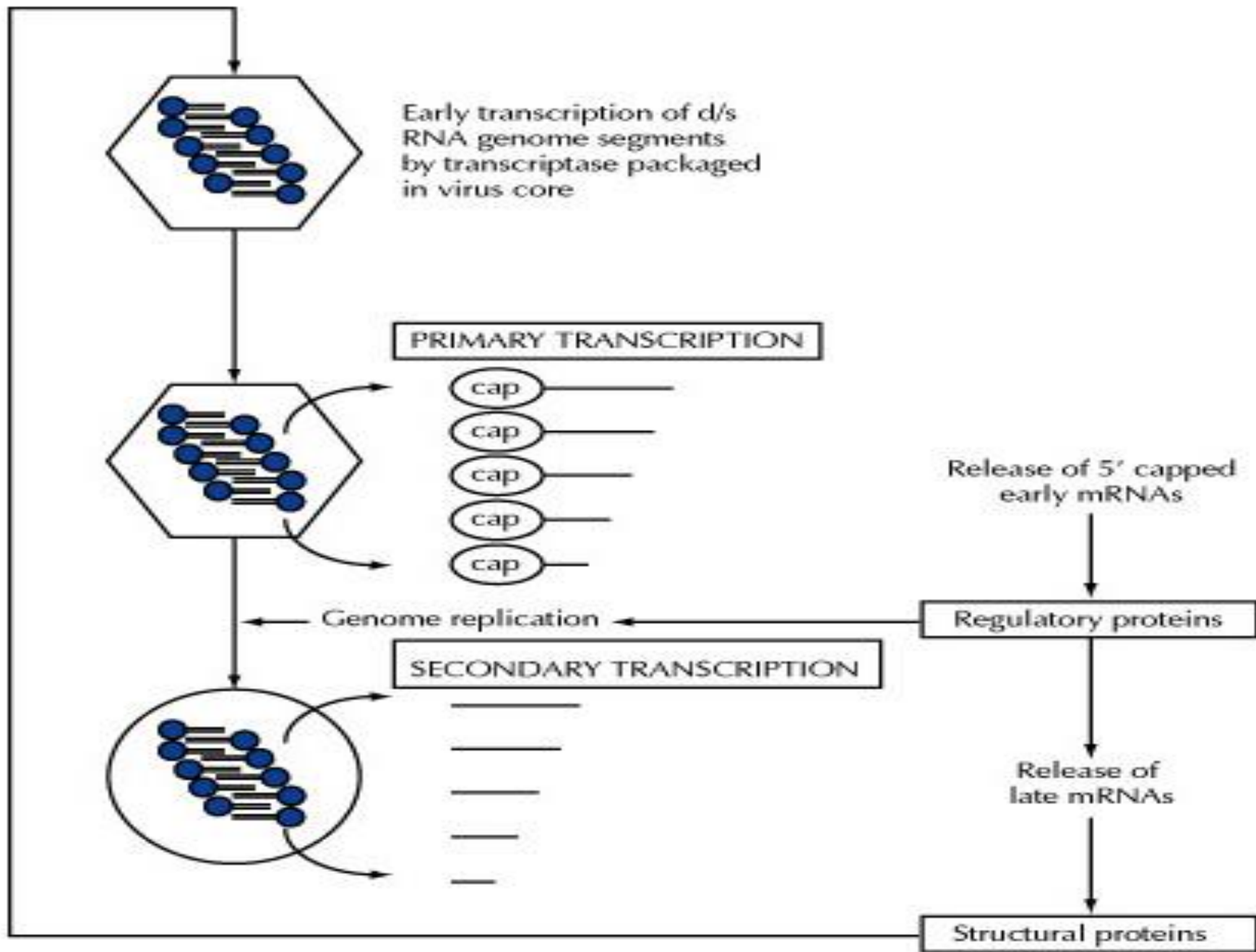
## ΤΑΞΗ III: ΔΙΚΛΩΝΟ RNA

Όλοι οι ιοί με RNA γενώματα διαφέρουν ουσιαστικά από τα κύτταρα των ξενιστών τους, τα οποία φυσικά είναι δίκλωνα DNA γενώματα και καθώς κάθε ιός για να μπορέσει να αντιγραφεί, να μεταγραφεί και να μεταφρασθεί θα πρέπει από βιοχημικής άποψης να είναι συμβατός με την βιοχημική μηχανική του κυττάρου ξενιστή θα πρέπει κατά συνέπεια να υπάρχουν βασικές διαφορές στους μηχανισμούς της έκφρασης των γονιδίων του ιού από αυτούς του κυττάρου ξενιστή.

Οι γεο ιοί έχουν πολυτεμαχισμένα γενώματα και αντιγράφονται στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου ξενιστή. Χαρακτηριστικό για τους ιούς με τεμαχισμένα RNA γενώματα, είναι η παραγωγή ενός μονοκιστρονικού (monocistronic) mRNA ξεχωριστά για κάθε τεμάχιο.

Νωρίς στην μόλυνση, η μεταγραφή του τεμαχισμένου δίκλωνου RNA γενώματος λαμβάνει χώρα από την ιική RNA πολυμεράση εντός του ιικού σωματιδίου κατά την διάρκεια της απέκδυσης ( uncoating). Τουλάχιστον πέντε ενζυμικές δραστηριότητες συμμετέχουν σε αυτή την διεργασία.

( ds RNA-dependent RNA polymerase ,RNA triphosphatase ,  
Guanyltransferase , Methyltransferase , Helicase ).



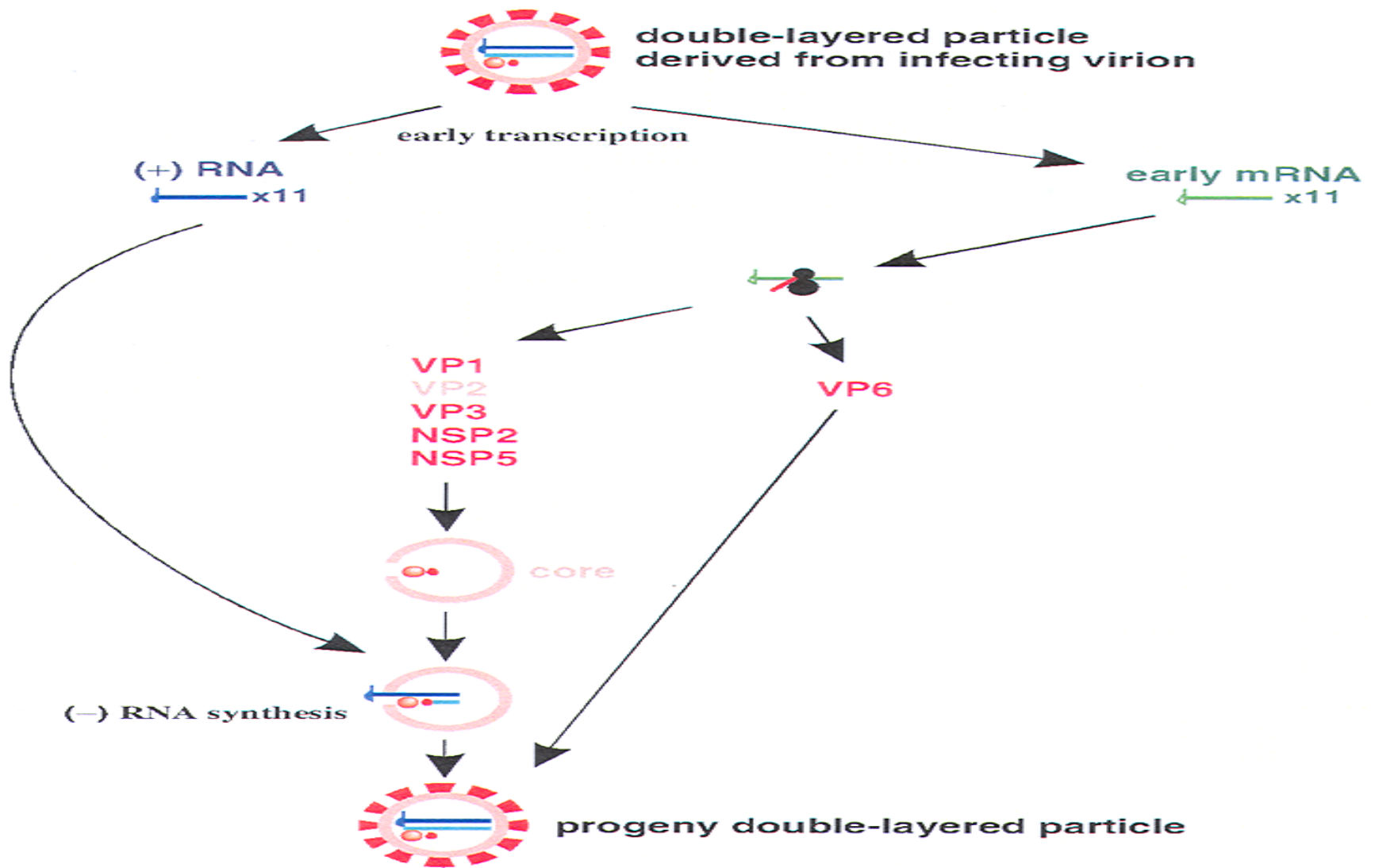
Αυτή η αρχική μεταγραφή καταλήγει σε μετάγραφα που φέρουν καλύπτρα ( capped transcripts) τα οποία όμως δεν φέρουν polyA ουρά και τα οποία εγκαταλείπουν το νουκλεοκαψίδιο για να μεταφραστούν στο κυτταρόπλασμα.

Τα διάφορα τεμάχια του γενώματος μεταφράζονται / μεταγράφονται σε διαφορετικές συχνότητες, γεγονός το οποίο προσδίδει το κύριο πλεονέκτημα ενός τεμαχισμένου γενώματος.

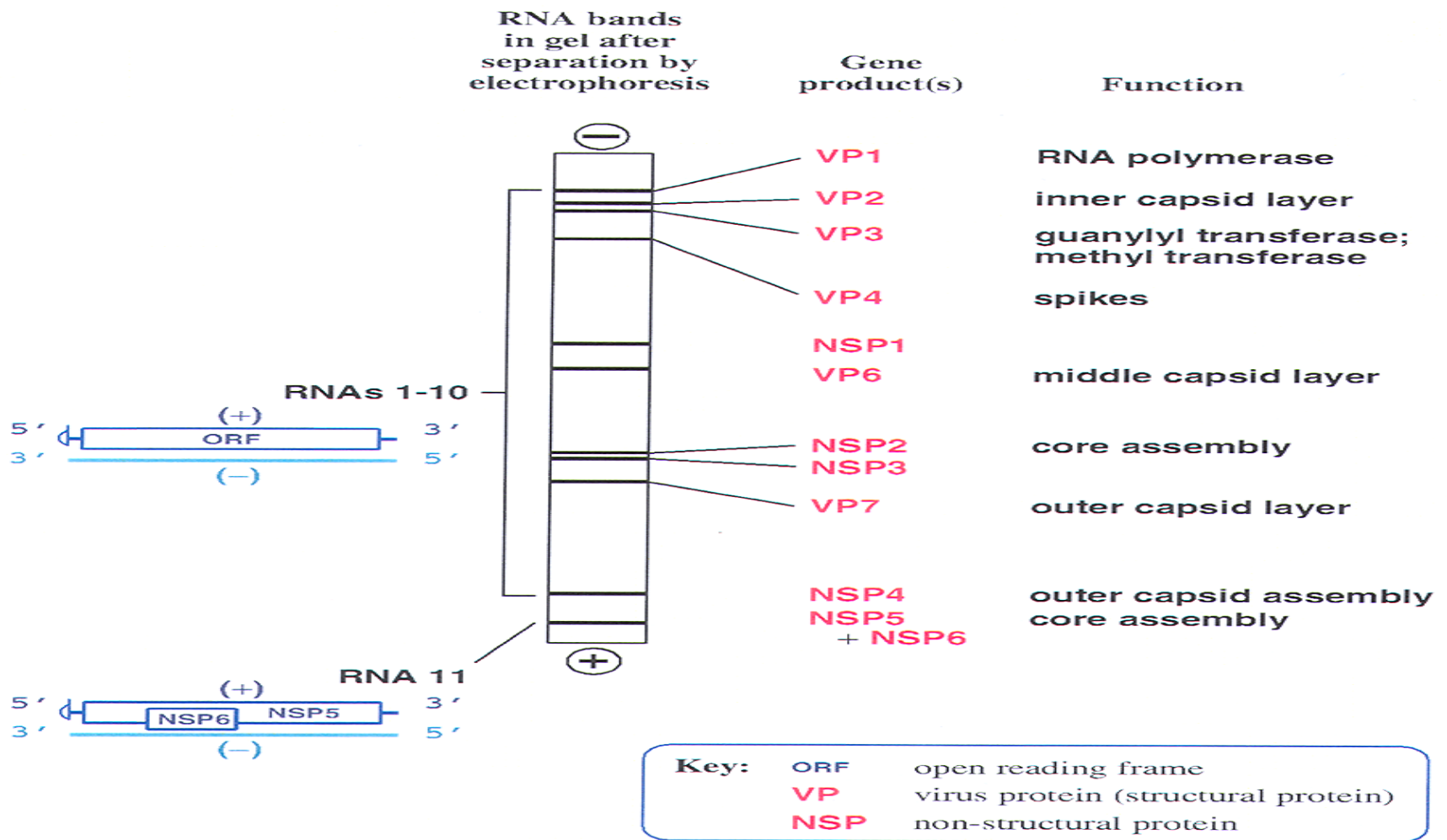
Το RNA μεταγράφεται συντηρητικά, δηλαδή χρησιμοποιούνται μόνο οι αρνητικοί κλώνοι ( (-)sense strands) , καταλήγοντας στην σύνθεση του θετικού κλώνου ( (+)sense) mRNAs τα οποία αποκτούν καλύπτρα μέσα στο νουκλεοκαψίδιο του ιού .

Μια δεύτερη μεταγραφή συμβαίνει αργά κατά την μόλυνση μέσα σε νεοσχηματιζόμενα ιικά σωματίδια και οδηγεί σε μετάγραφα τα οποία δεν φέρουν καλύπτρα ούτε polyA ουρά .

Το γένωμα αντιγράφεται με έναν συντηρητικό τρόπο. Μια υπερπαραγωγή θετικών κλώνων ( (+)sense strands ) τα οποία θα λειτουργήσουν ως όψιμα mRNAs και ως μήτρα ( template) για την σύνθεση των αρνητικών κλώνων ( (-) sense strand synthesis).



Μερικοί από τους RNA κλώνους θετικής πολικότητας θα λειτουργήσουν ως mRNA για την παραγωγή ρυθμιστικών και δομικών πρωτεϊνών ( με πράσινο χρώμα) ενώ άλλοι ( με μπλε χρώμα) ως μήτρα για τον σχηματισμό των αρνητικών κλώνων ( με θαλασσί χρώμα).



## Ηλεκτροφόρηση του γενώματος ενός Ροταϊού.

Διακρίνονται τα 11 δίκλινα τεμάχια καθώς και το προϊόν του κάθε τεμαχίου. Αντιστοιχεί ένα ανοικτό πλαίσιο ανά τεμάχιο εκτός από το τεμάχιο 11 όπου υπάρχουν 2 ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης αλλά σε διαφορετικά πλαίσιο ανάγνωσης, οπότε οι πρωτεΐνες NSP5 & NSP6 δεν φέρουν κοινές αλληλουχίες.

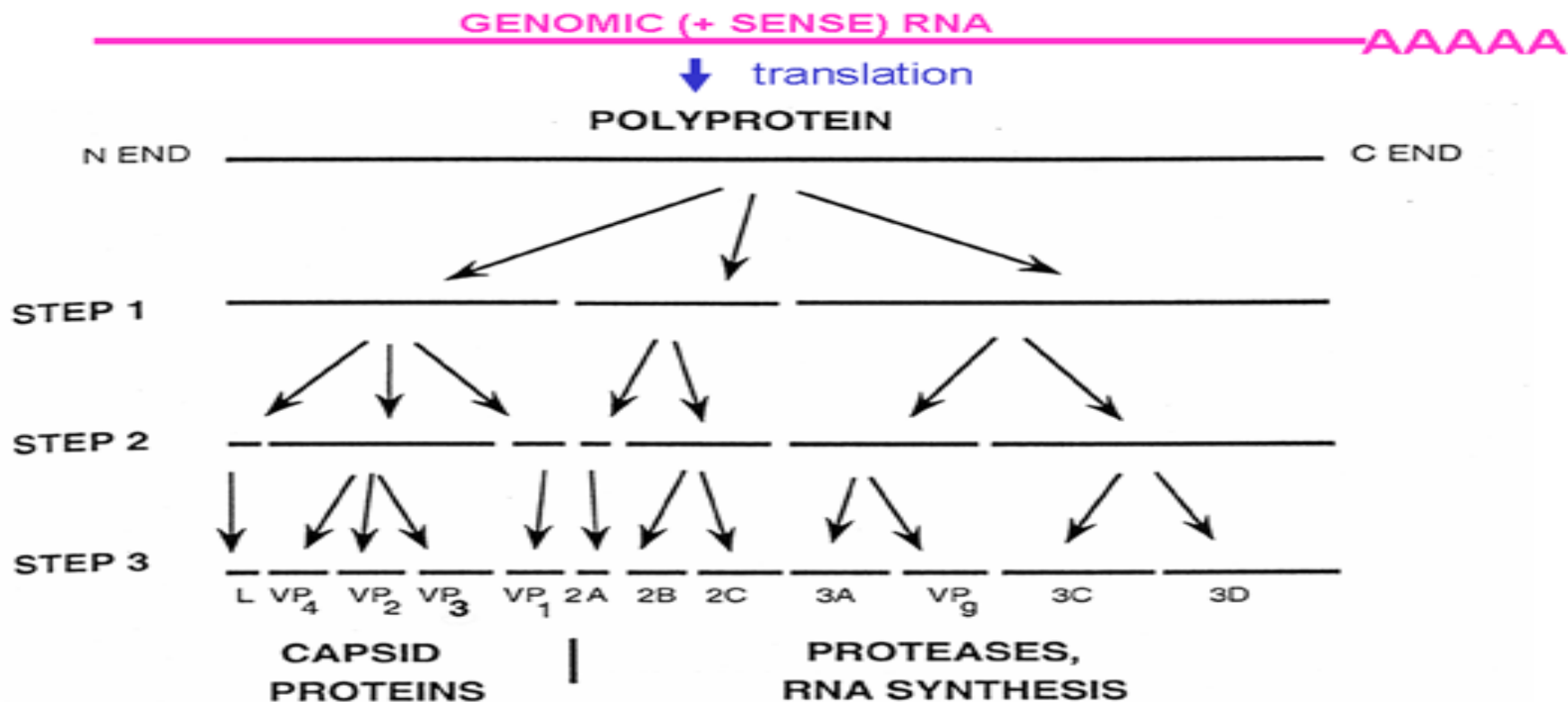
## ΤΑΞΗ IV : ΜΟΝΟΚΛΩΝΟ θετικής πολικότητας RNA

Η τάξη αυτή είναι πολυπληθέστατη , αναφορικά με τον αριθμό των διαφορετικών οικογενειών και τον αριθμό των ξεχωριστών οροτύπων ιών.

Βασικά, το γένωμά τους λειτουργεί ως mRNAs και μεταφράζεται αμέσως μετά την μόλυνση του κυττάρου ξενιστή.

Οι ιοί αυτής της τάξης υποδιαιρούνται σε δυο ομάδες ως ακολούθως:

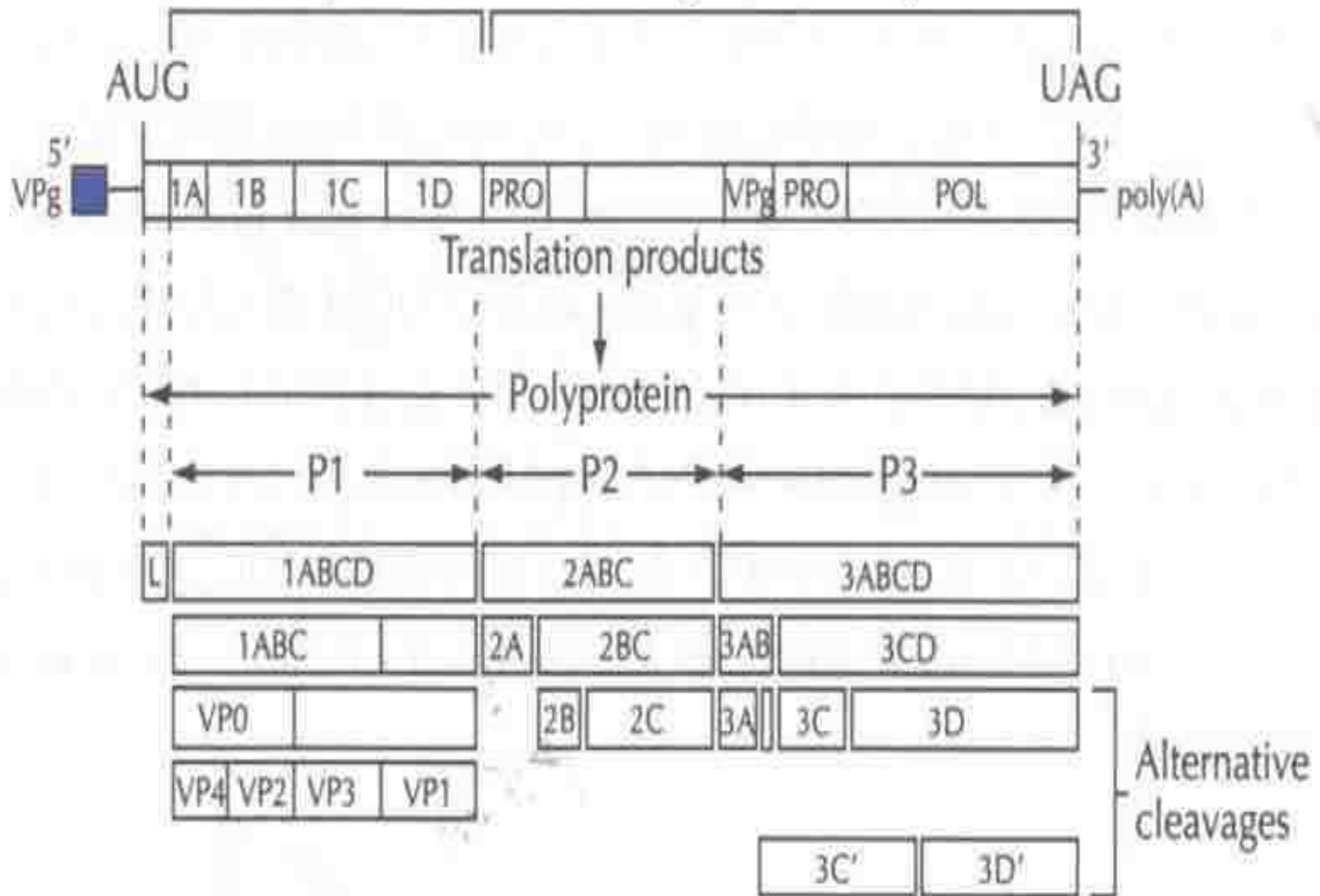
Παραγωγή μιας πολυπρωτεΐνης που περιλαμβάνει όλη την κωδικοποιούσα γενετική περιοχή του ιού, η οποία στην συνέχεια θα υποβληθεί σε πέψη από πρωτεάσες του ιού για την παραγωγή πρόδρομων και τέλος ώριμων πολυπεπτιδίων .



# PICORNAVIRUSES

Capsid

Cleavage and RNA synthesis



**Το ιϊκό RNA αντιγράφεται σε σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από ιϊκές και κυτταρικές πρωτεΐνες και ιϊκό RNA .Τα αντιγραφικά αυτά σύμπλοκα περικλείονται σε κυστίδια 200-400 nm τα οποία προέρχονται κυρίως από το ενδοπλασματικό δίκτυο.**

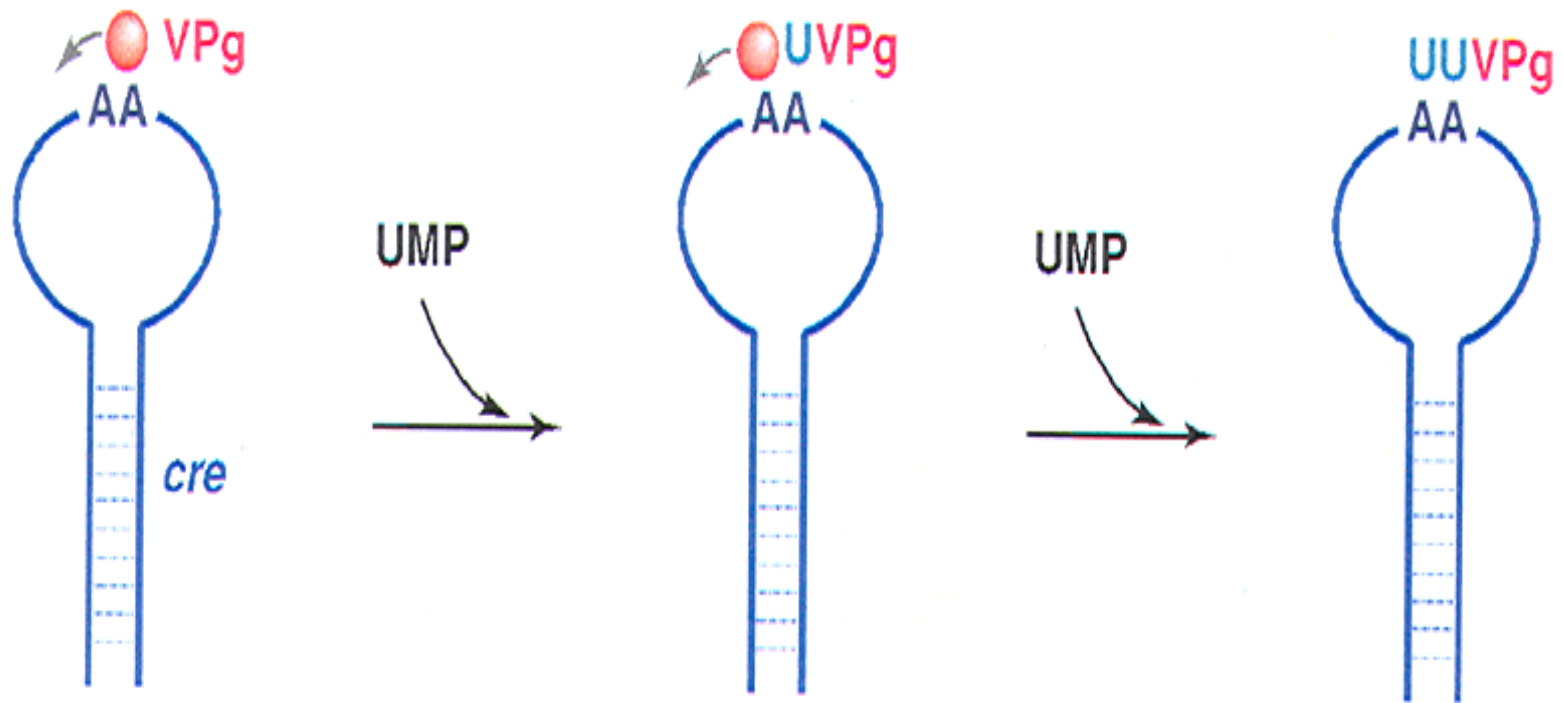
**Ο εκκινητής για την σύνθεση των αρνητικών και θετικών κλώνων είναι η πρωτεΐνη VPg η οποία ουριδιλιώνεται σε ένα –OH τυροσίνης από την ιϊκή RNA πολυμεράση.**

**Η αντίδραση αυτή λαμβάνει χώρα στα στοιχεία cre ( cis acting replication elements ) του ιϊκού γενώματος.**

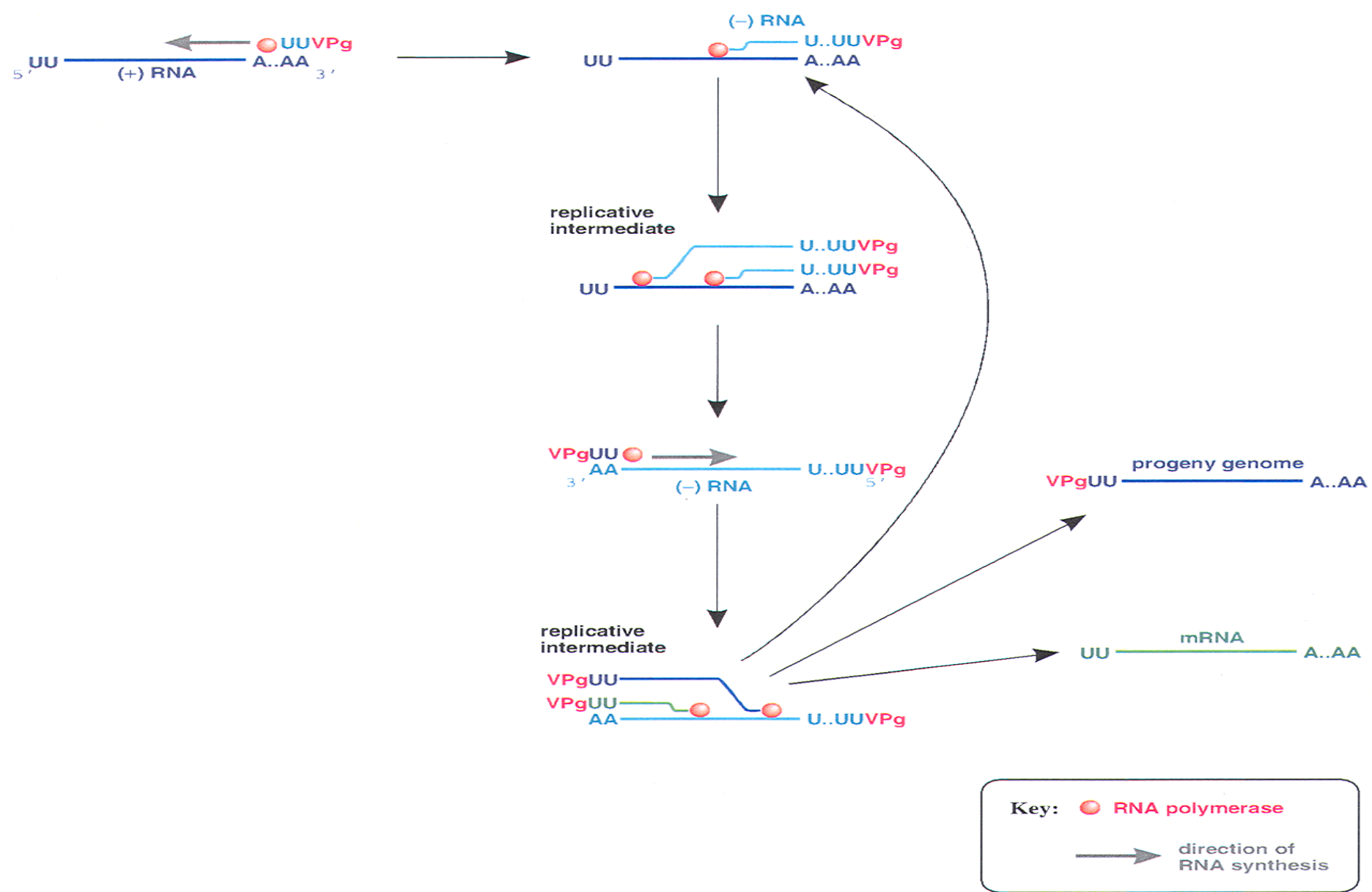
**Είναι βέβαιο ότι για την σύνθεση του (-) κλώνου RNA ως εκκινητής χρησιμοποιείται το UU-VPg ενώ για την σύνθεση του (+) κλώνου RNA ενδέχεται να χρησιμοποιείται ο ίδιος εκκινητής επίσης.**

**Σημαντικό μέρος του RNA στα σύμπλοκα αντιγραφής συναντιέται υπό μορφής αντιγραφικού ενδιάμεσου ( RIs , Replicative Intermediates) δηλ. είτε υπό μορφής (+) RNA ως μήτρα σε συνδυασμό με αυξανόμενα (-) RNA είτε το αντίθετο. Τελικά ο ιός ρυθμίζει την σύνθεση του RNA με τέτοιο τρόπο ώστε οι κλώνοι (+) RNA να είναι 50 φορές περισσότεροι από τους κλώνους (-) RNA . Εξ αυτών των (+) RNA κλώνων μέρος θα χρησιμοποιηθεί ως mRNA και μέρος θα αποτελέσει το γένωμα των ώριμων πλέον ιϊκών σωματιδίων.**

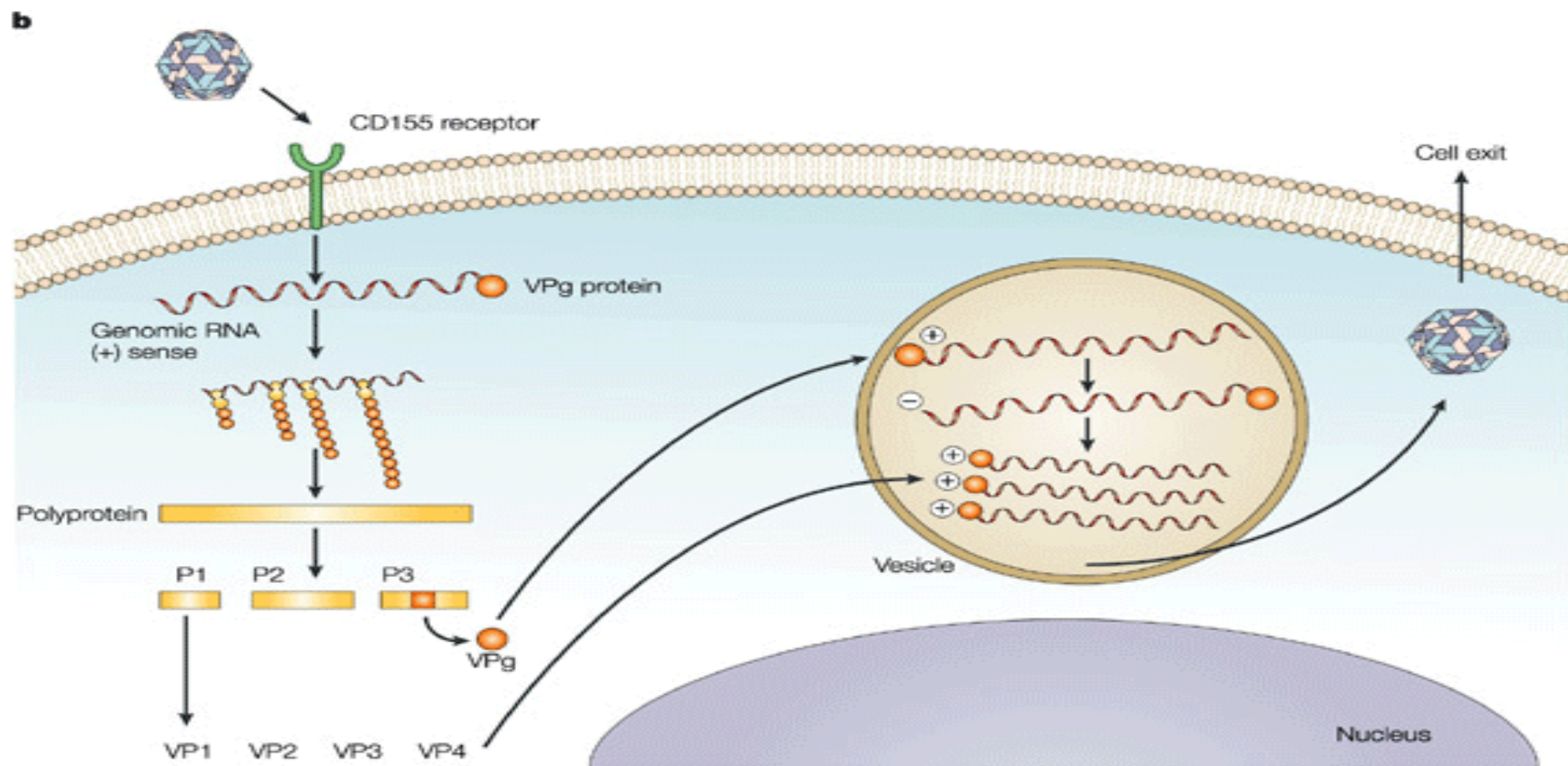
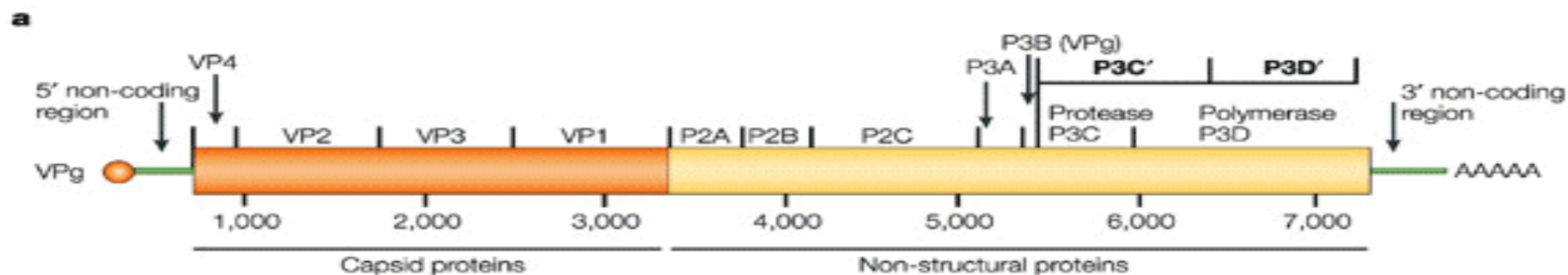




Key: ● RNA polymerase  
*cre* cis-acting replication element  
 UMP uridine monophosphate



Με θαλασσί το (-) RNA, με μπλε το (+) RNA και με πράσινο το mRNA

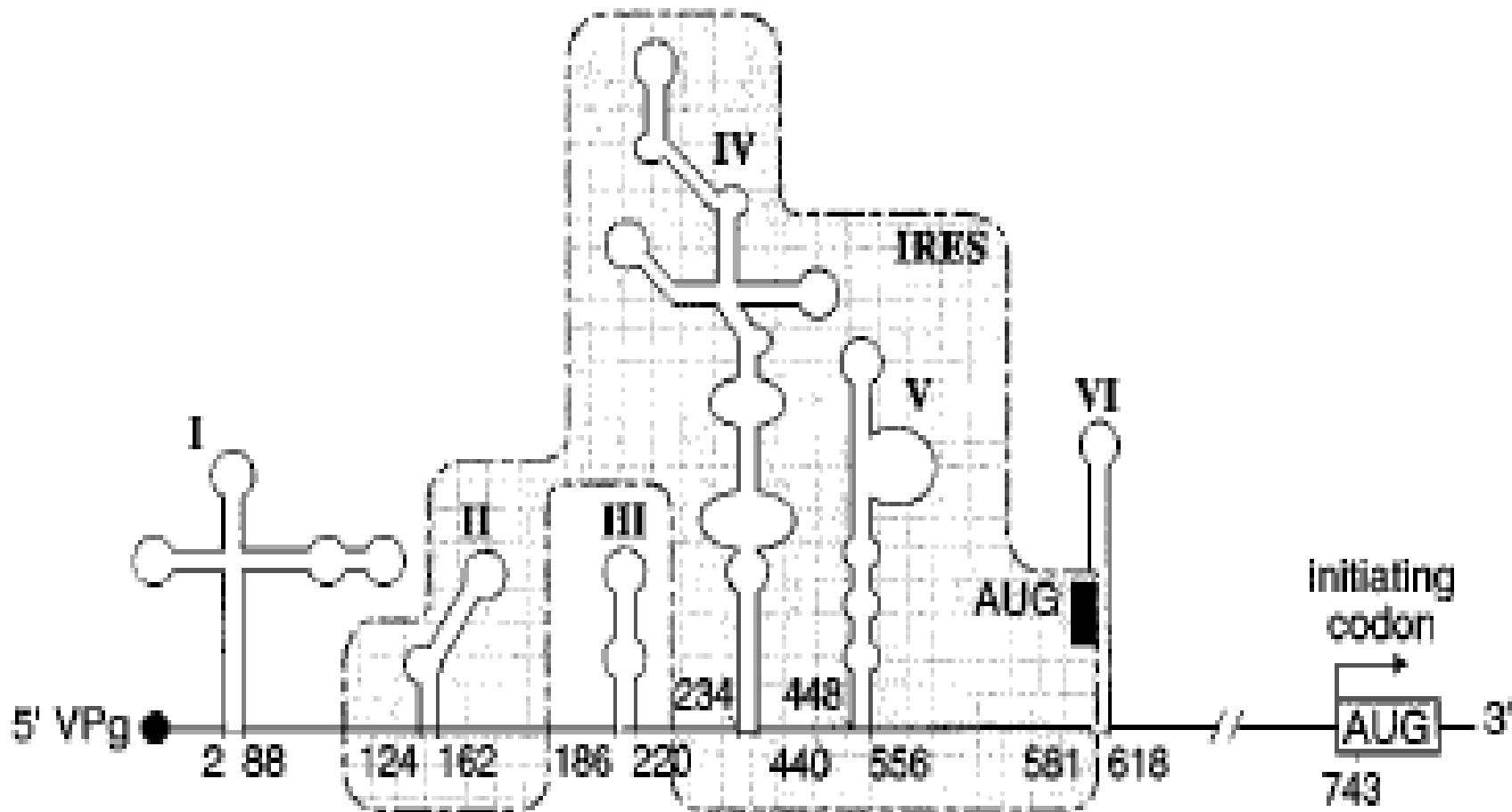


Το γένωμα των Picornavirus παρουσιάζει έναν εναλλακτικό μηχανισμό για τον έλεγχο της μετάφρασης. Αυτά τα γενώματα έχουν διατηρήσει πολύ μακρές μη-κωδικοποιούσες περιοχές στο 5' άκρο τους (5' NCR), που αποτελούν περίπου το 10% του συνολικού γενώματος. Αυτές οι αλληλουχίες εμπλέκονται στην αντιγραφή και στο «πακετάρισμα» του γενώματος του ιού.

Η μετάφραση των κυτταρικών mRNAs αρχίζει όταν τα ριβοσώματα αναγνωρίσουν την καλύπτρα στο 5' άκρο του mRNA και «σαρώσουν» κατά μήκος την νουκλεοτιδική αλληλουχία μέχρι να φθάσουν σε ένα κωδικόνιο έναρξης AUG

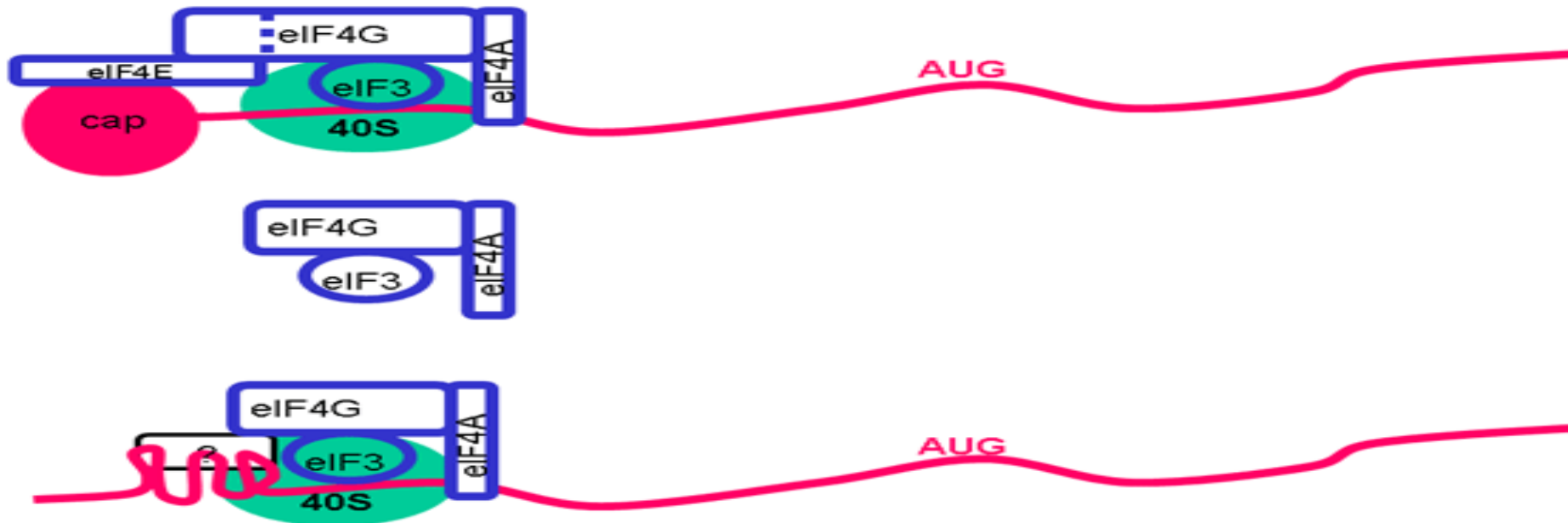
Το γένωμα των Picornaίων δεν μεταφράζεται με αυτόν τον τρόπο. Το 5' άκρο του RNA δεν φέρει καλύπτρα και επομένως δεν αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα κατά τον ίδιο τρόπο όπως τα κυτταρικά mRNAs, αλλά τροποποιείται με την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης. Υπάρχουν επίσης πολλαπλά κωδικόνια έναρξης AUG στην 5' NCR, πριν το κωδικόνιο έναρξης κωδικοποίησης της πολυπρωτεΐνης, τα οποία όμως δεν αναγνωρίζονται από τα ριβοσώματα. Στα μολυσμένα από τον picornaίο κύτταρα, τα ριβοσώματα αντί να «σαρώνουν» κατά μήκος της 5' NCR για τον εντοπισμό των κωδικονίων έναρξης της μετάφρασης, χρησιμοποιούν μια εσωτερική θέση δέσμησης στο 5' άκρο (Internal Ribosomal Entry Site - IRES), τα ριβοσώματα προσδένονται στο RNA μέσω του IRES και ξεκινά εσωτερικώς η μετάφραση.

Ο μηχανισμός αυτός χρησιμοποιείται από μια ποικιλία ιών εκτός των picornaίων όπως από τον ιό της ηπατίτιδας C, τους corona και flavi ιούς.



Διάγραμμα της δευτεροταγούς δομής της 5'-NCR περιοχής του γενώματος του στελέχους PV-1/Mahoney. Οι έξι δομές φουρκετών αριθμούνται από I έως VI. Η δομή I αντιστοιχεί στο cloverleaf ενώ οι δομές II-VI αποτελούν το IRES

Σε μολυσμένα από πολιοιούς κύτταρα, η πρωτεΐνη 2A του ιού η οποία είναι μια πρωτεάση διασπά τον παράγοντα p220 του eIF-4F (ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών οι οποίες απαιτούνται για την “cap-dependent” μετάφραση των mRNAs στα ριβοσώματα). Καθώς το RNA των πολιοιών δεν φέρει μεθυλιωμένη καλύπτρα στο 5' (methylated cap) αλλά είναι τροποποιημένο από την προσθήκη της VPg πρωτεΐνης, το RNA του ιού συνεχίζει να μεταφράζεται. Έτσι με αυτό τον τρόπο ο ιός καταστέλλει την μετάφραση του κυττάρου ξενιστή ενώ δεν επηρεάζεται η μετάφραση του δικού του RNA.



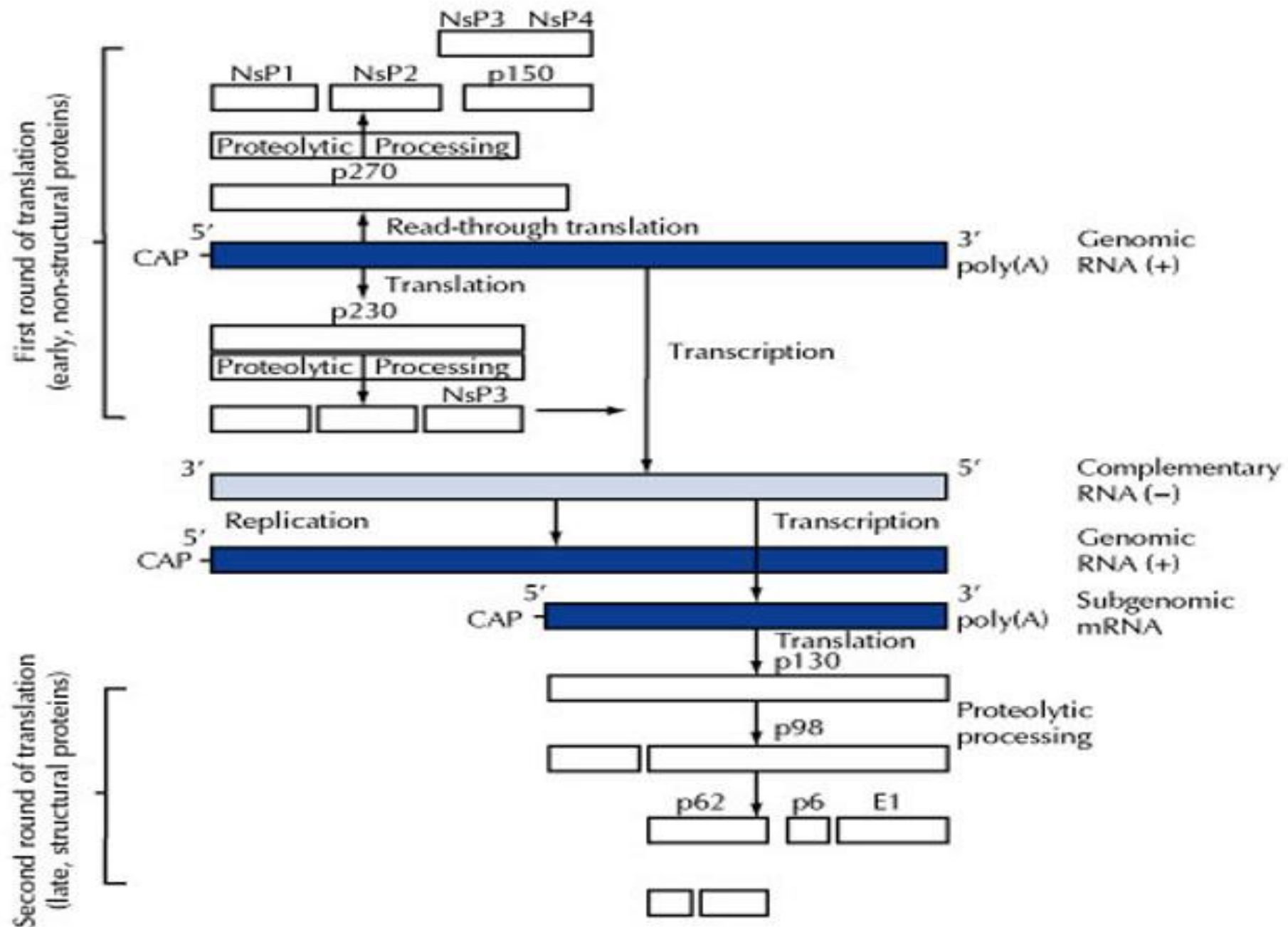
## TOGAVIRUSES

**Παραγωγή υπογενωμικών ( subgenomic) mRNAs, που προέρχονται από δυο ή και περισσότερους γύρους μεταγραφής του γενώματος.**

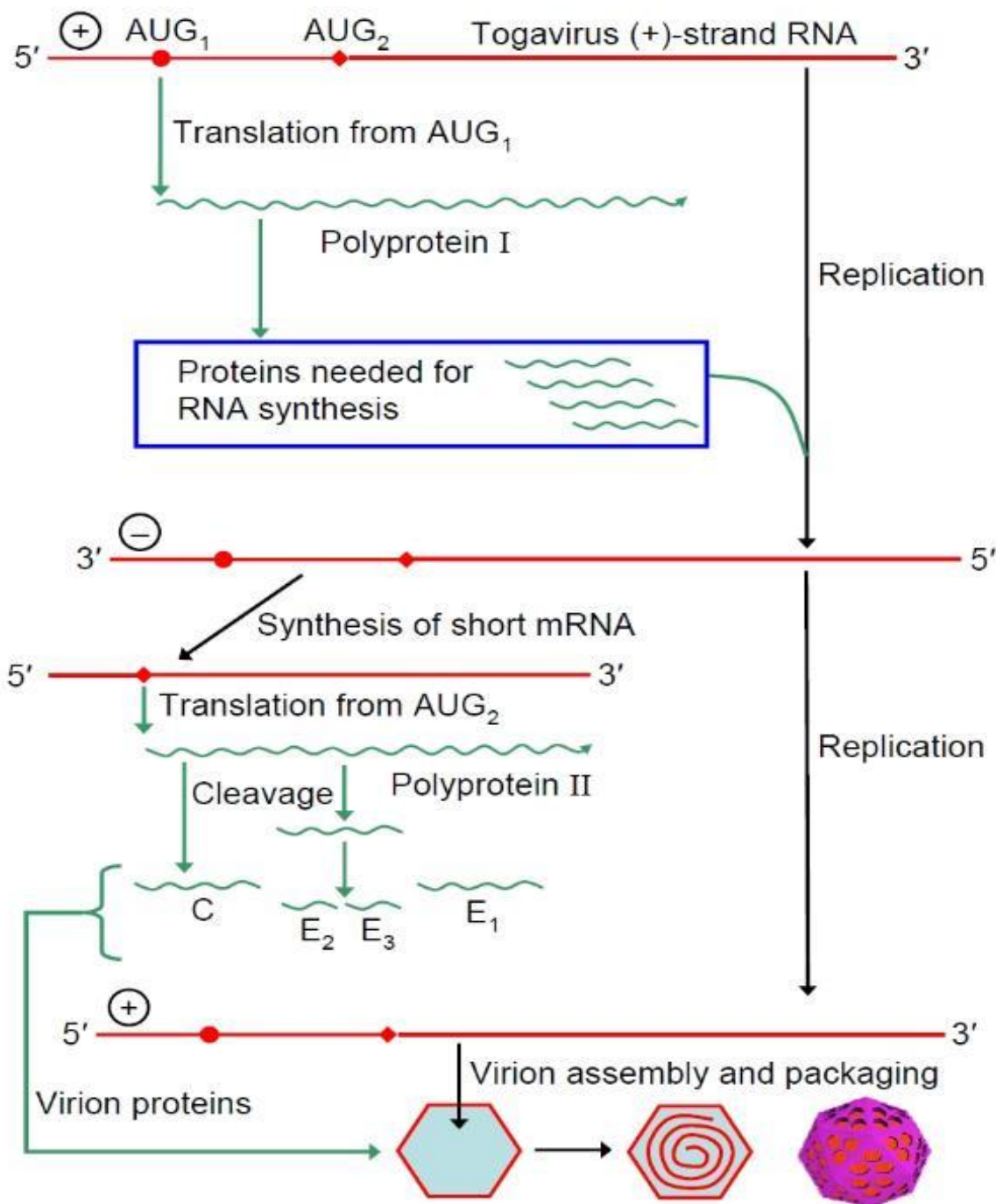
**Αυτή η στρατηγική χρησιμοποιείται για να επιτευχθεί διαφοροποίηση στον χρόνο των φάσεων της 'πρώιμης' από την ' όψιμη ή καθυστερημένη' φάση της αντιγραφής.**

**Στην πρώιμη φάση παράγονται μη-δομικές πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένης και της RNA πολυμεράσης , ενώ κατά την όψιμη φάση παράγονται οι δομικές πρωτεΐνες ( π.χ. togaviruses).**

**Η πρωτεόλυση προσφέρει επιπλέον ευκαιρίες για ρύθμιση της αναλογίας των διαφορετικών πολυπεπτιδίων που παράγονται σε κάθε φάση της αντιγραφής . Όλοι οι ιοί αυτής της τάξης έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων τους σε σχέση με την αναλογία των διαφορετικών κωδικοποιούμενων ιικών πρωτεϊνών και με το στάδιο του κύκλου της αντιγραφής όπου παράγονται.**







Το θετικής πολικότητας RNA περιέχει 2 κωδικόνια έναρξης της μετάφρασης (AUG) με αποτέλεσμα η μετάφραση να καταλήγει σε ένα διαφορετικό set πρωτεϊνών : τις πρώιμες από το 1<sup>ο</sup> κωδικόνιο και τις όψιμες από το 2<sup>ο</sup> κωδικόνιο. Και στις 2 περιπτώσεις συντίθενται πολυπρωτεΐνες οι οποίες στη συνέχεια θα διασπασθούν για να δώσουν τις λειτουργικές και δομικές πρωτεΐνες του ιού. Συγχρόνως η RNA πολυμεράση του ιού μετατρέπει το θετικής πολικότητας RNA, σε αρνητικής πολικότητας και το οποίο θα αποτελέσει την μήτρα για την μαζική παραγωγή θετικής πολικότητας RNA ώστε να πακεταρισθεί στο νουκλεοκαψίδιο του ιού.

## ΤΑΞΗ V : ΜΟΝΟΚΛΩΝΟ αρνητικής πολικότητας RNA

Τα γενώματα αυτών των ιών είναι:

- είτε τεμαχισμένα (segmented)
- είτε μη τεμαχισμένα (non-segmented) .

Το πρώτο βήμα στην αντιγραφή των orthomyxo ιών , των οποίων το γένωμα είναι τεμαχισμένο , είναι η μεταγραφή του αρνητικού κλώνου ((-) sense) vRNA από την ιική RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ( virion- associated RNA-dependent RNA polymerase) για την παραγωγή κυρίως μονοκιστρονικών mRNAs, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως μήτρες για την επακόλουθη αντιγραφή του γενώματός τους.

Όπως με όλα τα ιικά RNA γενώματα αρνητικής πολικότητας , το ενζυμικό σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης του ιού πακετάρεται με το νουκλεοκαψίδιο του και είναι άκρως απαραίτητο διότι κανένα κύτταρο ξενιστής δεν περιέχει ένζυμο ικανό να αποκωδικοποιήσει και να αντιγράψει το RNA γένωμα του ιού.

**Σε άλλες οικογένειες RNA ιών που φέρουν μη τεμαχισμένο γένωμα παράγονται επίσης μονοκιστρονικά mRNAs . Εδώ, ωστόσο, αυτά τα μηνύματα πρέπει να παραχθούν από ένα μονό, μεγάλο , αρνητικής πολικότητας RNA μόριο.**

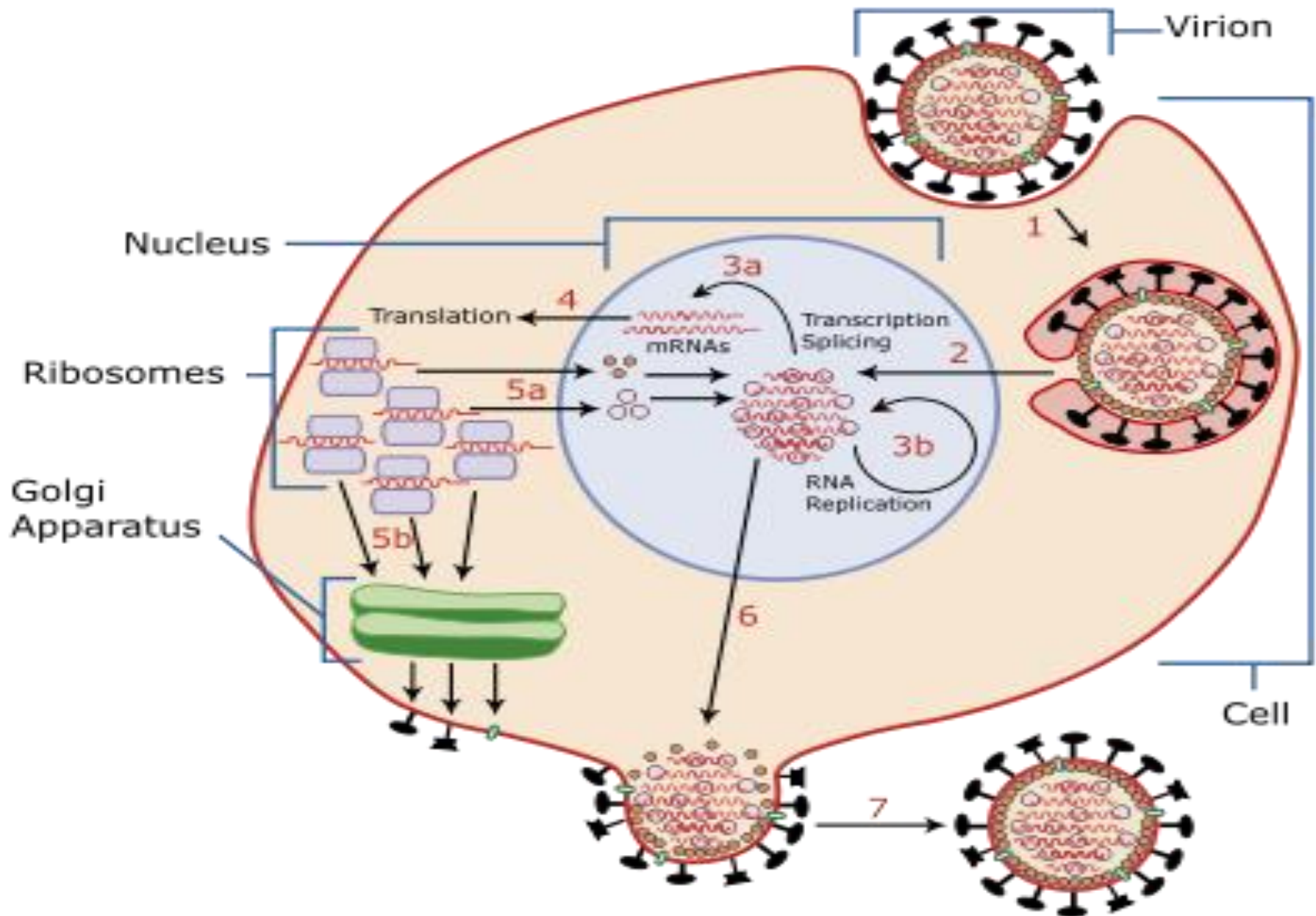
**Το πως αυτό επιτυγχάνεται δεν είναι σαφές. Πιθανώς ένα μόνο μεγάλο μετάγραφο παράγεται το οποίο εν συνεχεία διασπάται για να σχηματίσει ξεχωριστά mRNAs, αλλά είναι πιο πιθανό ότι αυτά τα μετάγραφα παράγονται ξεχωριστά από έναν μηχανισμό STOP AND START της μεταγραφής ο οποίος μηχανισμός ρυθμίζεται από τις συντηρημένες αλληλουχίες που υπάρχουν μεταξύ των γονιδίων του ιού.**

**Μηχανισμοί ματίσματος δεν χρησιμοποιούνται από αυτούς τους ιούς η οποίοι αντιγράφονται στο κυτταρόπλασμα.**

**Όλοι οι ιοί απαιτούν πολύ περισσότερα αντίτυπα των δομικών πρωτεϊνών τους σε σχέση με τις μη-δομικές πρωτεΐνες τους (π.χ. πολυμεράση) για κάθε ιικό σωματίδιο (virion) που παράγεται.**

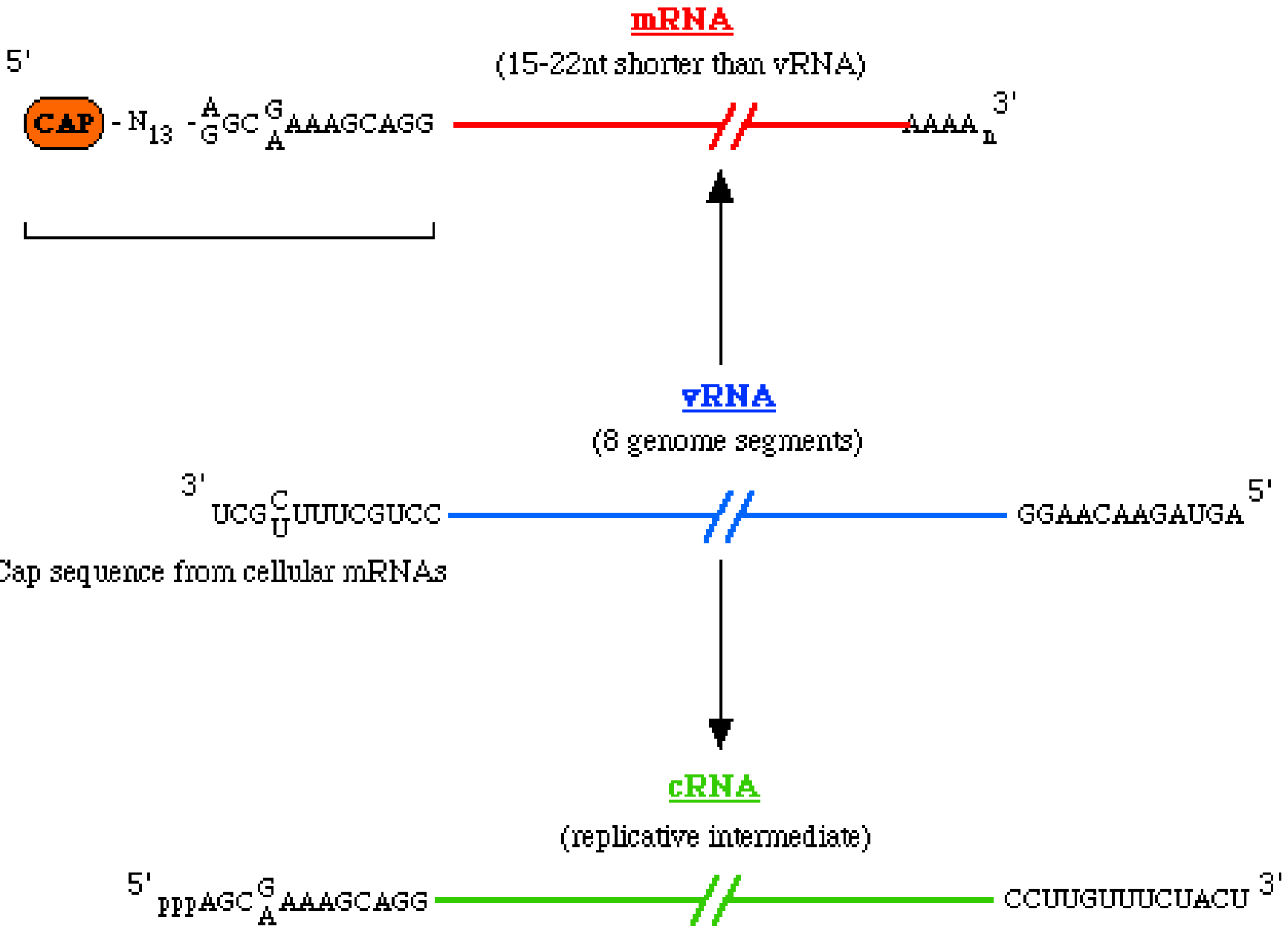
**Στην πράξη, η αναλογία των διαφορετικών πρωτεϊνών ρυθμίζεται τόσο κατά την διάρκεια της μεταγραφής όσο και μετέπειτα.**

# A). Τεμαχισμένα γενώματα , Ορθομυξιοί

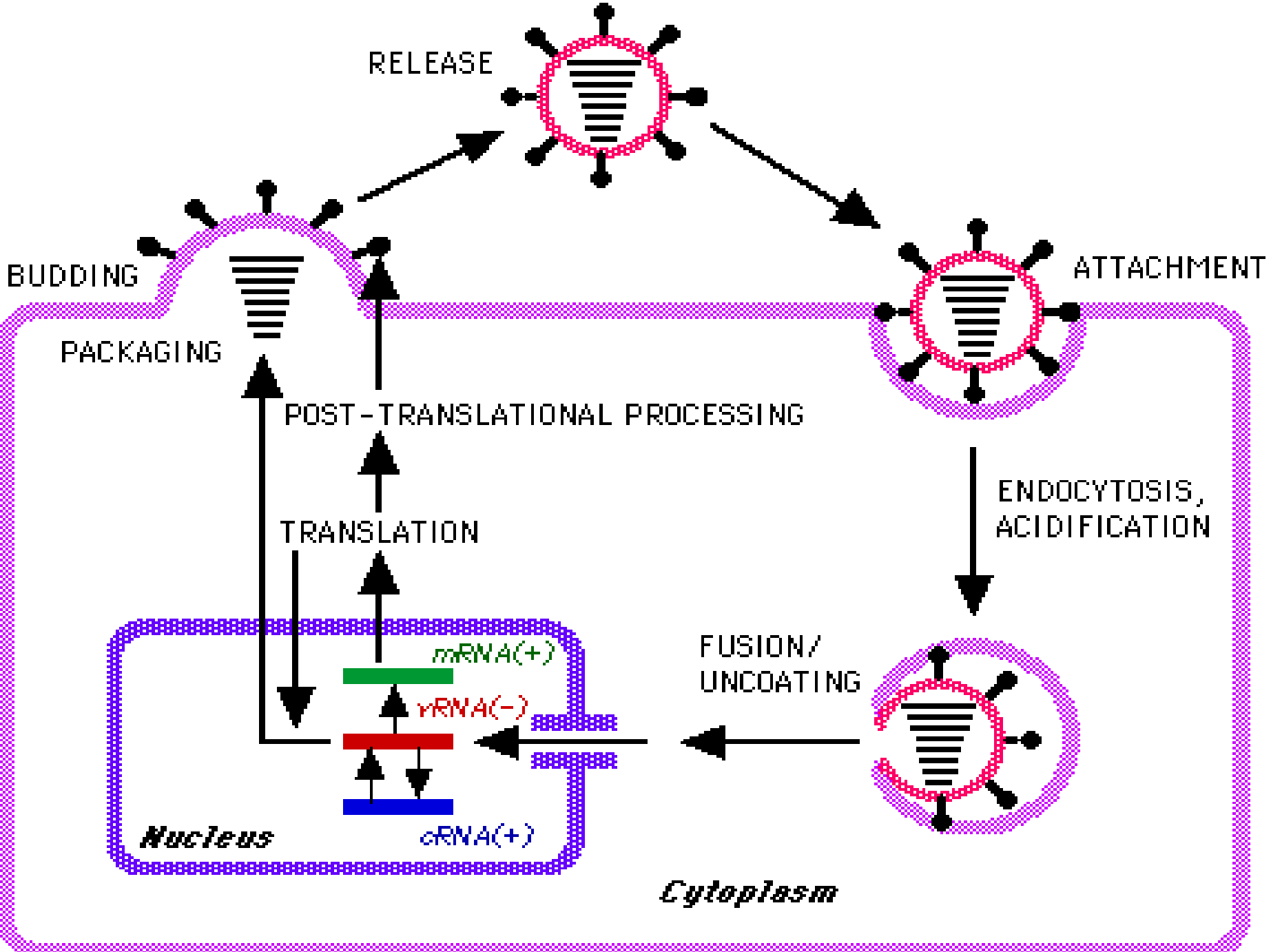


Ο ιός εισέρχεται στα επιθηλιακά κύτταρα μέσω πρόσδεσης της αιμοσυγκολλιτίνης του με το σιαλικό οξύ των επιθηλιακών κυττάρων (στάδιο 1 στο ανωτέρω σχήμα).

Ο ιός εισέρχεται μέσω ενδοκύτωσης στο κυτταρόπλασμα και απελευθερώνει το ιϊκό RNA (vRNA) καθώς και την RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση ([RNA-dependent RNA polymerase](#)) τα οποία μεταφέρονται στον πυρήνα του κυττάρου (στάδιο 2) όπου η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση μετατρέπει το αρνητικής πολικότητας RNA σε θετικής πολικότητας και ξεκινάει την μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων θετικής πολικότητας RNA (στάδια 3a και b). Τα ιϊκά mRNA αφού προσλάβουν την 5' καλύπτρα μεταφέρονται στο κυτταρόπλασμα και μεταφράζονται (στάδιο 4). Οι νέο συντιθέμενες ιϊκές πρωτεΐνες αιμοσυγκολιτίνη και νευραμινιδάση ταξιδεύουν μέσω του δικτύου Golgi στην επιφάνεια του κυττάρου ξενιστή (στάδιο 5b) ή επιστρέφουν στον πυρήνα για να συνδεθούν στο vRNA (στάδιο 5a). Άλλες ρυθμιστικές ιϊκές πρωτεΐνες αποδομούν το κυτταρικό [mRNA](#) αναστέλλοντας έτσι την μετάφραση των κυτταρικών mRNAs και επιπλέον χρησιμοποιούν τα απελευθερωμένα νουκλεοτίδια για την σύνθεση του vRNA. Το vRNAs, η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση καθώς και οι λοιπές πρωτεΐνες οι οποίες αποτελούν το νουκλεοκαψίδιο εγκαταλείπουν τον πυρήνα και μεταφέρονται προς την μεμβράνη του κυττάρου όπου έχουν συσσωρευθεί η αιμοσυγκολιτίνη και η νευραμινιδάση (στάδιο 6). Το ιϊκό σωματίδιο μέσω εκβλάστησης εγκαταλείπει το κύτταρο έχοντας περιλάβει στο εξωτερικό του περίβλημα την αιμοσυγκολιτίνη και την νευραμινιδάση η οποία θα διασπάσει το σιαλικό οξύ του κυττάρου ξενιστή ώστε να επιτρέψει την απελευθέρωση του ιού (στάδιο 7).

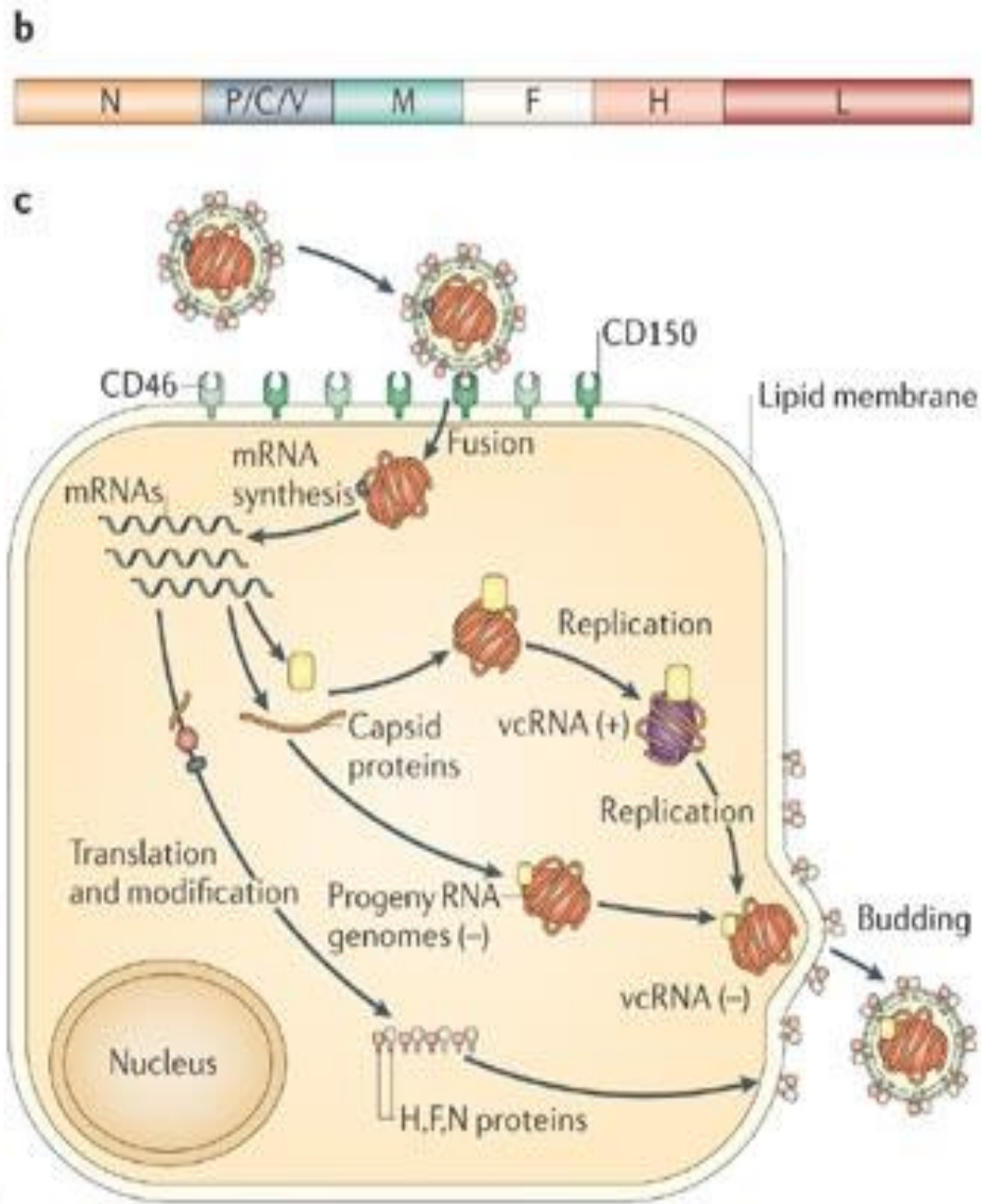
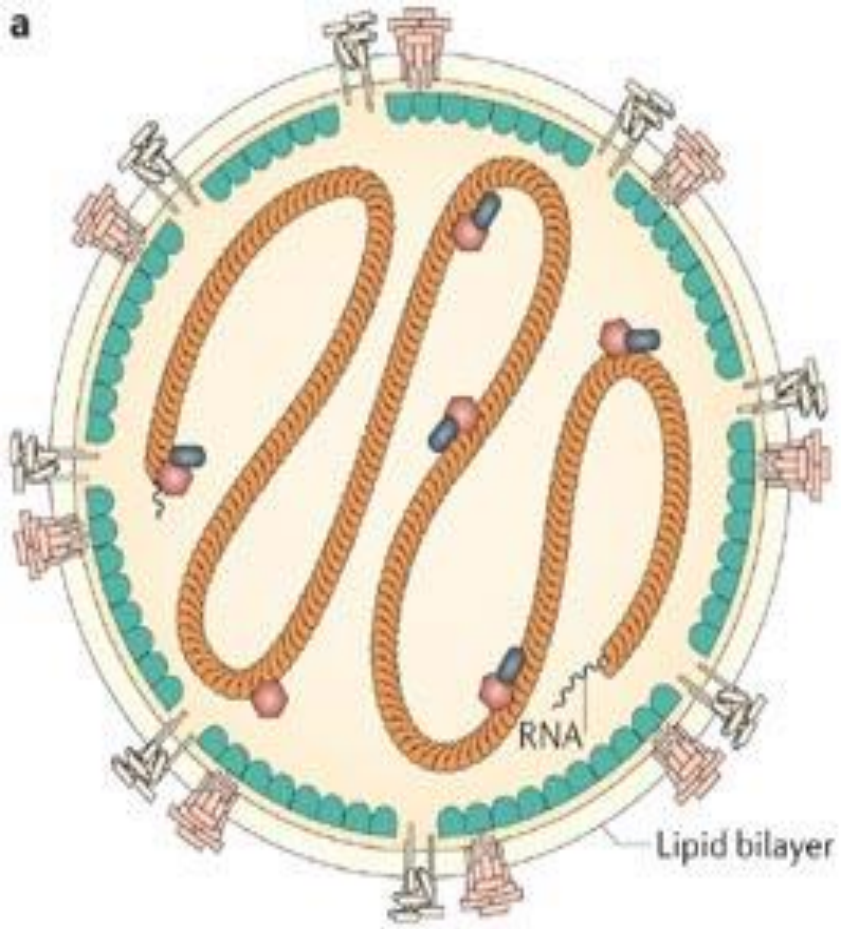


<b>Segment:</b>	<b>Size (nt)</b>	<b>Polypeptide(s)</b>	<b>Function</b>
<b>1</b>	<b>2341</b>	<b>PB2</b>	<b>Transcriptase: cap binding</b>
<b>2</b>	<b>2341</b>	<b>PB1</b>	<b>Transcriptase: elongation</b>
<b>3</b>	<b>2233</b>	<b>PA</b>	<b>Transcriptase: protease activity (?)</b>
<b>4</b>	<b>1778</b>	<b>HA</b>	<b>Haemagglutinin</b>
<b>5</b>	<b>1565</b>	<b>NP</b>	<b>Nucleoprotein: RNA binding; part of transcriptase complex; nuclear/cytoplasmic transport of vRNA</b>
<b>6</b>	<b>1413</b>	<b>NA</b>	<b>Neuraminidase: release of virus</b>
<b>7</b>	<b>1027</b>	<b>M1</b>	<b>Matrix protein: major component of virion</b>
		<b>M2</b>	<b>Integral membrane protein - ion channel</b>
<b>8</b>	<b>890</b>	<b>NS1</b>	<b>Non-structural: nucleus; effects on cellular RNA transport, splicing, translation. Anti-interferon protein.</b>
		<b>NS2</b>	<b>Non-structural: nucleus+cytoplasm, function unknown</b>









Το γένωμα των Paramyxoviridae κωδικοποιεί για 6 πρωτεΐνες τις : N, P, M, F, τις πρωτεΐνες του περιβλήματος (HN ή H ) και την L.

Οι πρωτεΐνες L και P αποτελούν το σύμπλοκο της RNA πολυμεράσης.

Η πρωτεΐνη F εμπλέκεται στην σύντηξη με την κυτταρική μεμβράνη , η πρωτεΐνη M ( μήτρα, matrix protein) συνδέει το νουκλεοκαψίδιο με το περίβλημα του ιού.

Σε κάποιους εκ των Paramyxoviridae υπάρχει η αιμοσυγκολιτίνη και η νευραμινιδάση ενώ σε κάποιους άλλους όπως στον ιό της Ιλαράς μόνο η αιμοσυγκολιτίνη.

Τέλος η πρωτεΐνη C ρυθμίζει την μεταγραφή.

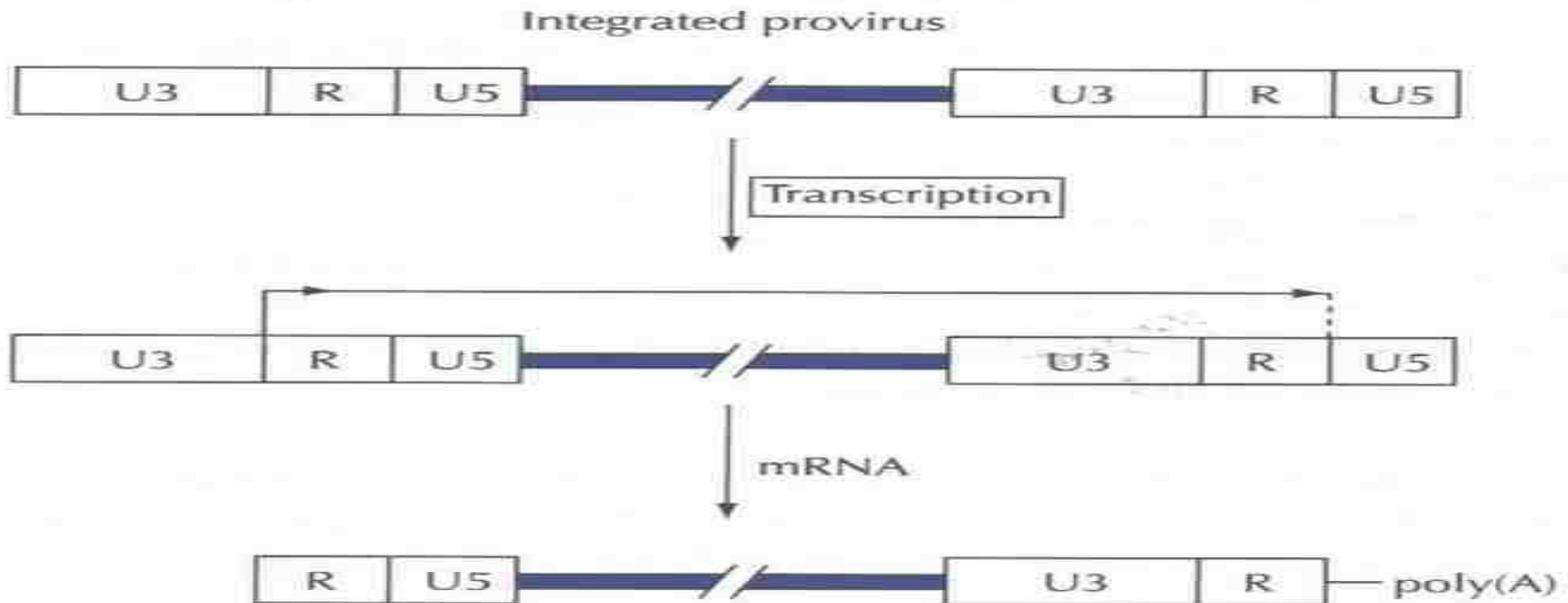
Όπως φαίνεται και στην ανωτέρω εικόνα η αντιγραφή, μεταγραφή του γενώματος των Paramyxoviridae λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα και το mRNA δεν φέρει καλύπτρα και δεν είναι πολυαδενυλιωμένο .

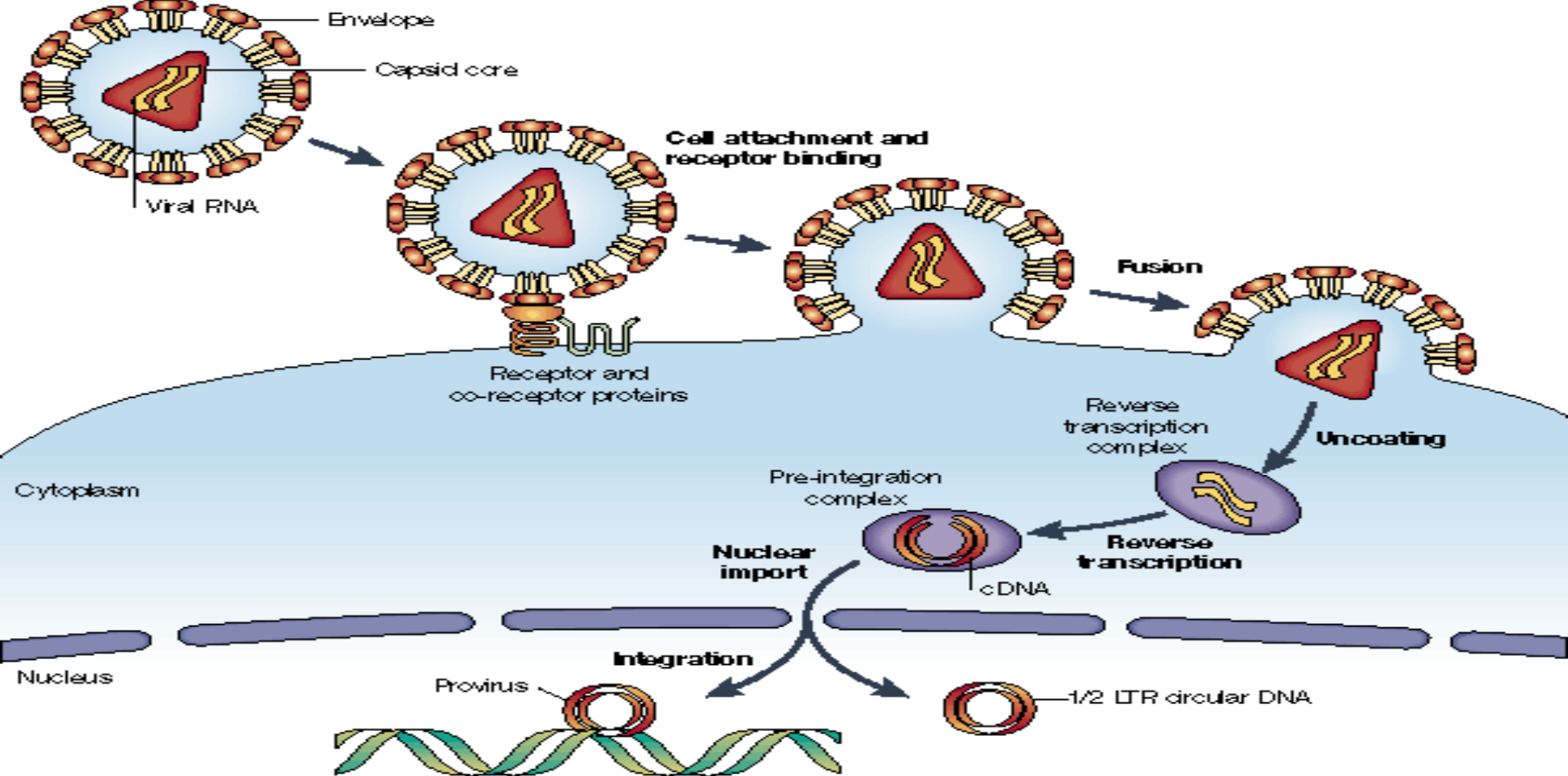
Όλοι οι ιοί απαιτούν πολύ περισσότερα αντίτυπα των δομικών πρωτεϊνών τους σε σχέση με τις μη-δομικές πρωτεΐνες τους (π.χ. πολυμεράση) για κάθε ιικό σωματίδιο (virion) που παράγεται. Στην πράξη, η αναλογία των διαφορετικών πρωτεϊνών ρυθμίζεται τόσο κατά την διάρκεια της μεταγραφής όσο και μετέπειτα. Στους paramyxoviruses για παράδειγμα, υπάρχει μια ξεκάθαρη πολικότητα της μεταγραφής από το 3' άκρο του γενώματος προς το 5' άκρο , με αποτέλεσμα την σύνθεση πολύ περισσότερων mRNAs για δομικές πρωτεΐνες ( οι οποίες κωδικοποιούνται στο 3' άκρο του γενώματος) , παρά για τις μη-δομικές πρωτεΐνες που βρίσκονται στο 5' άκρο του γενώματος .

Το πλεονέκτημα της παραγωγής μονοκιστρονικών mRNAs είναι ότι η μεταφραστική αποτελεσματικότητα του κάθε μηνύματος μπορεί να ποικίλει σε σχέση με τα άλλα μηνύματα.

# ΤΑΞΗ VI : ΜΟΝΟΚΛΩΝΟ ΘΕΤΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΟΤΗΤΑΣ RNA ΜΕ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ DNA

Οι ρετροϊοί εξαρτώνται κατά μεγάλο ποσοστό για την μεταγραφή τους από τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή . Το RNA τους αν και θετικής πολικότητας δεν λειτουργεί ως mRNA αλλά αποτελεί μήτρα για την αντίστροφη μεταγραφή του σε DNA. Μόλις ο ιός ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή υπό την μορφή του προιού (provirus) βρίσκεται υπό τον έλεγχο του κυττάρου ξενιστή και μεταγράφεται ακριβώς όπως και τα άλλα κυτταρικά γονίδια. Μερικοί ρετροϊοί, ωστόσο, έχουν αναπτύξει αρκετούς μεταγραφικούς και μετά-μεταγραφικούς μηχανισμούς που τους επιτρέπουν να ελέγχουν την έκφραση των γενετικών τους πληροφοριών.





Το ιικό cDNA (pre-integration complex) μεταφέρεται στον πυρήνα του κυττάρου όπου η ιική integrase καταλύει την αντίδραση της ενσωμάτωσης του ιικού cDNA στο DNA του κυττάρου ξενιστή ώστε να δημιουργηθεί ο προϊός. Σε ορισμένες περιπτώσεις το ιικό cDNA αντί να ενσωματωθεί στο DNA του κυττάρου ξενιστή κυκλοποιείται και σχηματίζει ένα επίσωμα το οποίο περιέχει 1 ή 2 long terminal repeats (LTR). Αυτές οι κυκλικές μορφές δεν μπορούν να αντιγραφούν και αποδομούνται.

Η λειτουργία της RNA πολυμεράσης II είναι η μεταγραφή ενός γονιδίου σε mRNA το οποίο εν συνεχεία θα μεταφρασθεί. Στο DNA οι επιπλέον αλληλουχίες οι οποίες δεν μεταγράφονται σε RNA περιλαμβάνουν τον επαγωγέα ( όπου συνδέεται η RNA πολυμεράση II ), τους επαυξητές, οι οποίοι τοποθετούνται πριν και μετά την περιοχή που θα μεταγραφεί σε mRNA και την polyA περιοχή. Έτσι το mRNA είναι πάντοτε μικρότερο από το αντίστοιχο γονίδιο ακόμη και αν δεν παρεμβάλλονται εσώνια.

Στους ρετροϊούς αυτή η απώλεια αντισταθμίζεται από το γεγονός ότι φέρουν επιπλέον αντίγραφα του επαγωγέα και του επαυξητή (U3 και U5 αντίστοιχα).

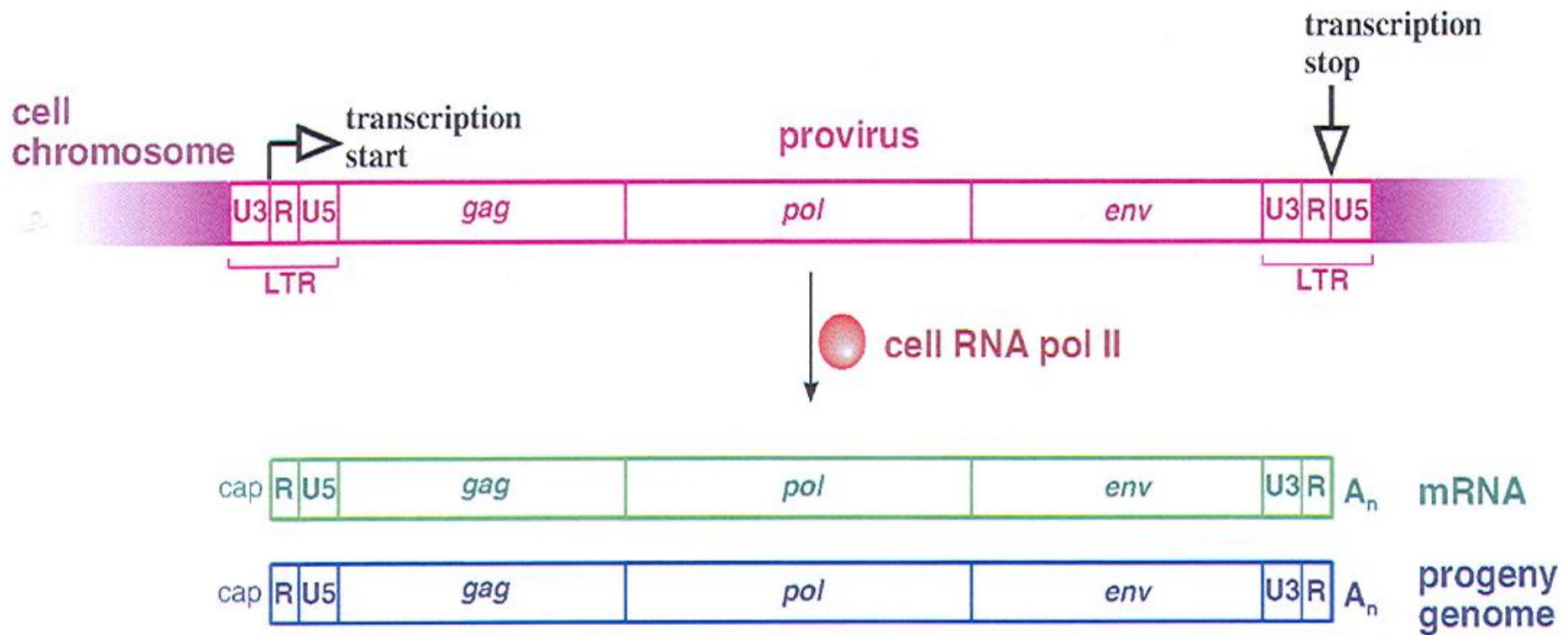
Τα LTRs ευρίσκονται μόνο στον DNA ιό, (προϊό).

Όταν η RNA πολυμεράση II αναγνωρίσει τον επαγωγέα της στην U3 περιοχή ξεκινά την μεταγραφή στην αρχή της R ( αριστερό άκρο) και σταματάει στην περιοχή R ( στο δεξί άκρο) όπου εντοπίζεται ένα σήμα πολυαδενυλίωσης και δίνει ένα πλήρες μετάγραφο

**R-U5-RETROVIRUSES GENES -U3- R**

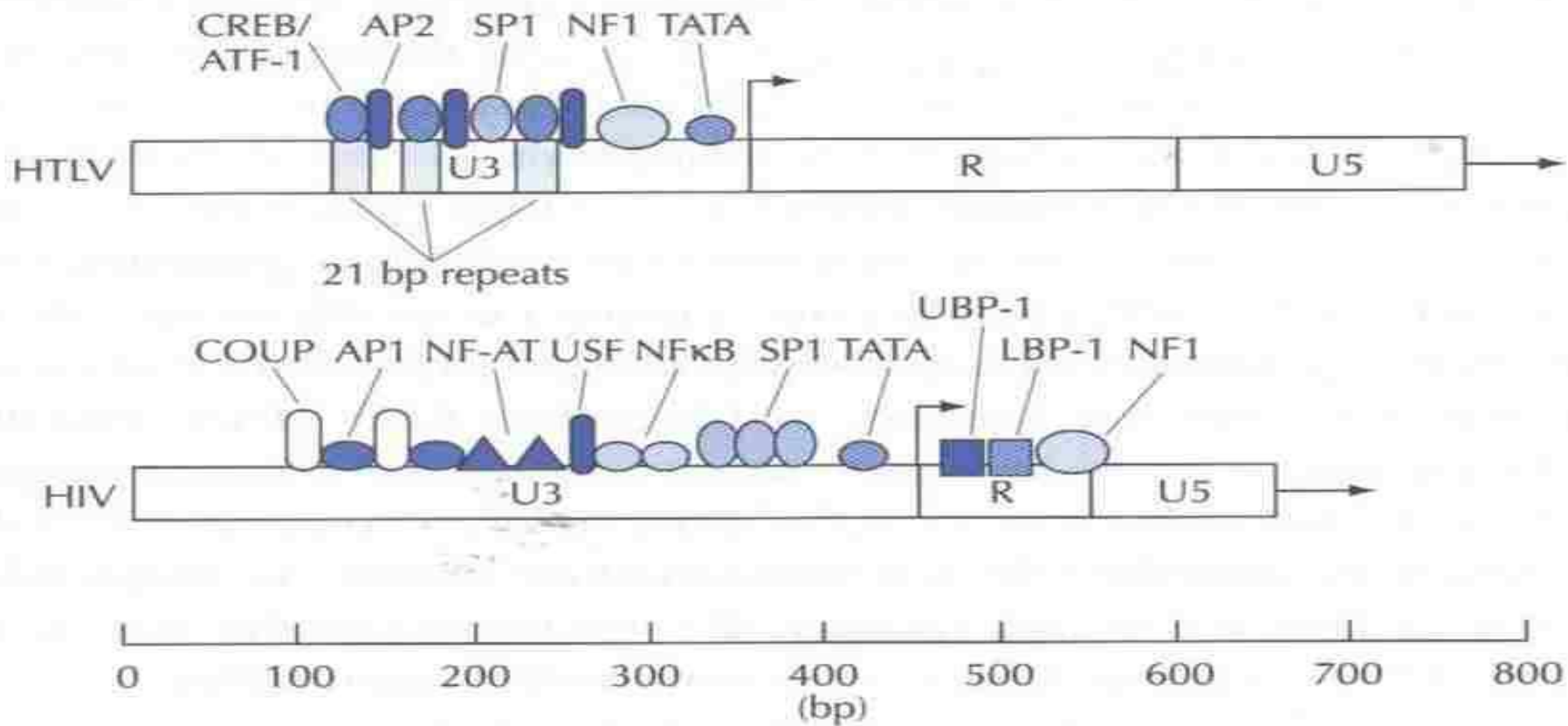
δηλ. έχουν χαθεί οι τελικές περιοχές U3 και U5.

Κάθε μετάγραφο φέρει καλύπτρα και πολύ A ουρά . Ορισμένα μετάγραφα θα λειτουργήσουν ως mRNA και εξ αυτών ορισμένα θα υποβληθούν σε μάτισμα ( με πράσινο χρώμα στην κατωτέρω εικόνα) ενώ άλλα θα αποτελέσουν το ιϊκό γένωμα ( με μπλε χρώμα).



## Ρετροϊοί του Ανθρώπου (Human T-cell leukaemia virus -HTLV και Human immunodeficiency virus-HIV)

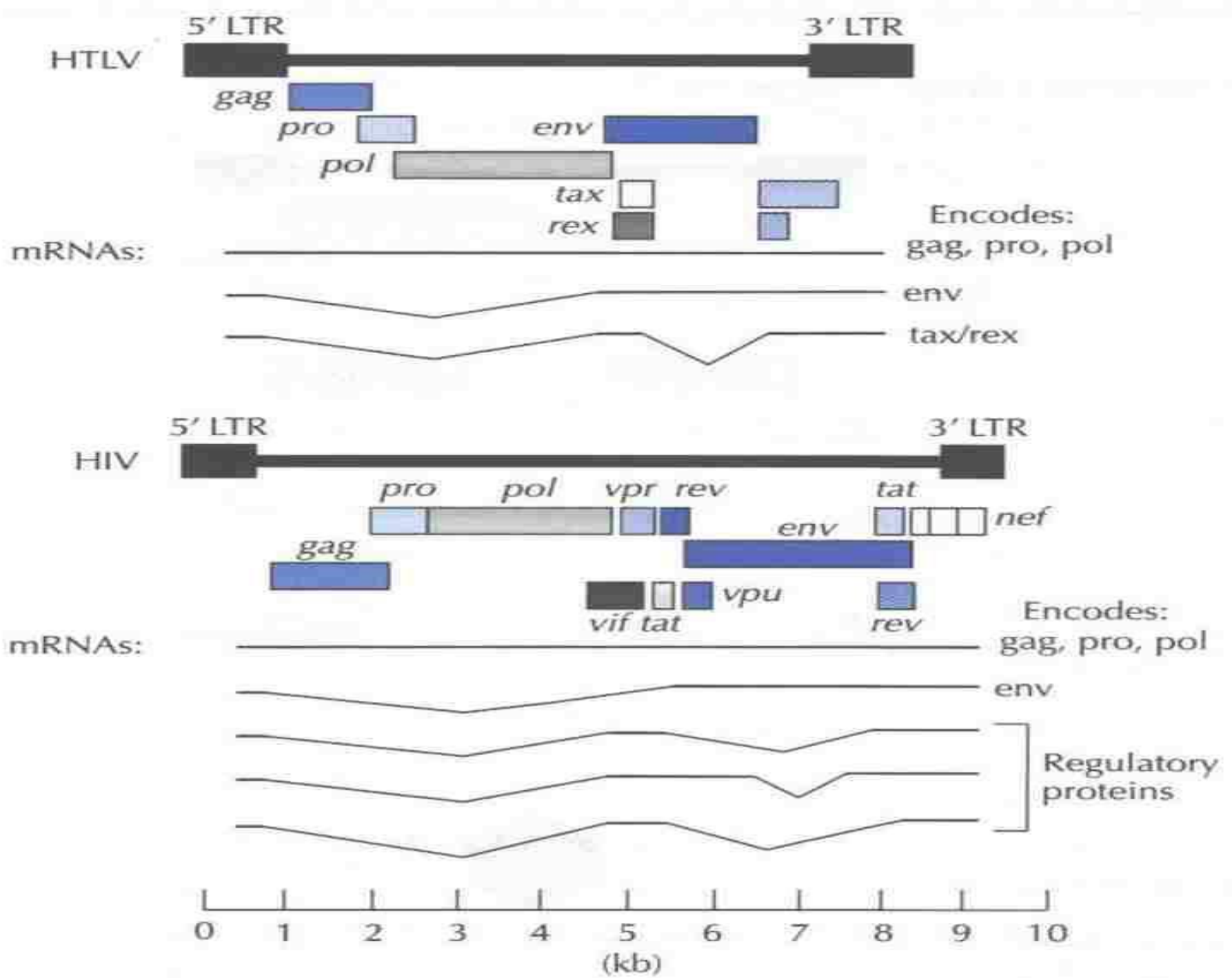
Η παρουσία πολλών θέσεων σύνδεσης για τους παράγοντες της κυτταρικής μεταγραφής στις γενωμικές περιοχές LTRs των ρετροϊών παρουσιάζεται κατωτέρω.



Μαζί, τα στοιχεία όπως ,NFκB και SP1 και το TATA box, σχηματίζουν έναν λειτουργικό επαγωγέα της μεταγραφής στην περιοχή U3 του LTR. Ωστόσο, η βασική ενεργότητα αυτών των επαγωγέων είναι από μόνη της σχετικά αδύναμη, και παρουσιάζει μόνο περιορισμένη μεταγραφική ενεργότητα του προιού από την κυτταρική RNA πολυμεράση II.

Αμφότεροι οι ιοί HTLV και HIV κωδικοποιούν πρωτεΐνες οι οποίες είναι trans-acting θετικοί ρυθμιστές της μεταγραφής: τις πρωτεΐνες tax και tat αντίστοιχα . Αυτές οι πρωτεΐνες αυξάνουν την μεταγραφική ενεργότητα τουλάχιστον κατά 50-100 φορές.





Η πρωτεΐνη HTLV tax προσδένεται σε τρεις αλληλουχίες 21 bp πλούσιες σε στοιχεία GC- (CRE ) στην περιοχή LTR. Η πρωτεΐνη tax επίσης σχηματίζει αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης με έναν σημαντικό αριθμό διαφορετικών κυτταρικών παραγόντων μεταγραφής , όπως π.χ. με την p105.

Η πρωτεΐνη tax αυξάνει επίσης τον διμερισμό των 'bZIP' πρωτεϊνών που προσδένονται στο DNA μέσω της δομής «φερμουάρ λευκίνης» - (leucine zipper). Ο διμερισμός αυτών των πρωτεϊνών απαιτείται για την πρόσδεση στο DNA και συνεπώς την μεταγραφική ενεργοποίηση και η πρωτεΐνη tax διεγείρει αυτήν την διαδικασία.

Ο παράγοντας NFκB παίζει έναν κεντρικό ρόλο στον έλεγχο της μεταγραφής και στην ενεργοποίηση των λεμφοκυττάρων από ανοσολογικής άποψης.

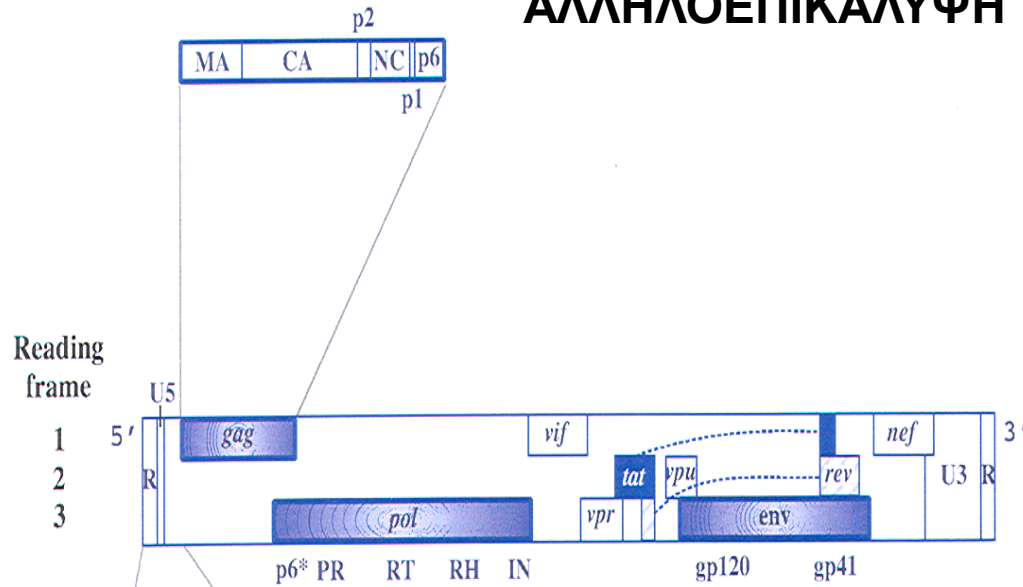
Η πρωτεΐνη tat του HIV προσδένεται σε μια δομή «στελέχους-θηλιάς» στο 5' άκρο του mRNAs που μεταγράφεται από το LTR, γνωστό ως στοιχείο TAR (trans-activation response) . Απουσία της tat , η έναρξη της μεταγραφής από το LTR είναι εφικτή , αλλά η μεταγραφή είναι αναποτελεσματική επειδή ο επαγωγέας σχηματίζει ένα σύμπλοκο χαμηλής συγγένειας με την πολυμεράση το οποίο εγκαταλείπει πρόωρα το μικρό DNA. Αντίθετα παρουσία της προσδεδεμένης tat στο στοιχείο TAR, σχηματίζει ένα διαφορετικό σύμπλοκο έναρξης της μεταγραφής το οποίο είναι ικανό να ολοκληρώσει την μεταγραφή του HIV γενώματος .

**Κατά συνέπεια οι πρωτεΐνες tax HTLV και tat HIV είναι θετικοί ρυθμιστές του επαγωγέα στο LTR του προιού και είναι υπό τον έλεγχο του ιού.**

**Καθένας εξ αυτών των ιών κωδικοποιεί μια επιπλέον πρωτεΐνη, τις πρωτεΐνες rex και rev για τους HTLV και HIV αντίστοιχα, οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω την γονιδιακή έκφραση σε ένα μετα - μεταγραφικό επίπεδο.**

**Ο έλεγχος της μεταγραφής είναι ένα σημαντικό βήμα στην αντιγραφή του ιού και είναι αυστηρά ρυθμιζόμενο.**

# ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ HIV-1 ΕΜΦΑΝΙΖΟΝΤΑΙ ΤΑ ΑΝΟΙΚΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΜΕ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΕΠΙΚΑΛΥΨΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΟΥΣ



## Main genes

<i>gag</i>	group-specific antigen (encodes matrix, capsid, p2, nucleocapsid, p1 and p6)
<i>pol</i>	polymerase (encodes p6*, protease, reverse transcriptase, RNase H, integrase)
<i>env</i>	envelope

## Auxiliary genes

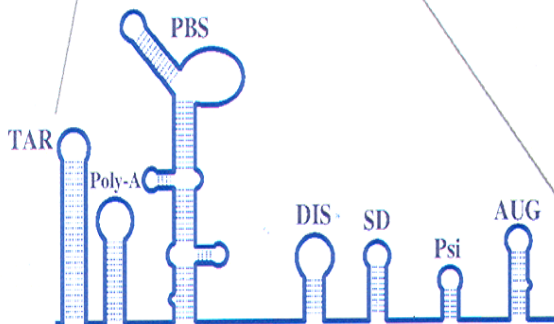
<i>nef</i>	negative regulatory factor
<i>rev</i>	regulator of expression of virion proteins
<i>tat</i>	transactivator of transcription
<i>vif</i>	virion infectivity factor
<i>vpr</i>	viral protein R
<i>vpu</i>	viral protein U

## Non-coding sequences

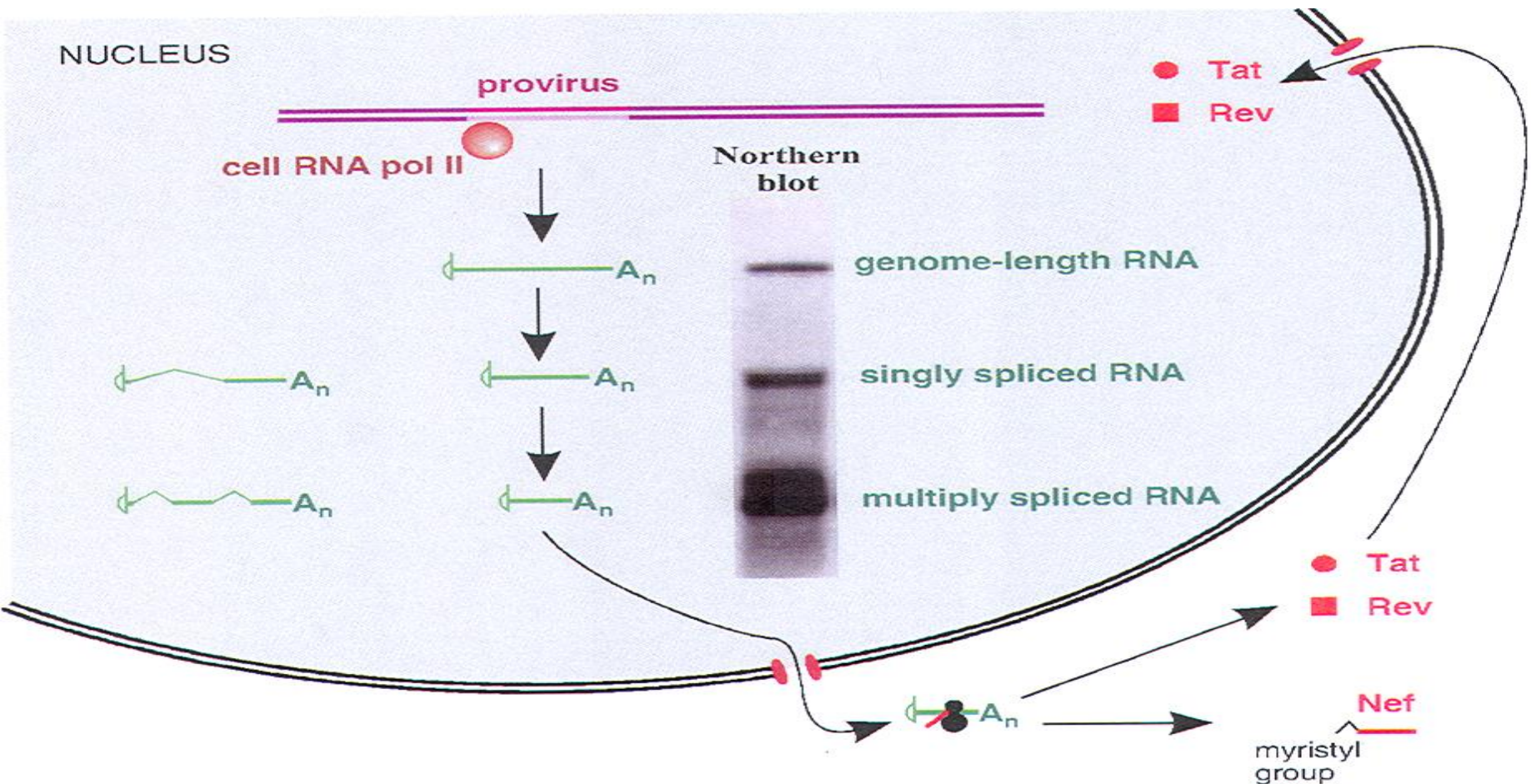
R	repeat sequence
U3	unique sequence at 3' end of genome
U5	unique sequence at 5' end of genome

## Domains at the 5' end of the genome

TAR	trans-acting response element
Poly-A	polyadenylation signal
PBS	primer-binding site
DIS	dimerization initiation site (involved in formation of kissing loop complex)
SD	splice donor site
Psi ( $\Psi$ )	main part of the packaging signal
AUG	start codon of the <i>gag</i> gene



Το Northern Blot αποκαλύπτει την ύπαρξη τουλάχιστον δυο ομάδων μορίων mRNA οι οποίες έχουν υποβληθεί σε μάτισμα νωρίς μετά την μόλυνση των κυττάρων, εξέρχονται του πυρήνα όπου μεταφράζονται και οι πρωτεΐνες tat και rev επανέρχονται στον πυρήνα. Η πρωτεΐνη Nef επηρεάζει αρνητικά την έκφραση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των CD4 λεμφοκυττάρων (MHC class I, II), συμβάλλοντας έτσι στην μειωμένη ανοσολογική απόκριση του ξενιστή.

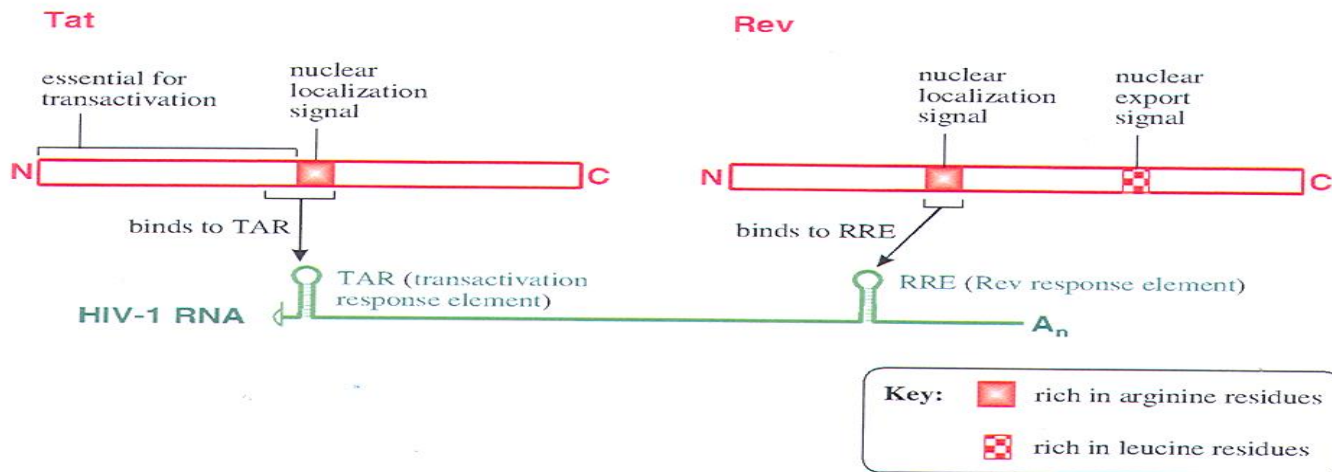
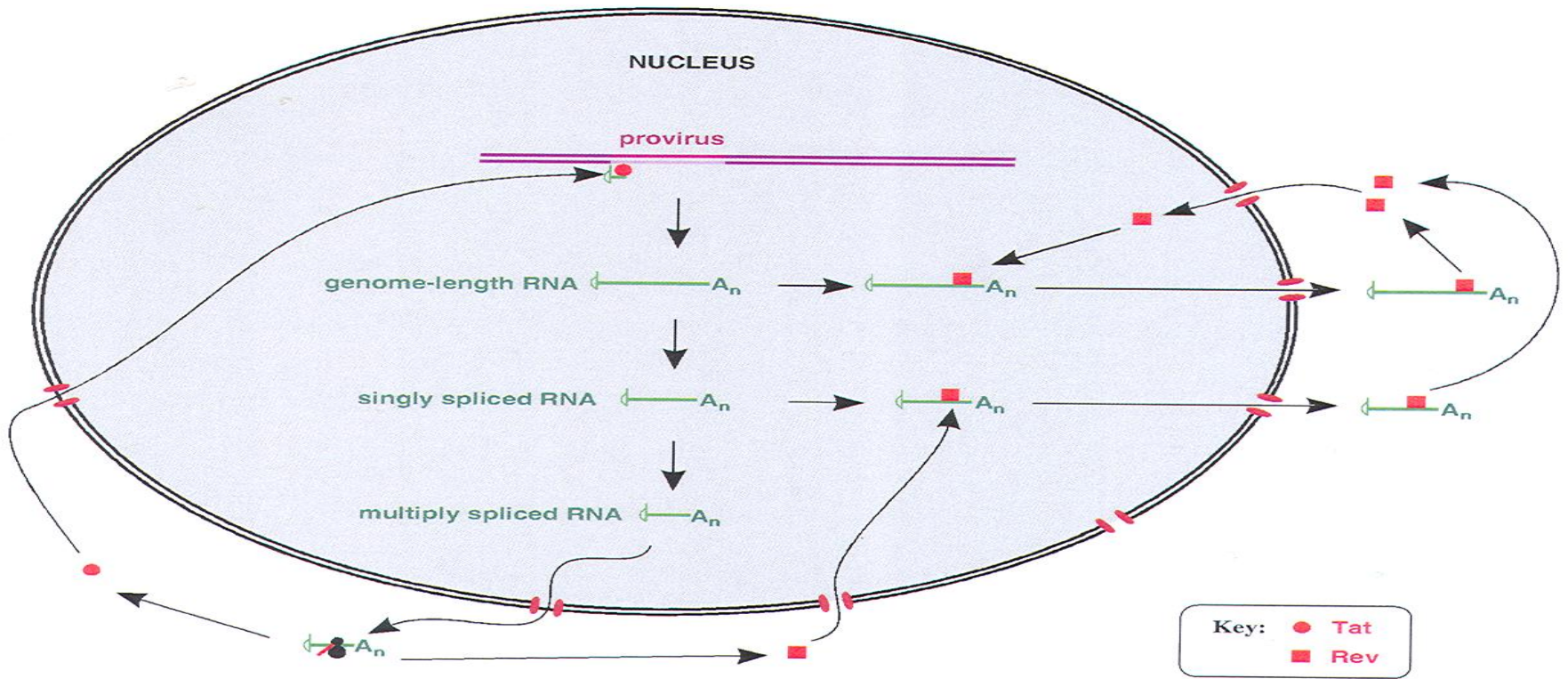


Οι πρωτεΐνες tax/tat και rex/rev εκφράζονται αμέσως μετά την μόλυνση. Και οι δυο πρωτεΐνες προσδένονται σε μια δευτεροταγή δομή που σχηματίζεται από μια συγκεκριμένη αλληλουχία στο mRNA και παλινδρομούν μεταξύ του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος μια που αναγνωρίζουν σήματα πυρηνικής εντόπισης, αλλά και σήματα εξαγωγής από τον πυρήνα.

Η πρωτεΐνη tat (trans ενεργοποιητής της μεταγραφής) φέρει μια αλληλουχία η οποία αναγνωρίζει την αλληλουχία TAR (transactivation response element) στο 5' άκρο του ιϊκού RNA .

Κατά συνέπεια η πρωτεΐνη tat λειτουργεί ως ένας μεταγραφικός παράγων ο οποίος όμως δεν προσδένεται στο DNA αλλά στο νεοσυντιθέμενο RNA και ενεργοποιεί την μεταγραφή του ιϊκού γενώματος. Απουσία της πρωτεΐνης tat η μεταγραφή είναι κατά κανόνα αναποτελεσματική.

Η πρωτεΐνη rev φέρει επίσης μια αλληλουχία η οποία αναγνωρίζει σήματα πυρηνικής εντόπισης και αναγνωρίζει την αλληλουχία RRE (rev response element) η οποία εντοπίζεται σε μη ματισμένα ή σε μονά ματισμένα μετάγραφα . Καθώς η πρωτεΐνη rev συσσωρεύεται στον πυρήνα συνδέεται στο στοιχείο RRE και προκαλεί την μετάπτωση για την σύνθεση των όψιμων πρωτεϊνών οι οποίες μεταφράζονται από μη ματισμένα ή μονά ματισμένα μετάγραφα.



**Πολλά γενώματα ιών κωδικοποιούν trans-acting παράγοντες οι οποίοι τροποποιούν ή και διευθύνουν την κυτταρική μεταγραφή. Παραδείγματα αποτελούν οι ιοί HTLV και HIV όπως περιγράφηκε ανωτέρω , αλλά επίσης , η X πρωτεΐνη των hepadnaviruses, η rep πρωτεΐνη των parvoviruses, η E1A πρωτεΐνη των αδενοϊών (adenoviruses ) και οι άμεσα πρώιμες πρωτεΐνες των ερπητοιών (herpesviruses).**



## **ΤΑΞΗ VII : ΔΙΚΛΩΝΟ DNA ΜΕ ΕΝΔΙΑΜΕΣΟ RNA**

**Η έκφραση των γενωμάτων αυτών των ιών είναι σύνθετη και σχετικά ελλιπώς κατανοητή.**

**Οι hepadnaviruses περιέχουν ένα αριθμό αλληλο-επικαλυπτόμενων ανοικτών πλαισίων ανάγνωσης σχεδιασμένα έτσι ώστε να περιέχεται η μέγιστη δυνατή κωδικοποιούσα πληροφορία σε ένα μικρό γένωμα.**

**Εδώ παρατηρείται το ακριβώς αντίθετο από ότι με τους ρετροϊούς. Οι hepadnaviruses φέρουν το μικρό DNA γένωμά τους εντός του ιικού σωματιδίου ,το οποίο αντιγράφεται σε RNA στα μολυσμένα κύτταρα από την RNA πολυμεράση II και το RNA το οποίο προκύπτει μετατρέπεται πάλι σε DNA από την αντίστροφη μεταγραφάση του ιού στα ώριμα σωματίδια.**

**Στο ιικό σωματίδιο το DNA είναι μερικώς δίκλωνο , ο αρνητικός κλώνος είναι πλήρης αν και δεν σχηματίζει κύκλο. Τα 5' και το 3' άκρα είναι ελεύθερα. Στο 5' άκρο συνδέεται η αντίστροφη μεταγραφάση.**

**Το DNA «υβριδίζεται» μερικώς με τον θετικό κλώνο.**

**Μόλις το γονιδίωμα του ιού βρεθεί στον πυρήνα μετατρέπεται σε κυκλικό μόριο DNA . Τα άκρα κάθε αλυσίδας ενώνονται και σχηματίζουν ένα ομοιοπολικά κλειστό κυκλικό DNA (cccDNA).**

**Δεν είναι γνωστό εάν η ιική Ρ πρωτεΐνη παίζει κάποιο ρόλο σε αυτές τις τροποποιήσεις ή εάν πραγματοποιούνται μόνο από ένζυμα του ξενιστή.**

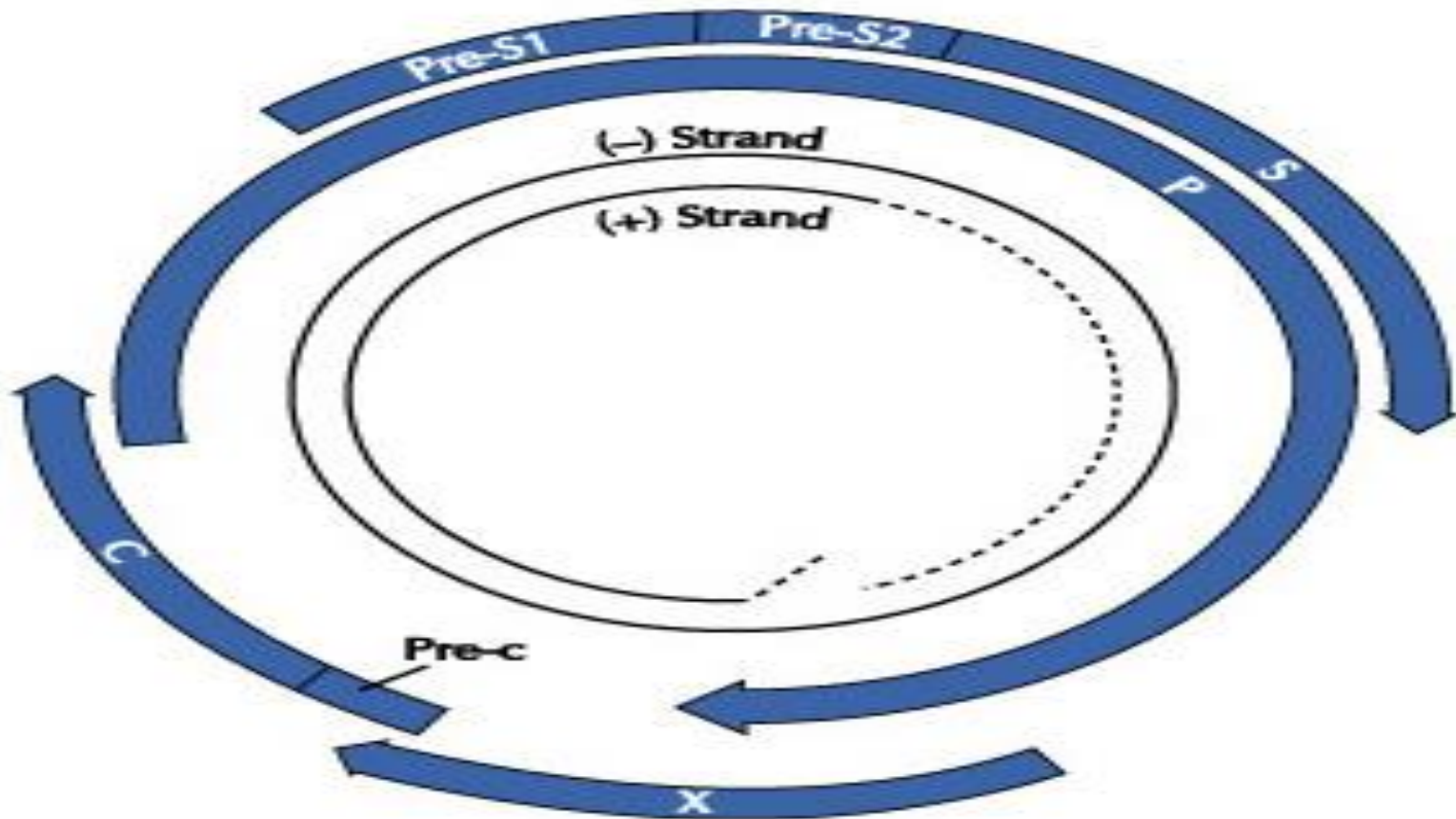
Ο ιός φέρει 4 γονίδια :

Το γονίδιο C το οποίο κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη του καψιδίου

Το γονίδιο P το οποίο κωδικοποιεί για την πολυμεράση

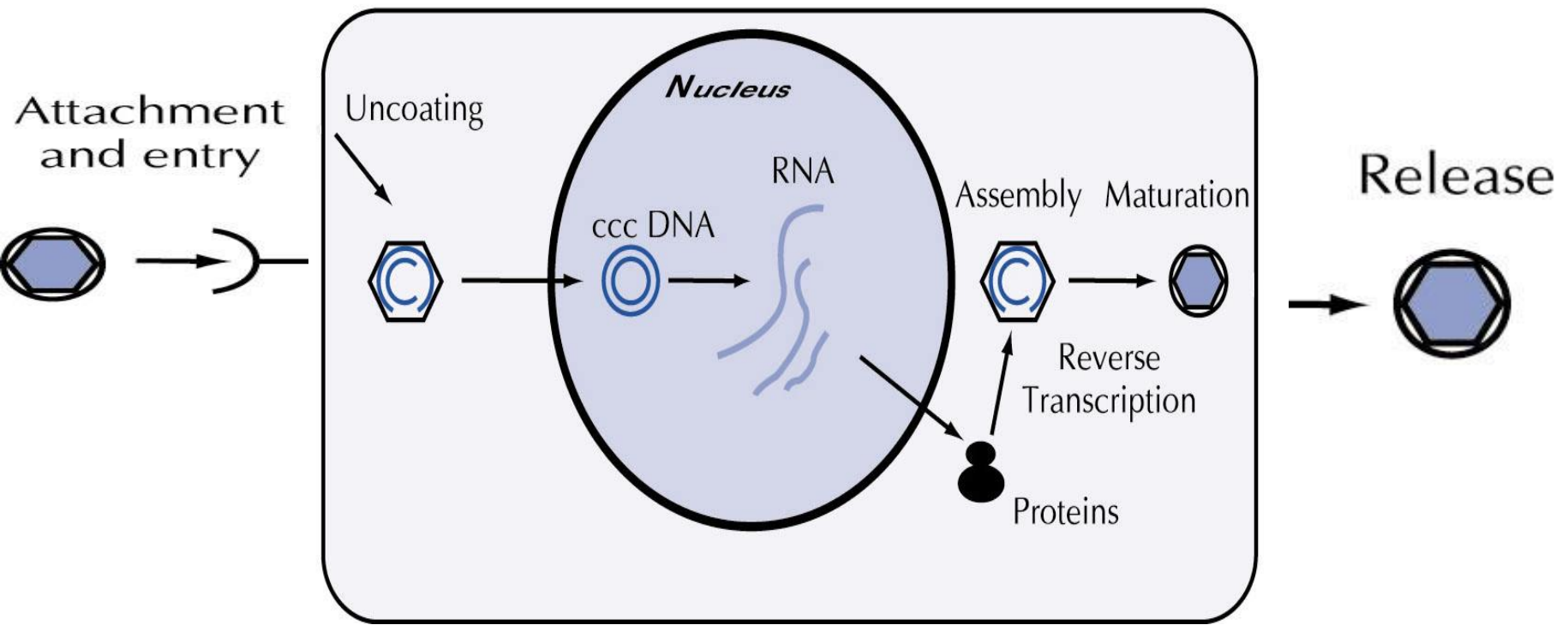
Το γονίδιο S το οποίο μέσω εναλλακτικού ματίσματος κωδικοποιεί για τα αντιγόνα επιφανείας pre-S1 , pre-S2 και S

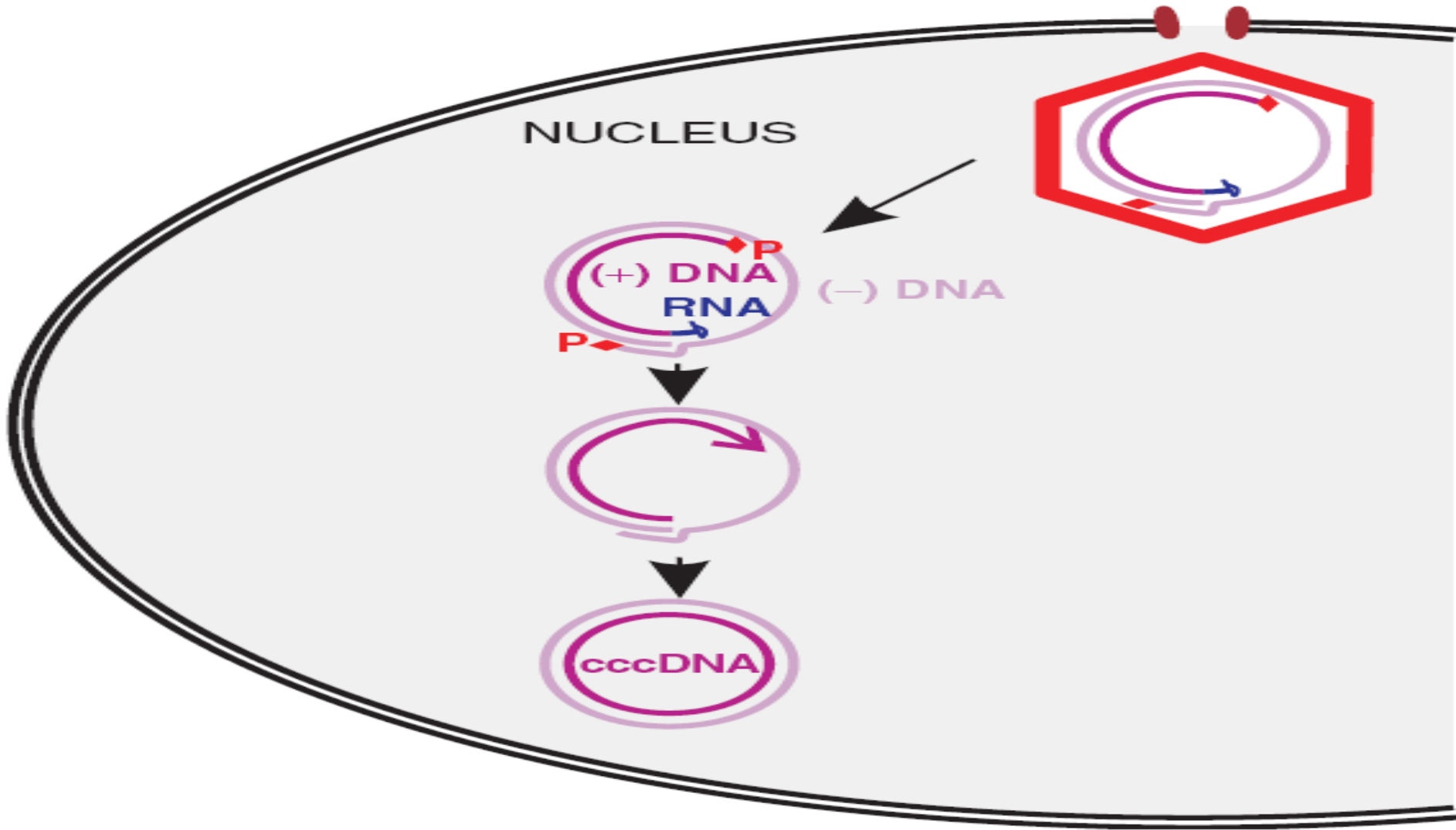
Το γονίδιο X το οποίο κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη trans-ενεργοποιητή της μεταγραφής .



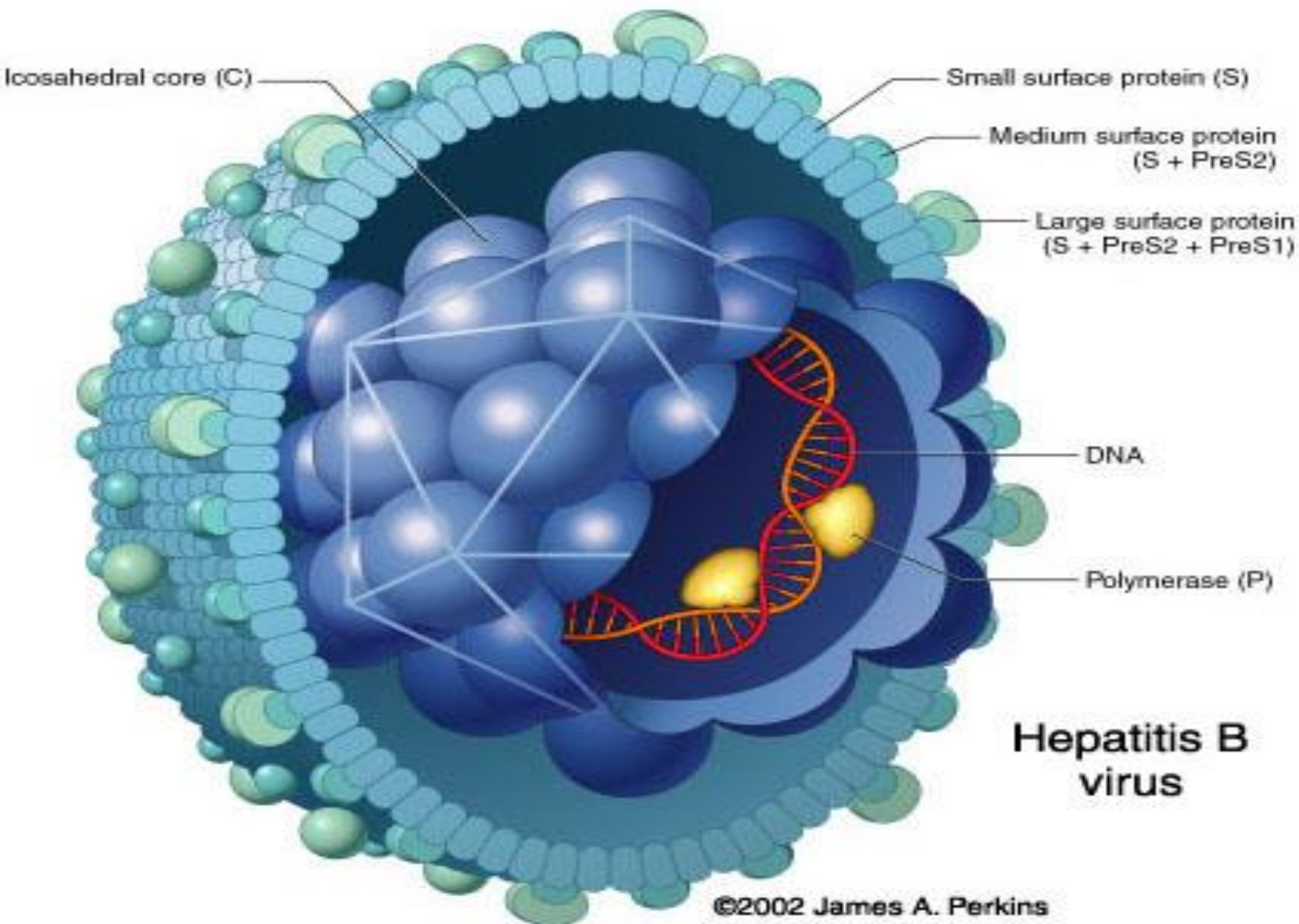
# Class VII: Double-stranded DNA with RNA Intermediate

- This group of viruses also relies on reverse transcription.
- Unlike the retroviruses (class VI), this occurs inside the virus particle during maturation.
- On infection of a new cell, the first event to occur is repair of the gapped genome, followed by transcription:





***Απελευθέρωση του γενώματος του HBV από το καψίδιο και μετατροπή του σε cccDNA.***



**Hepatitis B virus**

**Το cccDNA είναι το εκμαγείο για τη μεταγραφή.**

**Παρόλο που ο HBV έχει τέσσερις υποκινητές (pre-S1, pre-S2, X και pre-C), μόνο ο pre-S2 έχει TATA box. Δυο τουλάχιστον υποκινητές είναι ιστοειδικοί, και οι μεταγραφικοί παράγοντες που εμπλέκονται στην αναγνώρισή τους είναι πρωτεΐνες που εντοπίζονται στο ήπαρ. Αυτό εξηγεί εν μέρει γιατί ο HBV είναι ειδικός για τα ηπατικά κύτταρα. Τα επίπεδα έκφρασης των υποκινητών ελέγχονται από την σύνδεση κυτταρικών μεταγραφικών παραγόντων στις δυο αλληλουχίες ενισχυτή που είναι παρούσες στο γένωμα του HBV.**

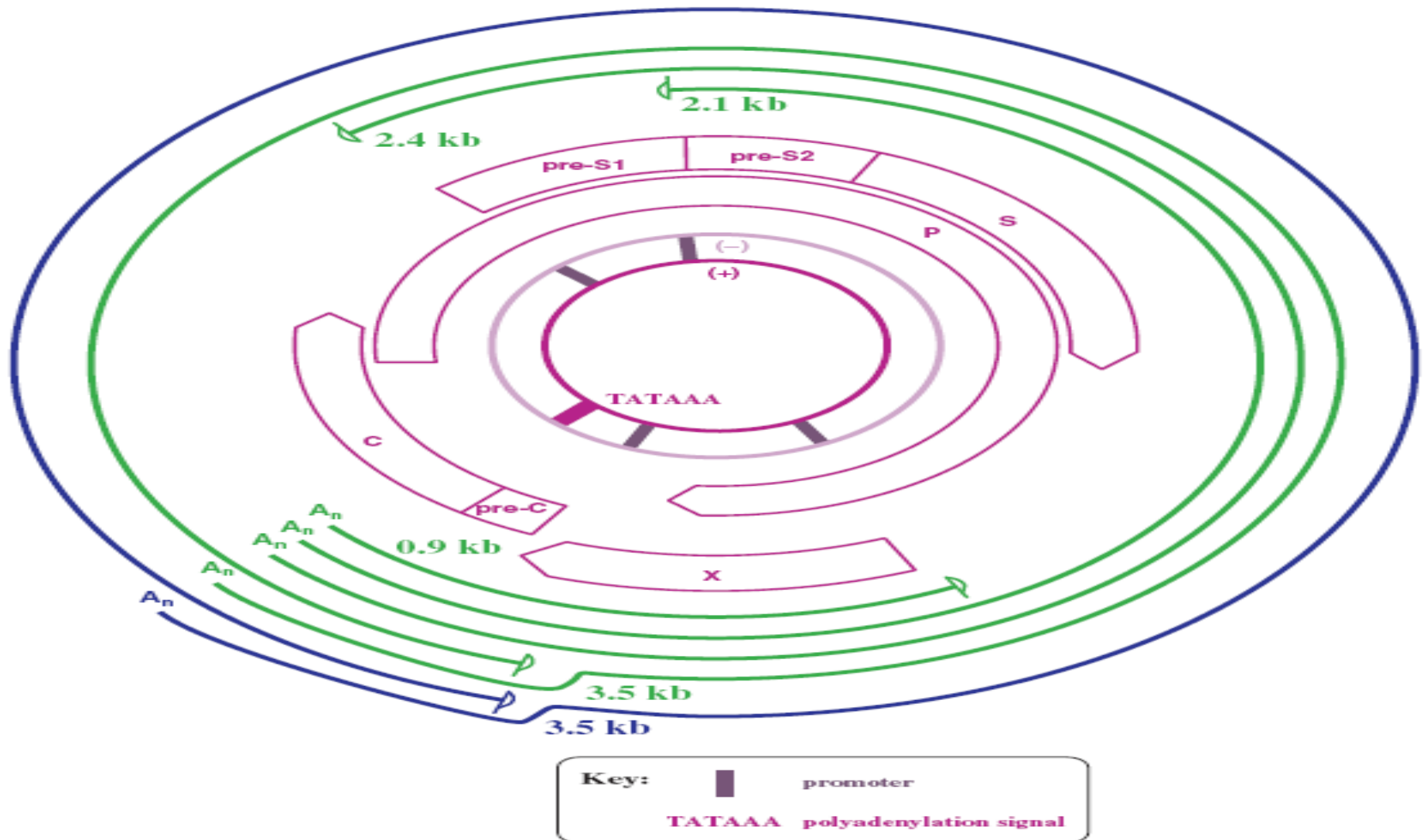
**Πιστεύεται ότι και η πρωτεΐνη X είναι μεταγραφικός παράγοντας, παρόλο που δεν φαίνεται να συνδέεται στο DNA.**

**Η μεταγραφή πραγματοποιείται από την RNA πολυμεράση II των κυττάρων και οδηγεί στην σύνθεση τεσσάρων διαφορετικών σε μέγεθος RNAs. Όλα τα μετάγραφα φέρουν καλύπτρα στο 5' άκρο και είναι πολυαδενυλιωμένα στο 3' άκρο. Τα mRNA με μέγεθος 3,5 Kb είναι πιο μακρύ από το γονιδίωμα.**

**Αυτό συμβαίνει γιατί κατά τη διάρκεια της σύνθεσης τους ένα μέρος του γενώματος μεταγράφεται δύο φορές, και έτσι έχουν άμεσες τερματικές επαναλήψεις.**

**Προκειμένου να συντεθούν τα 3,5 Kb mRNAs πρέπει η RNA πολυμεράση να αγνοήσει το σήμα πολυαδενυλίωσης κατά το πρώτο πέρασμα. Μελέτες με τον ιό HBV της πάπιας έδειξαν ότι αυτό ελέγχεται από μια ακολουθία DNA, αποκαλούμενη PET (positive effector of transcription), η οποία επιτρέπει στην RNA πολυμεράση να συνεχίσει κατά μήκος του σήματος πολυαδενυλίωσης στο πρώτο πέρασμα, αλλά όχι στο δεύτερο.**

Κατά το πρώτο πέρασμα η PET αλληλουχία καταστέλλει την αλληλουχία που αποκαλείται NET (negative effector of transcription), η οποία είναι απαραίτητη για το τερματισμό της μεταγραφής.



Μεταγραφή του ιού HBV. Παρουσιάζονται τα 4 διαφορετικά μεγέθη των RNAs.

Οι πρωτεΐνες C και P κωδικοποιούνται από τα RNAs που έχουν μέγεθος περίπου 3,5 Kb. Επειδή το ORF της C είναι ανοδικά από το ORF της P τα περισσότερα ριβοσώματα τα οποία συνδέονται σε αυτά τα mRNA αρχίζουν την μετάφραση από το εναρκτήριο κωδικόνιο της C. Υπάρχουν τουλάχιστον τρία επιπλέον κωδικόνια έναρξης πριν από το κωδικόνιο έναρξης της P. Για να αρχίσει η μετάφραση της P φαίνεται ότι το ριβόσωμα πρέπει να ξεπεράσει τα ανοδικά κωδικόνια έναρξης με ένα μηχανισμό γνωστό ως «leaky scanning». Με τον τρόπο αυτό ο HBV παράγει περισσότερες πρωτεΐνες καψιδίου από ότι πολυμεράσες.

Το αντιγόνο HBeAg μεταφράζεται επίσης από τα 3,5 Kb mRNAs και μετά την ολοκλήρωση της μετάφρασης εκκρίνεται από το κύτταρο.

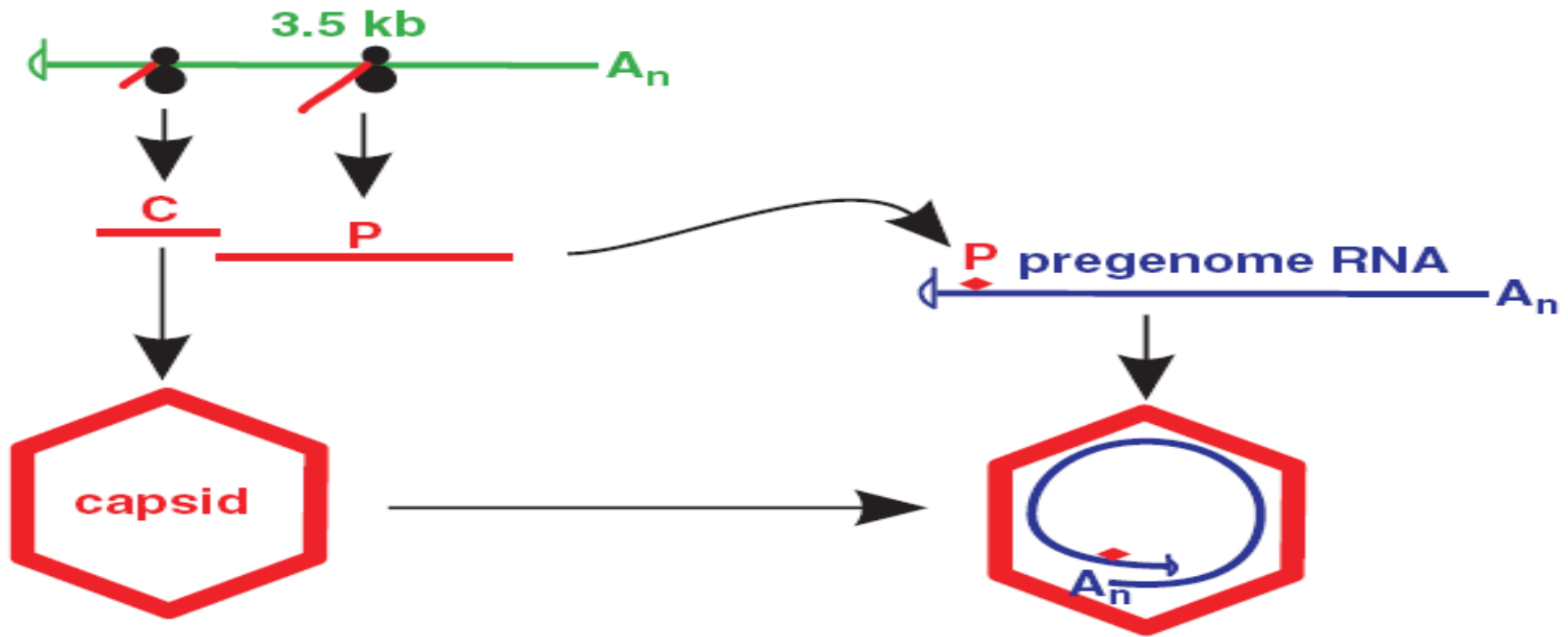
Η M πρωτεΐνη μεταφράζεται από τα mRNAs με μέγεθος 2,4kb ενώ η S από τα mRNAs με μέγεθος 2,1kb. Κάποιες από τις πρωτεΐνες του φακέλου γλυκοζυλιώνονται και η L μυριστυλιώνεται στο αμινοτελικό της άκρο .

Αποδείχτηκε ότι αυτή η τροποποίηση δεν είναι απαραίτητη για την συναρμολόγηση του ιοσώματος αλλά τα ιοσώματα δεν είναι μολυσματικά απουσία της.

Η πρωτεΐνη C σχηματίζει διμερή τα οποία συναρμολογούνται και σχηματίζουν το νουκλεοκαψίδιο.

Ένα μόριο πρωτεΐνης P, μαζί με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες, συνδέονται με ένα μόριο RNA 3,5Kb, το οποίο θα δράσει σαν προγενωμικό RNA .





Η πρωτεΐνη P συνδέεται σε μια θέση μέσα σε μια αλληλουχία γνωστή σαν  $\epsilon$ , η οποία έχει υψηλό βαθμό δευτεροταγούς δομής. Η αλληλουχία  $\epsilon$  είναι μέσα στις τερματικές επαναλήψεις οπότε είναι παρούσα και στα δυο άκρα του προγενωμικού RNA. Πιστεύεται ότι η P συνδέεται μόνο στο 5' άκρο. Η αλληλουχία  $\epsilon$  μαζί με το πρόσδεμα της δρουν ως σινιάλο πακεταρίσματος για την ενσωμάτωση του προγενωμικού RNA στο καψίδιο.



**Το προγενωμικό RNA έχει δυο άμεσες επαναλήψεις οπότε υπάρχει ένα αντίγραφο του DR1 και της ε σε κάθε άκρο του RNA.**

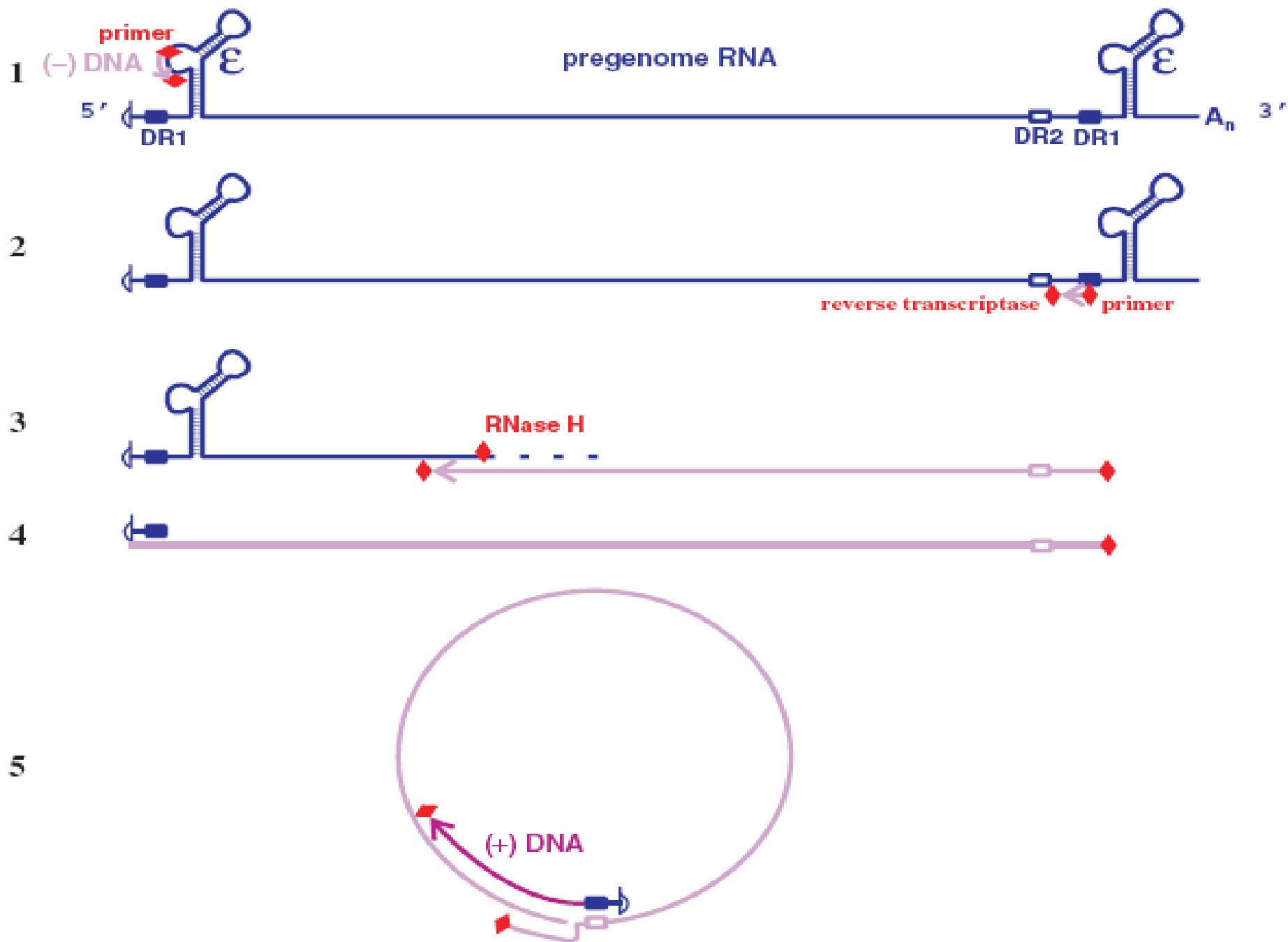
**Η περιοχή της αντίστροφης μεταγραφάσης της πρωτεΐνης P πραγματοποιεί τη σύνθεση DNA και η περιοχή της τερματικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης P δρα ως εκκινήτης για την σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας του DNA. Ένας ομοιοπολικός δεσμός σχηματίζεται ανάμεσα στην ομάδα -OH ενός κατάλοιπου τυροσίνης (κοντά στο αμινοτελικό άκρο της P πρωτεΐνης) και του πρώτου νουκλεοτιδίου.**

**Το προγενωμικό DNA δρα ως εκμαγείο για την σύνθεση του DNA. Αρχικά συντίθεται ένα τετρανουκλεοτίδιο της αρνητικής αλυσίδας και μετά αυτό μεταφέρεται στη συμπληρωματική αλληλουχία του στο DR1 κοντά στο 3' άκρο του προγενώματος.**

**Η σύνθεση DNA συνεχίζεται μέχρι το 5' άκρο του προγενώματος .**

**Η δραστηριότητα RNase H της πρωτεΐνης P αποικοδομεί το RNA προγένωμα από το σύμπλοκο RNA-DNA. Όλο το RNA αποικοδομείται εκτός από ένα τμήμα 15-18 βάσεων .**

**Η -OH ομάδα στο 3' άκρο του RNA που απομένει δρα σαν υποκινητής για την σύνθεση της θετικής αλυσίδας του DNA.**



# **Μοντέλο σύνθεσης του DNA του ιού HBV από την αντίστροφη μεταγραφάση.**

## **1ο ΣΧΗΜΑ**

- (1) Έναρξη της σύνθεσης της αρνητικής αλυσίδας του DNA κοντά στο 5' άκρο του προγενωμικού RNA.**
- (2) Μεταφορά του DNA στην ίδια αλληλουχία στο 3' άκρο του προγενωμικού RNA.**
- (3) Συνέχιση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου του DNA και αποικοδόμηση του προγενωμικού RNA από την RNαση H.**
- (4) Ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου του DNA. Όλο το προγενωμικό RNA έχει αποικοδομηθεί, εκτός από μια μικρή αλληλουχία στο 5' άκρο.**
- (5) Σύνδεση της θετικής αλυσίδας του DNA στο κυκλοποιημένο πλέον εκμαγείο της αρνητικής αλυσίδας του DNA.**

## 2ο ΣΧΗΜΑ

Το DNA περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ( direct repeats) DR1 και DR2 στον θετικό και αρνητικό κλώνο αντίστοιχα ( σχήμα 1).

Με την είσοδο στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή ο αρνητικός κλώνος σχηματίζει ένα πλήρη κύκλο και ο οποίος μεταγράφεται από την RNA πολυμεράση II . Η πολυμεράση ξεκινά περίπου 6 βάσεις μετά την περιοχή DR2 και προχωρά κατά την φορά των δεικτών του ρολογιού και σταματά στην περιοχή polyA ( με ανοικτό μπλε στο σχήμα 2).

Το RNA αποκτά επίσης μια polyA ουρά. Κατά συνέπεια το μετάγραφο RNA είναι μεγαλύτερο από το ιικό DNA ( ακριβώς το αντίθετο από ότι στους ρετροϊούς). Το RNA εξέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου “πακετάρεται” με τις ιικές πρωτεΐνες.

Τότε το RNA αντιστρόφως μεταγράφεται σε DNA με την βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης η οποία χρησιμοποιεί ως εκκινήτη την ίδια την αντίστροφη μεταγραφάση μέσω μιας τυροσίνης. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι συνδεδεμένη με το 5´ άκρο του DNA ( σχήμα 3).

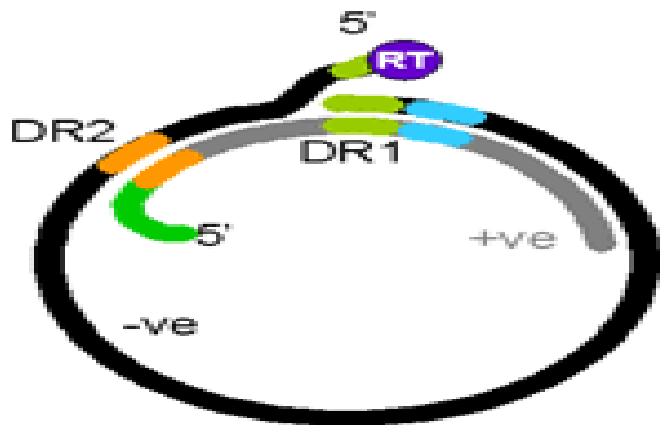
Η αντίστροφη μεταγραφάση λειτουργεί προς το 5´άκρο του RNA διαμέσου του DR1 και μόλις φθάσει στο άκρο του RNA πηδά μαζί με το νεοσυντεθέν DNA προς το 3´άκρο από όπου το DNA επεκτείνεται και η RNase H κόβει τον RNA κλώνο. Η σύνθεση σταματά όταν φθάσει στο 5´άκρο του RNA. Ο αρνητικός κλώνος φέρει ακραίες επαναλήψεις ( σχήμα 4).

**Το RNA δεν καταστρέφεται τελείως και περίπου 15 νουκλεοτίδια χρησιμεύουν ως εκκινήτης για τον 2ο γύρο της σύνθεσης του θετικού κλώνου του DNA ( σχήμα 5).**

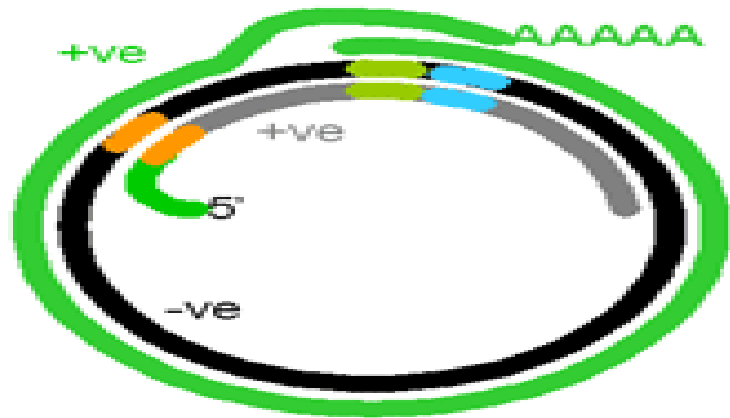
**Η RNA μήτρα πηδά προς το 5' άκρο του αρνητικού κλώνου DNA ( σχήμα 6).**

**Η αντίστροφη μεταγραφάση λειτουργεί προς το 5' άκρο του αρνητικού κλώνου του DNA προκαλώντας την κυκλοποίηση του DNA .Η αντίστροφη μεταγραφάση συνεχίζει να μεταγράφει αντιστρόφως το κυκλικό DNA για ποικίλο αριθμό βάσεων για να σχηματίσει τελικά το DNA το οποίο βρίσκεται στα ώριμα ιικά σωματίδια ( σχήμα 7).**

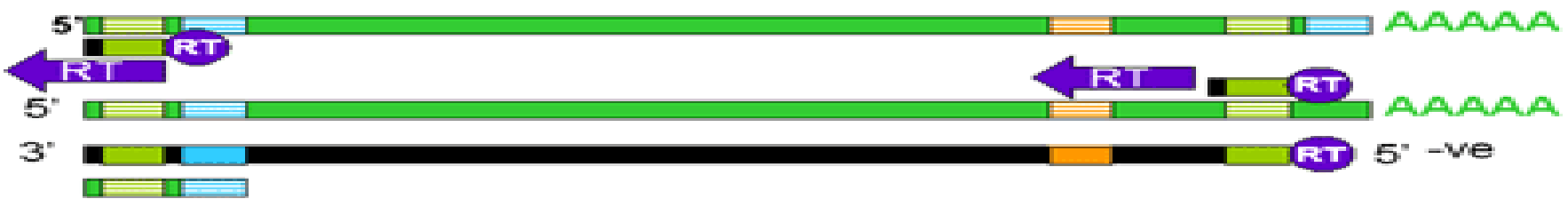
1



2



3



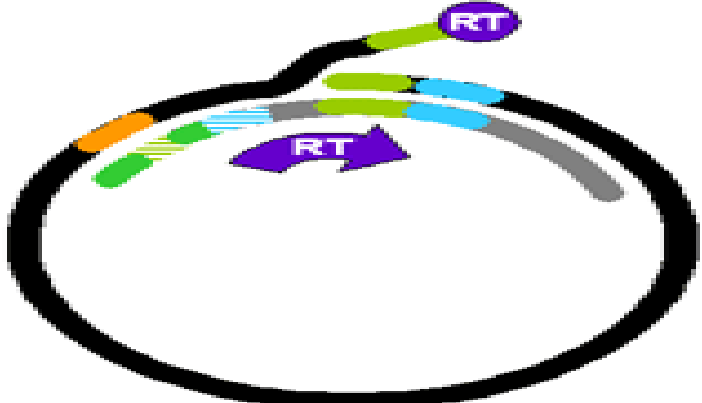
4



5



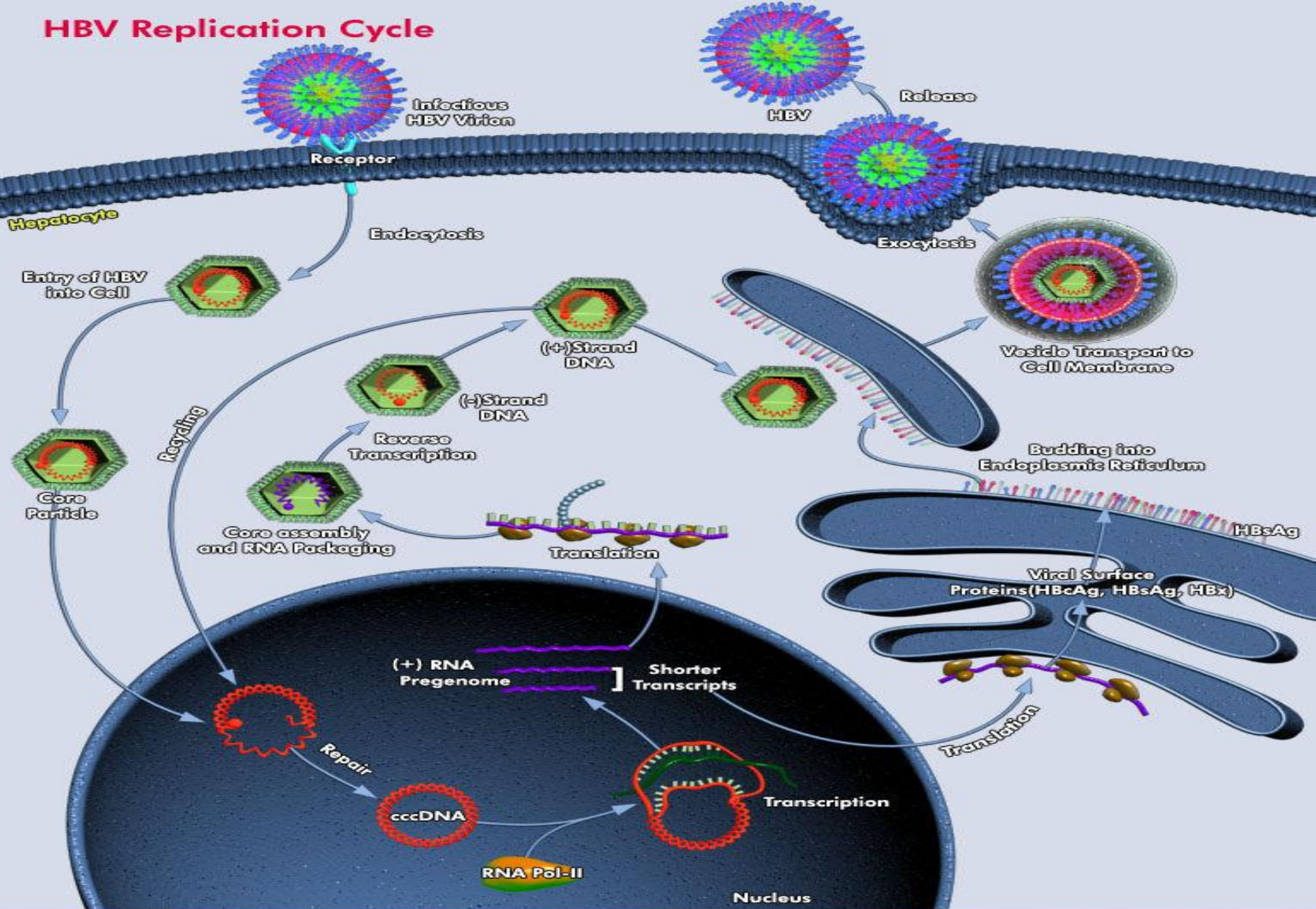
6



7



# HBV Replication Cycle



**Ο ιός HBV (Hepatitis-B Virus) κατά κύριο λόγο προσβάλλει τα ηπατοκύτταρα αλλά ο ιός έχει επίσης εντοπισθεί και σε κύτταρα του παγκρέατος, των νεφρών και σε μονοκύτταρα.**

**Η πρωτεΐνη P αποτελεί ένα πολυενζυμικό σύμπλοκο το οποίο εμπλέκεται στη σύνθεση του ιικού DNA και στην εισαγωγή του ιικού RNA στο νουκλεοκαψίδιο.**

**Η πρωτεΐνη X (HBx), εμπλέκεται σε τροποποιήσεις της μεταγωγής σήματος του κυττάρου ξενιστή και εμμέσως επηρεάζει το επίπεδο έκφρασης των ιικών και κυτταρικών γονιδίων.**

**Ορισμένα νουκλεοκαψίδια τα οποία φέρουν το ώριμο πλέον ιικό γονιδίωμα επιστρέφουν στον πυρήνα για να μετατραπούν και πάλι σε cccDNA ώστε να διατηρήσουν μια σταθερή μονάδα ιικών στόχων προς μεταγραφή.**

**Τέλος το νεοσχηματιζόμενο ιικό σωματίδιο HBV μεταφέρεται στο σύστημα Golgi για περαιτέρω τροποποιήσεις των πρωτεϊνών επιφανείας και τα ιικά σωματίδια εκκρίνονται εκτός του κυττάρου.**

## ΜΕΤΑ – ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

DNA ιοί , οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή , τα mRNAs τους θα πρέπει να υποβληθούν σε μάτισμα από κυτταρικούς μηχανισμούς πριν μεταφρασθούν. Αυτός ο τύπος τροποποίησης εφαρμόζεται μόνο σε ιούς οι οποίοι αντιγράφονται στον πυρήνα (και όχι, για παράδειγμα, στους ροξ ιούς ) , αφού απαιτεί την επεξεργασία των mRNAs στον πυρήνα του κυττάρου ξενιστή πριν μεταφερθούν στο κυτταρόπλασμα για να μεταφρασθούν. Μερικά από τα καλύτερα παραδείγματα ματίσματος αποτελούν οι parvo ιοί , η μεταγραφή των οποίων καταλήγει σε πολλαπλά μετάγραφα που φέρουν polyA ουρά στο κυτταρόπλασμα των μολυσμένων κυττάρων, καθιστώντας τους ικανούς να παράγουν πολλαπλές πρωτεΐνες από το μικρό τους γένωμα των 5 kb .

Ομοίως και οι polyoma ιοί , όπως ο SV40 .

Αντίθετα, η μεγάλη κωδικοποιούσα ικανότητα των herpesviruses κάνει δυνατή για αυτούς τους ιούς την παραγωγή κυρίως μη ματισμένων μονοκιστρονικών μεταγράφων (unspliced monocistronic mRNAs) , καθένα από τα οποία εκφράζεται από τον δικό του επαγωγέα , καθιστώντας περαιτέρω το εκτενές μάτισμα για την παραγωγή όλων των απαιτούμενων πρωτεϊνών.

Η αποτελεσματικότητα με την οποία διαφορετικά mRNAs μεταφράζονται ποικίλει σημαντικά. Αυτό προσδιορίζεται από μια σειρά παραγόντων όπως η σταθερότητα της δευτεροταγούς δομής του RNA και κυρίως από την αλληλουχία η οποία περιβάλλει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης AUG και η οποία αναγνωρίζεται από τα ριβοσώματα.

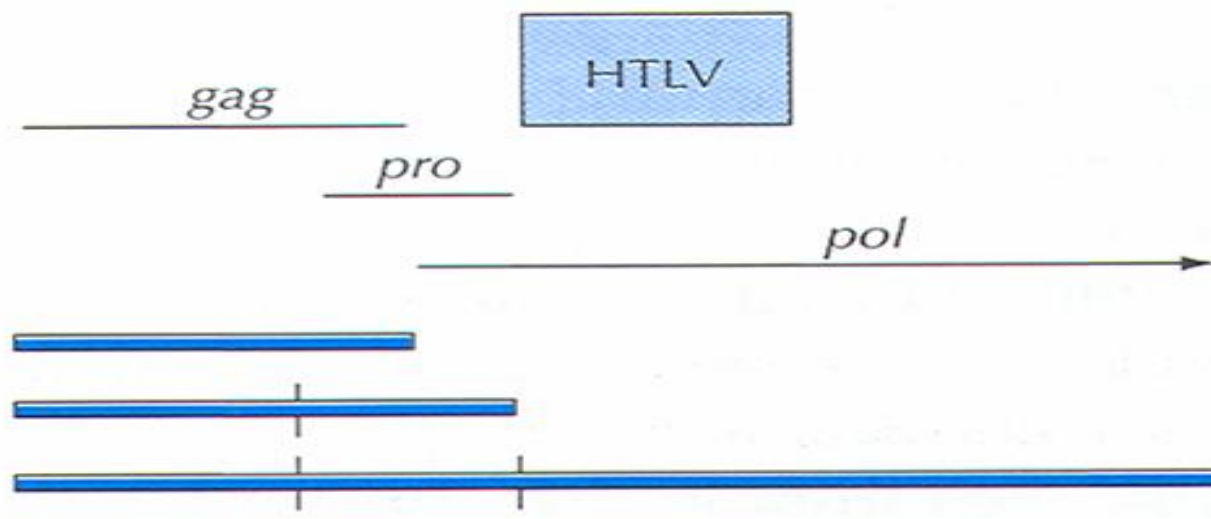
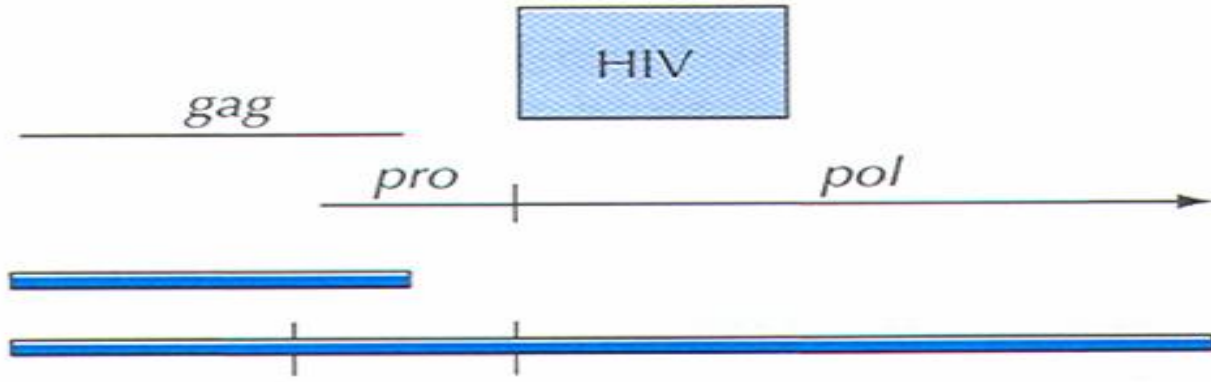
Η προτιμότερη αλληλουχία για την έναρξη είναι η: GCC(A/G)CCAUGGG, παρόλο που μπορεί να υπάρξει σημαντική διαφοροποίηση από αυτήν την αλληλουχία. Πολλοί ιοί χρησιμοποιούν εναλλακτικές αλληλουχίες για να ρυθμίσουν τις ποσότητες της πρωτεΐνης που συντίθενται από ένα mRNA.

Υπάρχει, ωστόσο, ένας επιπλέον μηχανισμός, γνωστός ως «ribosomal frameshifting», που χρησιμοποιείται από μερικές ομάδες ιών. Τα καλύτερα μελετημένα παραδείγματα προέρχονται από τους ρετροϊούς.

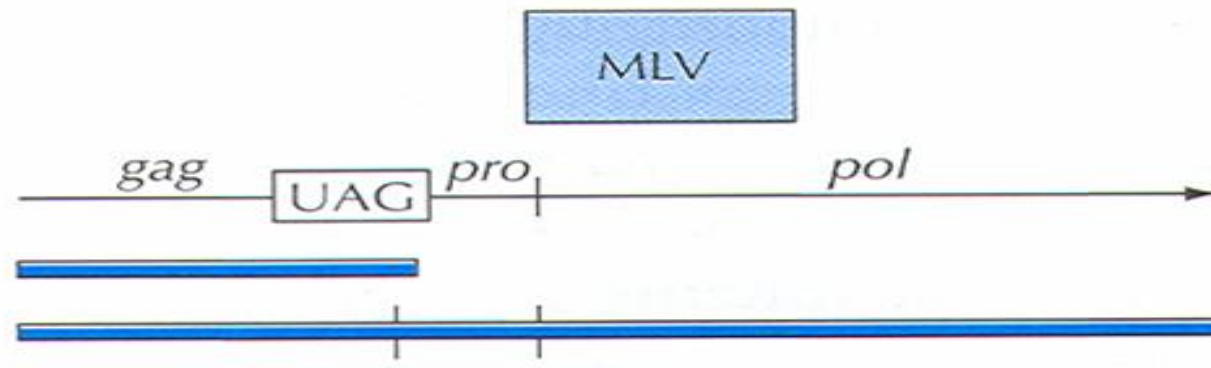
Ένα μακρύ μη ματισμένο μετάγραφο κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες gag, pro και pol. Το πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι ρετροϊοί είναι πως να εκφράσουν τρεις διαφορετικές πρωτεΐνες από ένα μακρύ μετάγραφο. Η θέση των τριών γονιδίων ποικίλει στους διάφορους ρετροϊούς.

Σε μερικές περιπτώσεις (π.χ. HTLV), καταλαμβάνουν τρία διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης, ενώ σε άλλους (π.χ. HIV), το γονίδιο της πρωτεάσης (protease-pro) σχηματίζει μια επέκταση στο 5' άκρο του γονιδίου pol.

Στην περίπτωση αυτή, η πρωτεάση και η πολυμεράση (δηλ. η αντίστροφη μεταγραφάση) εκφράζονται ως μια πολυπρωτεΐνη η οποία αυτοδιασπάται στις ώριμες πρωτεΐνες με μια διαδικασία που είναι παρόμοια με εκείνη της πολυπρωτεΐνης των ricorna ιών.



Ribosomal frameshifting



Termination suppression

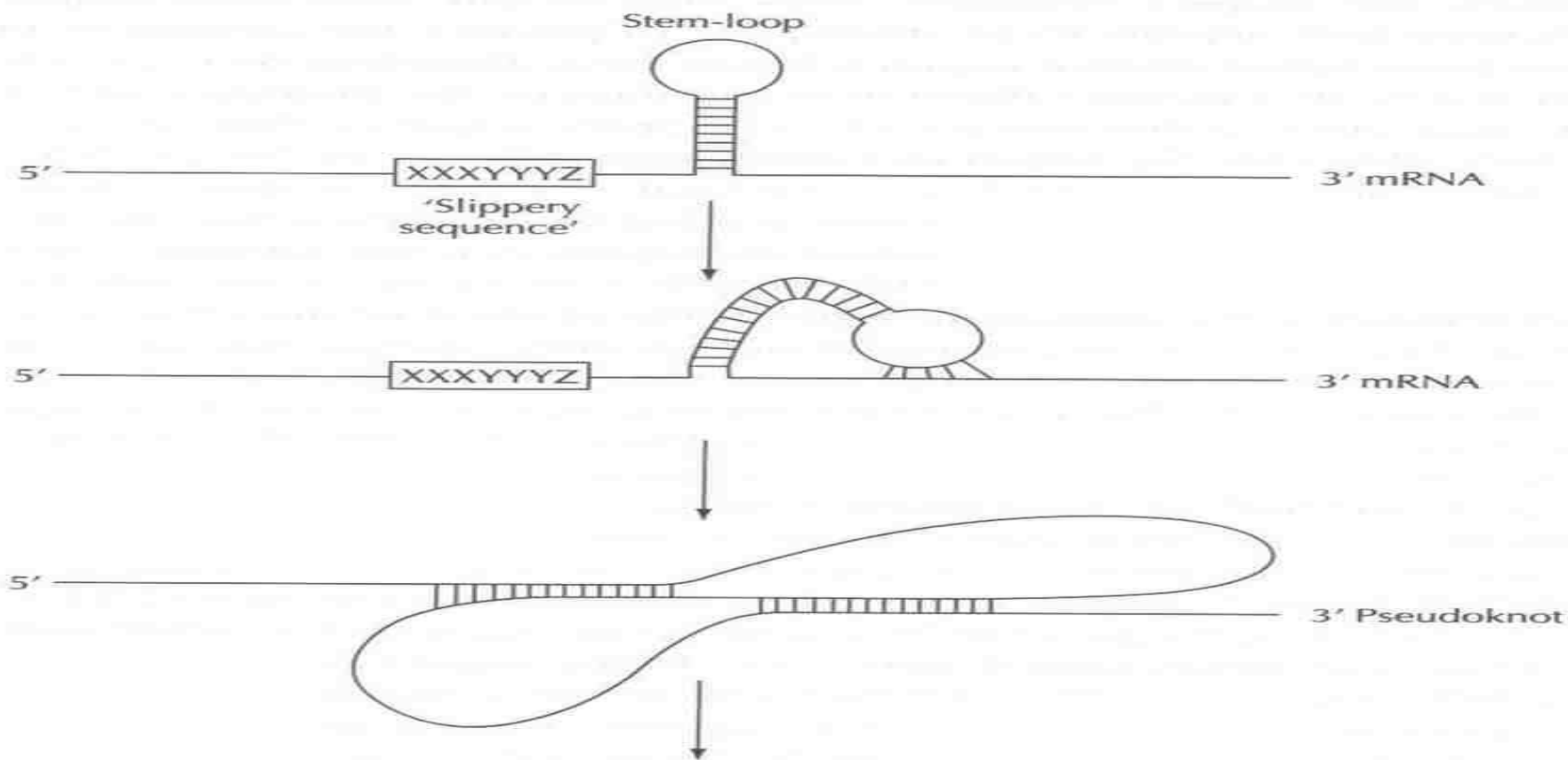
Στο σύνορο μεταξύ του κάθε γονιδίου υπάρχει μια συγκεκριμένη αλληλουχία η οποία συνήθως αποτελείται από επαναλαμβανόμενα νουκλεοτίδια , όπως UUUAAAC. Αυτή η αλληλουχία σπάνια βρίσκεται στις αλληλουχίες που κωδικοποιούν για κάποια πρωτεΐνη και συνεπώς εμφανίζεται να χρησιμοποιείται ειδικώς για αυτό τον τύπο ρύθμισης. Τα περισσότερα ριβοσώματα που συναντούν αυτήν την αλληλουχία θα την μεταφράσουν χωρίς δυσκολία και θα συνεχίσουν μέχρι να συναντήσουν ένα κωδικόνιο λήξης της μετάφρασης. Ωστόσο, ένα ποσοστό ριβοσωμάτων που επιχειρεί να μεταφράσει αυτήν την αλληλουχία θα μετατοπίσει κατά ένα νουκλεοτίδιο το πλαίσιο ανάγνωσης πριν να συνεχίσει να μεταφράζει το μήνυμα, αλλά τώρα σε ένα διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης ( π.χ. -1).

Εξαιτίας αυτού, η UUUAAAC αλληλουχία έχει ορισθεί ως ‘ αλληλουχία ολίσθησης ’, και το αποτέλεσμα ( -1 frameshifting) είναι η μετάφραση μιας πολυπρωτεΐνης που περιέχει εναλλακτική πληροφορία λόγω του διαφορετικού πλαισίου ανάγνωσης.



Αυτός ο μηχανισμός επίσης επιτρέπει στον ιό να ελέγχει τα ποσοστά των πρωτεϊνών που παράγονται. Διότι μόνο ένα ποσοστό των ριβοσωμάτων υφίσταται frameshifting και για κάθε αλληλουχία ολίσθησης, υπάρχει μια βαθμίδωση της μετάφρασης από τα πλαίσια ανάγνωσης από το 5' άκρο του mRNA προς το 3' άκρο.

Υπάρχουν επιπρόσθετες αλληλουχίες που ρυθμίζουν αυτό το σύστημα και αυξάνουν την συχνότητα των γεγονότων frameshifting. Σε μικρή απόσταση μετά την αλληλουχία ολίσθησης, υπάρχει μια ανεστραμμένη αλληλουχία επανάληψης η οποία επιτρέπει τον σχηματισμό μιας δομής στελέχους – θηλιάς του mRNA.



Επιπλέον μια πιθανή επιπρόσθετη αλληλουχία συμπληρωματική των νουκλεοτιδίων της θηλιάς η οποία επιτρέπει το « ζευγάρωμα» μεταξύ αυτών των δύο περιοχών του RNA θα έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της δομής η οποία είναι γνωστή ως RNA pseudoknot. Αυτή η δευτεροταγής δομή στο mRNA οδηγεί τα ριβοσώματα τα οποία μεταφράζουν το μήνυμα να σταματήσουν στην θέση της αλληλουχίας ολίσθησης και αυτή η κατάσταση αργοπορίας ή η παύση του ριβοσώματος κατά την διάρκεια της μετάφρασης αυξάνει την συχνότητα με την οποία το frameshifting συμβαίνει και επομένως δίνει μια ώθηση στις κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες από τα μετέπειτα ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης.



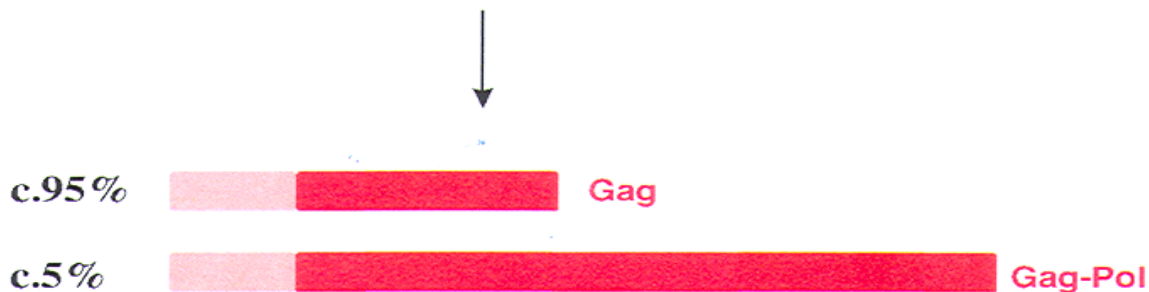
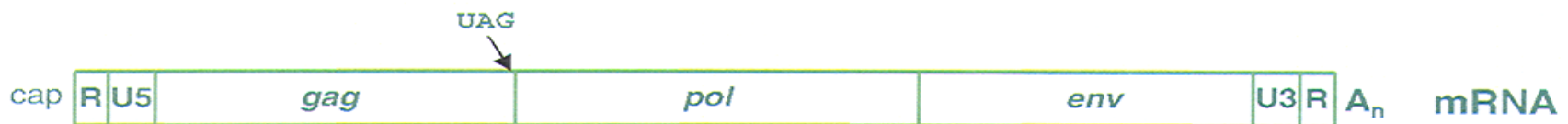
### Μετάφραση των γονιδίων Gag-Pol μέσω ριβοσωμικού frameshifting .

Περίπου το 95% των ριβοσωμάτων σταματάει την μετάφραση αμέσως μετά την μετάφραση του γονιδίου Gag ενώ μόνο το 5% συνεχίζει περαιτέρω την μετάφραση για την σύνθεση της Gag-Pol πολυπρωτεΐνης δηλ. μόνο το 5% των ριβοσωμάτων μεταπίπτει σε ένα διαφορετικό πλαίσιο ανάγνωσης πριν το κωδικόνιο τερματισμού στο γονίδιο Gag.



Η τελευταία μέθοδος του μεταγραφικού ελέγχου είναι η περάτωση της καταστολής. Αυτός είναι ένας παρόμοιος μηχανισμός με εκείνο του frameshifting και επιτρέπει στα πολλαπλά πολυπεπτίδια να εκφραστούν από ξεχωριστά πλαίσια ανάγνωσης από ένα μόνο mRNA. Σε μερικούς ρετροϊούς, όπως στον Murine leukaemia virus (MLV), το γονίδιο της πρωτεάσης χωρίζεται από το gag γονίδιο από το κωδικόνιο λήξης UAG και όχι από μια «αλληλουχία ολίσθησης» ή pseudoknot. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, η μετάφραση του MLV mRNA περατώνεται σε αυτήν την αλληλουχία, δίνοντας τις gag πρωτεΐνες. Ωστόσο, σε λίγα παραδείγματα, το κωδικόνιο λήξης UAG καταστέλεται και η μετάφραση συνεχίζεται, παράγοντας μια gag-pro-pol πολυπρωτεΐνη, η οποία ακολούθως αυτοδιασπάται και παράγει τις ώριμες πρωτεΐνες.

Το αποτέλεσμα αυτής της ρύθμισης είναι ανάλογο με εκείνο του ribosomal frameshifting, με το ποσοστό των gag και gag, pro, pol πρωτεϊνών να ελέγχεται από την συχνότητα με την οποία τα ριβοσώματα διασχίζουν ή περατώνουν στο κωδικόνιο λήξης UAG.



Οι πρωτεΐνες vif, vpr, vru και Env μεταφράζονται από μονά ματισμένα μετάγραφα. Οι πρωτεΐνες vru και Env μεταφράζονται στο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου το γονίδιο ENV μεταφράζεται σε μια πολυπρωτεΐνη την (Gp160) η οποία γλυκοσυλιώνεται και εν συνεχεία διασπάται από κυτταρικές πρωτεάσες σε : SU (Gp120) and TM (Gp41).

Η vru συσσωρεύεται στην μεμβράνη και συμβάλει στην εκβλάστηση του ιϊκού σωματιδίου από την μεμβράνη του ξενιστή.

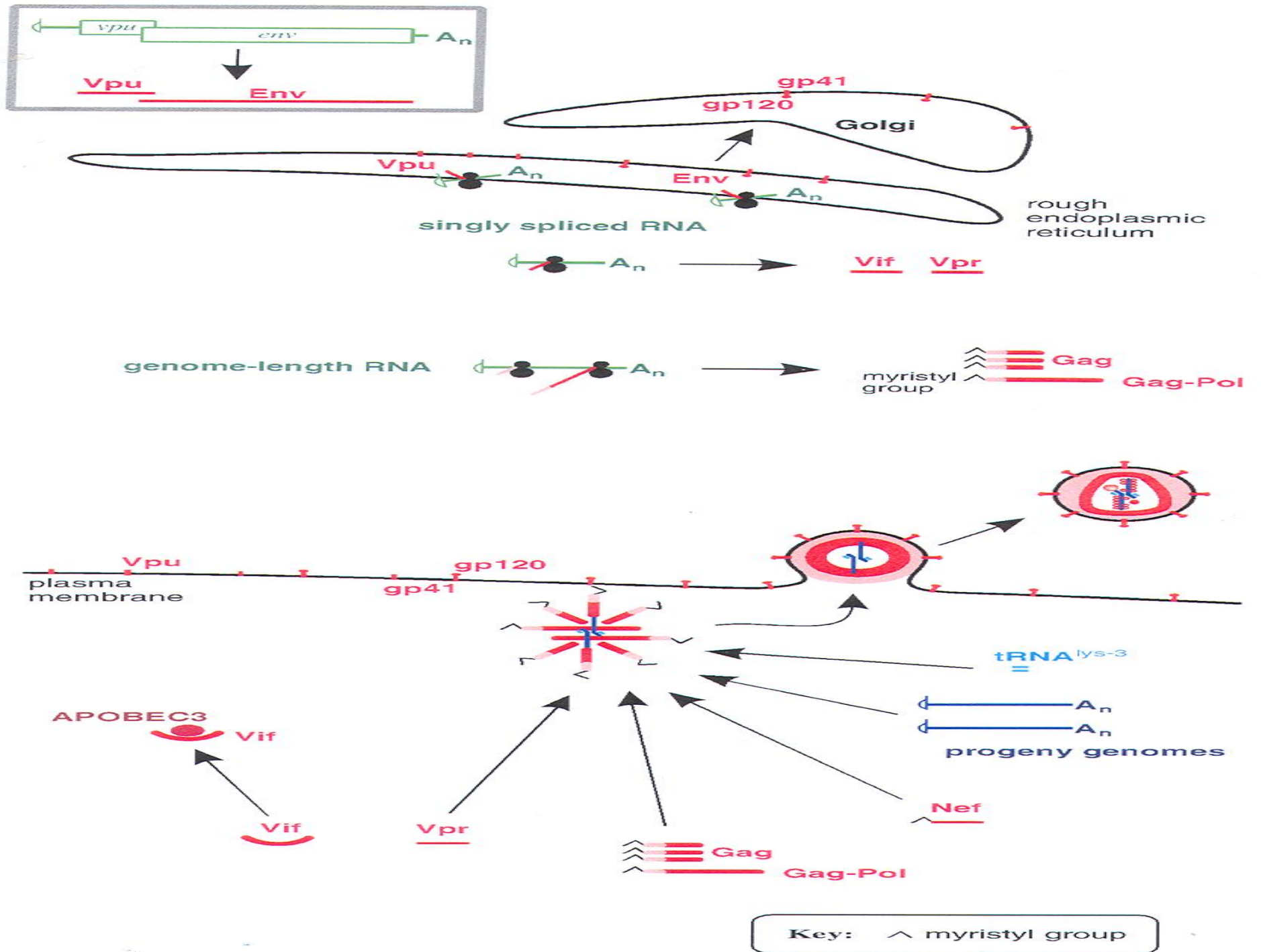
Τα διμερή Gag-Pol διασπώνται μέσω της ιϊκής πρωτεάσης, η οποία εν συνεχεία διασπάει την πολυπρωτεΐνη Gag στις πρωτεΐνες :MA (matrix), CA (capsid), NC (nucleocapsid) και p6, οι οποίες ευρίσκονται στο ώριμο ιϊκό σωματίδιο

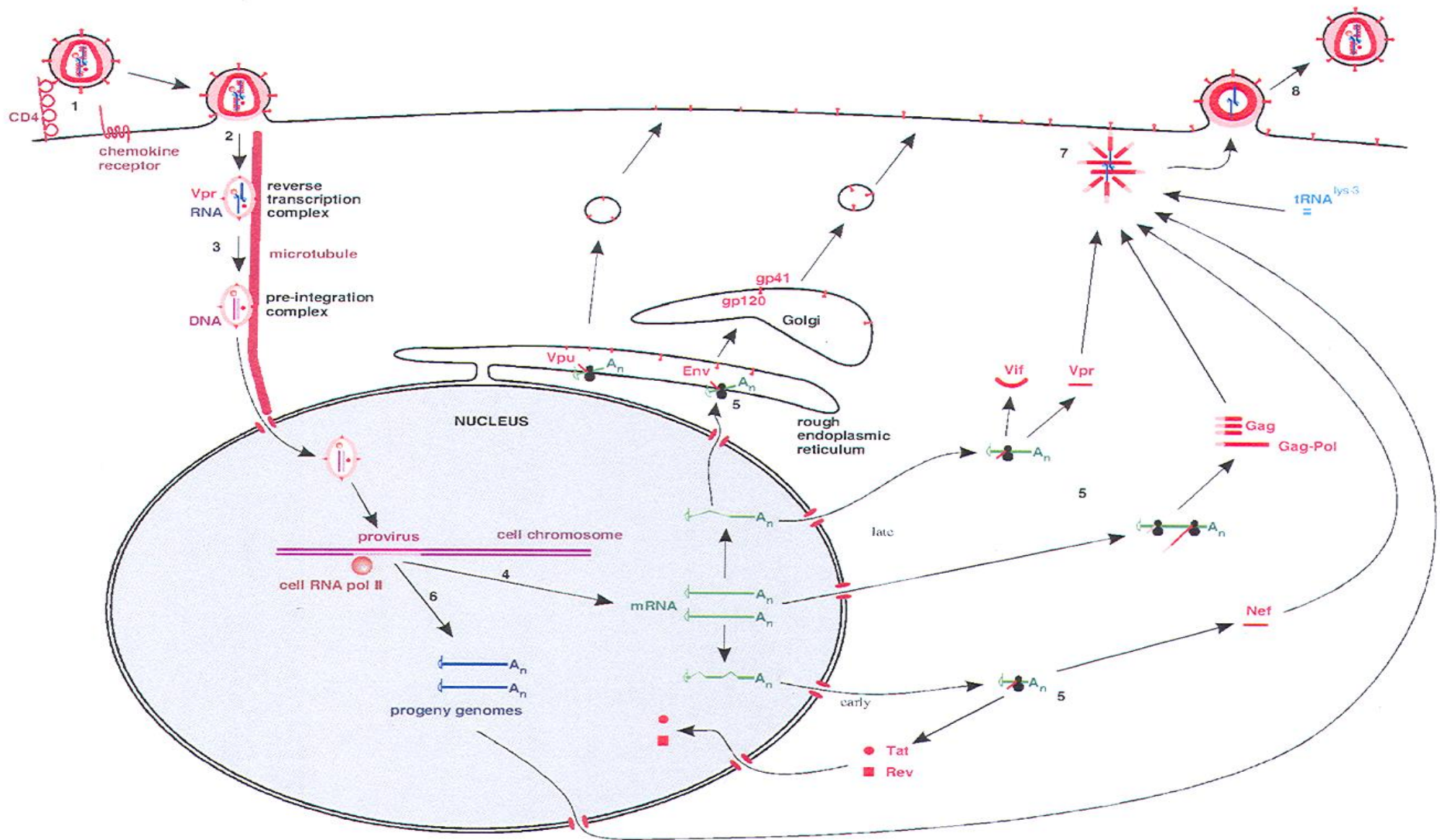
Η πολυπρωτεΐνη POL διασπάται σε : PR (protease), RT (reverse transcriptase), IN (integrase).

Τρεις πρωτεΐνες οι (Vif, Vpr and Nef), φέρονται μέσα στο ώριμο ιϊκό σωματίδιο ενώ οι πρωτεΐνες Tat, Rev και Vru δεν φέρονται από το ώριμο ιϊκό σωματίδιο. Οι πρωτεΐνες vif εκτός του ότι ενσωματώνονται στο ιϊκό σωματίδιο συνδέονται και αποδομούν τα κυτταρικά ένζυμα APOBEC 3F και 3G τα οποία τείνουν να εισχωρήσουν στα ιϊκά σωματίδια εισάγοντας μεταλλάξεις μέσω απαμίνωσης της κυτιδίνης και οι οποίες μεταλλάξεις μπορούν να αποβούν μοιραίες για τον ιό.

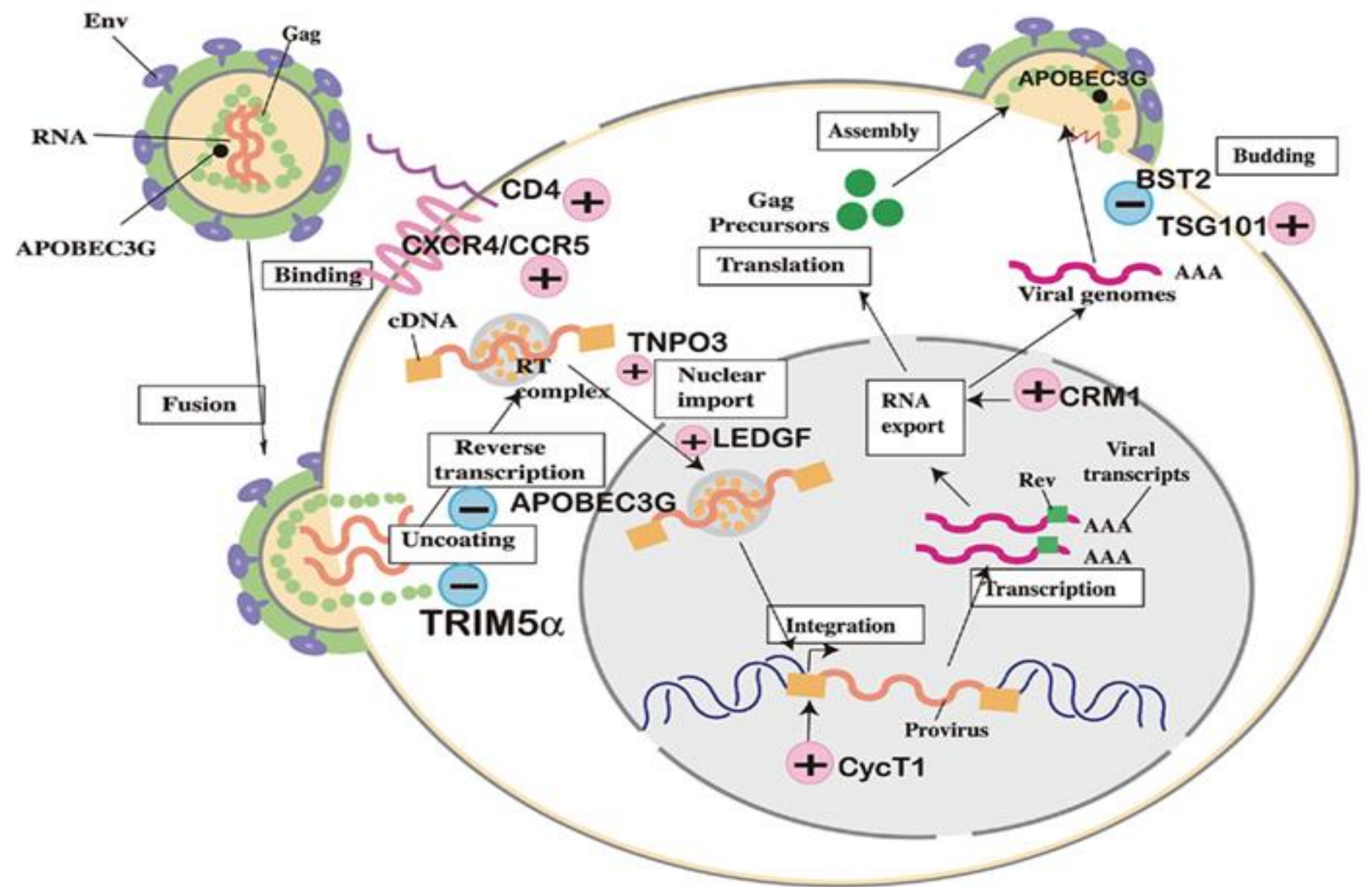
Οι πρωτεΐνες NC συνδέονται στο ιϊκό γένωμα μέσω της αλληλουχίας ψ, η οποία τοποθετείται στο 5' άκρο του ιϊκού γενώματος και αποτελεί το σήμα «πακεταρίσματος» του ιϊκού γενώματος.

Οι πρωτεΐνες p6 περιέχουν την αλληλουχία προλίνη-θρεονίνη-αλανίνη-προλίνη η οποία μπορεί να συνδεθεί με την πρωτεΐνη vpr καθώς και με άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή συμμετέχοντας με αυτό τον τρόπο στην εκβλάστηση του ιού από το κύτταρο.





1. Attachment
2. Entry
3. Reverse transcription
4. Transcription
5. Translation
6. Genome replication
7. Assembly
8. Exit



## CELLULAR FACTORS INVOLVED IN HIV REPLICATION CYCLE

(+) Positive factors required for viral replication.

(-) Negative factors that suppress viral replication.

**Στον HIV 1 ιός το σύμπλοκο πριν την ενσωμάτωση του ιού στο DNA του κυττάρου ξενιστή (pre-integration complex ,PIC) το οποίο περιέχει το ιικό cDNA και την ιική integrase (IN) μεταφέρονται στον πυρήνα.**

**Δύο κυτταρικοί παράγοντες επιδρούν θετικά για αυτή τη μεταφορά. Ο παράγοντας lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75), ένας παράγων ο οποίος εμπλέκεται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου.**

**Ο παράγων LEDGF επιδρά με την ιική HIV-1 IN και καθοδηγεί το σύμπλοκο ενσωμάτωσης σε μεταγραφικά ενεργές θέσεις του χρωμοσώματος.**

**Ο δεύτερος παράγων είναι ο Transportin 3 (TNPO3/Transportin-SR2). Ο παράγων αυτός TNPO3 πιστεύεται ότι επιδρά όπως και ο ανωτέρω παράγων.**

**Ο ενσωματωμένος πλέον HIV-1 ιός μεταγράφεται από τους επαγωγείς του στην long terminal repeat (LTR) περιοχή χρησιμοποιώντας τους μεταγραφικούς παράγοντες NF-κB and Sp1. Οι λειτουργικές πρωτείνες του HIV-1 Tat, Rev, και Nef, είναι τα προϊόντα των πρώιμων πρωτεϊνών από πολλαπλά ματισμένα mRNAs . Η πρωτεΐνη Tat συνδέεται στο νέο μεταγραφόμενο 5' άκρο των HIV-1 μεταγράφων και διευκολύνει την μεταγραφή του ιικού RNA.**

**Η πρωτεΐνη CycT1 είναι μέρος του συμπλόκου των μεταγραφικών παραγόντων CDK9/pTEFb. Η πρωτεΐνη CycT1 συνδέεται στην πρωτεΐνη Tat και ενεργοποιεί την μεταγραφή από το HIV-1 LTR .**

**CRM1, είναι ένας άλλος θετικός παράγων ο οποίος σε συνεργασία με την ιική πρωτεΐνη Rev, συμμετέχει στην τελική φάση εξόδου του μη ματισμένου πλήρους μεγέθους μετάγραφου από τον πυρήνα ώστε να ενσωματωθεί στο νεοσχηματιζόμενο ιικό νουκλεοκαψίδιο.**

Η πρωτεΐνη **BST2** ή όπως άλλως αναφέρεται επίσης ως **CD317** είναι μια πρωτεΐνη η οποία επάγεται από την ιντερφερόνη και παρεμβάλλεται με την εκβλάστηση του ιικού καψιδίου από τα μολυσμένα κύτταρα. Τότε ο ιός **HIV-1** εκκρίνει και κατεθύνει στη θέση αυτή την ιική πρωτεΐνη ώστε να εξουδετερώσει την λειτουργία της **BST2**.

Στον ιό **HIV 2** όπου δεν υπάρχει η πρωτεΐνη **vpr** τον αντίστοιχο ρόλο παίζει η πρωτεΐνη **Env** ενώ στον ιό **SIV** η πρωτεΐνη **Nef**.

Ενας άλλος αρνητικός παράγων είναι το σύμπλοκο των πρωτεϊνών **TRIM5α** το οποίο έχει πολλαπλές ενεργότητες μεταξύ των οποίων και ενεργότητα **E3 ubiquitin ligase**. Ως εκ τούτου πιθανολογείται ότι το σύμπλοκο **TRIM5α** επιδρά άμεσα επί του νουκλεοκαψιδίου αποδομώντας τις πρωτεΐνες **HIV-1 CA**.

## ΣΥΝΟΨΙΖΟΝΤΑΣ

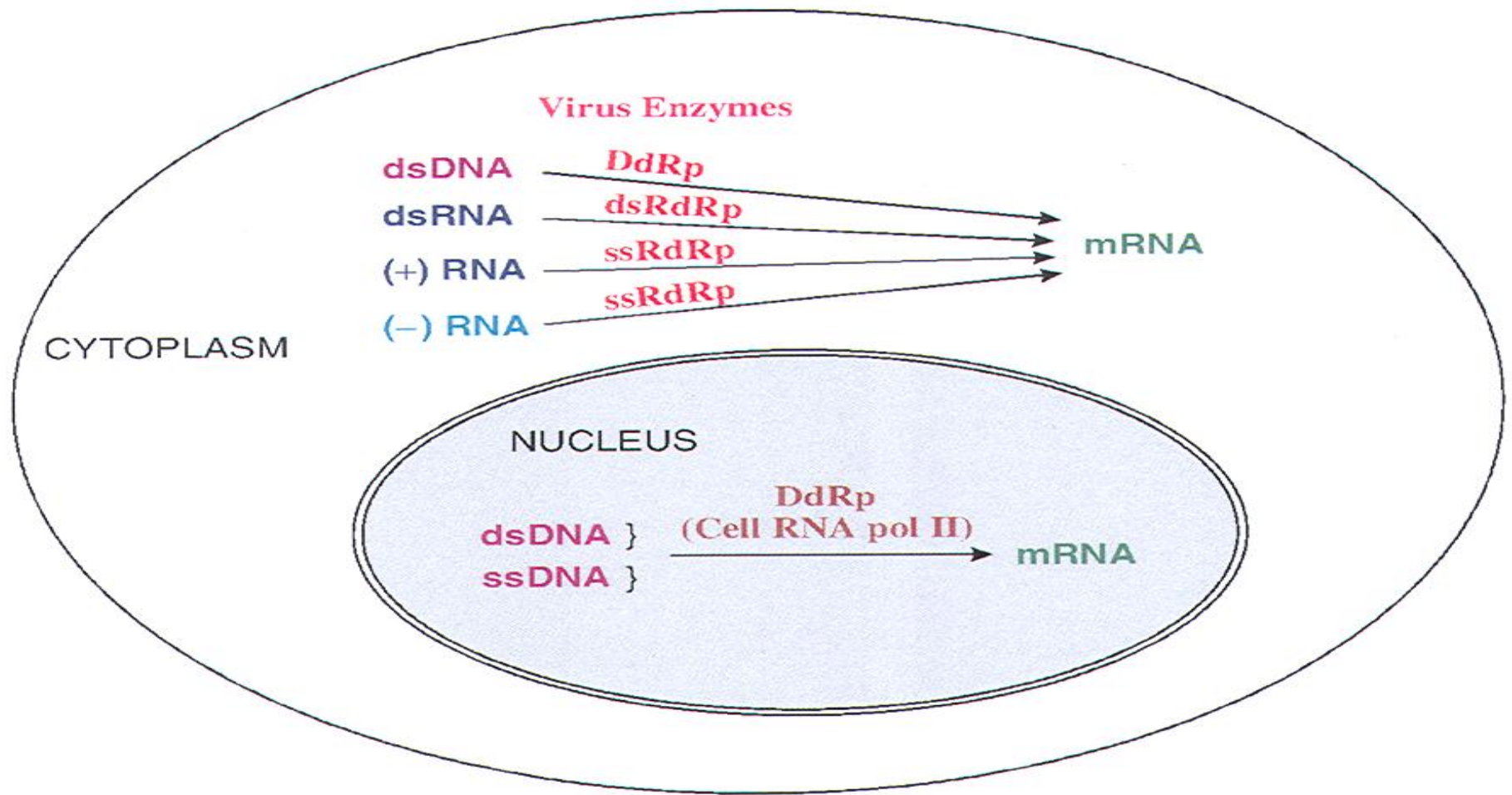
Τα άμεσα- πρώιμα γονίδια κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ‘ενεργοποιητές’, τα πρώιμα γονίδια κωδικοποιούν περαιτέρω ρυθμιστικές πρωτεΐνες και επάγουν την αντιγραφή του ιϊκού γενώματος και τέλος τα όψιμα γονίδια κωδικοποιούν τις δομικές πρωτεΐνες του ιού.

Οι ιοί χρησιμοποιούν την βιοχημική μηχανική των κυττάρων ξενιστών τους για να εκφράσουν την γενετική τους πληροφορία ως πρωτεΐνες και, συνεπώς, χρησιμοποιούν την κατάλληλη «βιοχημική γλώσσα» που αναγνωρίζεται από το κύτταρο.

Επομένως, οι ιοί των προκαρυωτικών κυττάρων παράγουν πολυκιστρονικά mRNAs ενώ οι ιοί των ευκαρυωτών παράγουν κυρίως μονοκιστρονικά και ενίοτε δικιστρονικά mRNAs.

Επιπρόσθετα, οι ιοί βασίζονται σε cis- και trans-acting μηχανισμούς για να χειρισθούν την βιολογία των κυττάρων ξενιστών τους και για να αυξήσουν και να συγχρονίσουν την έκφραση της γενετικής τους πληροφορίας.





**Ενζυμα τα οποία χρησιμοποιούνται από τους ιούς για την μεταγραφή του γενώματός τους σε mRNA**

**(+) RNA :** δηλ. η ίδια αλληλουχία με το ιϊκό mRNA

**(-) RNA :** δηλ. αλληλουχία συμπληρωματική του ιϊκού mRNA

**DdRp :** DNA –dependent RNA polymerase

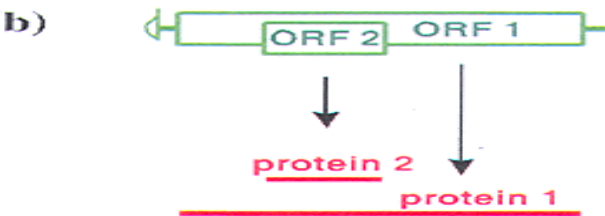
**DsRdRp :** double –stranded RNA-dependent RNA polymerase

**ssRdRp :** single-stranded RNA–dependent RNA polymerase

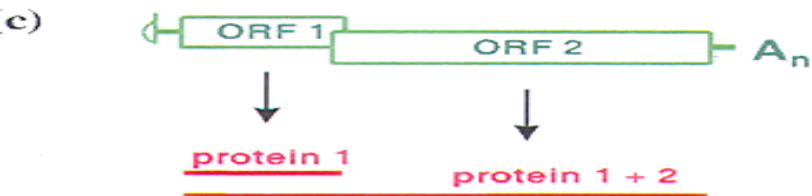
## Examples of Proteins Encoded by Bicistronic mRNAs



HIV-1 Vpu and Env



Rotavirus NSP5 and NSP6



HIV-1 Gag and Gag-Pol

## Μετάφραση δικιστρονικών mRNAs

- a) και b) το ριβόσωμα μπορεί να ξεκινήσει την μετάφραση στο κωδικόνιο έναρξης του ORF 1 ή εναλλακτικά μέσω του μηχανισμού “leaky scanning” να ξεκινήσει την μετάφραση από το κωδικόνιο έναρξης του ORF2 . Τα δυο κωδικόνια έναρξης είναι σε διαφορετικά πλαίσια ανάγνωσης και έτσι οι πρωτεΐνες οι οποίες προκύπτουν είναι διαφορετικές.
- c) Το ORF2 μεταφράζεται μέσω του μηχανισμού “ ribosomal frameshift” παράγοντας μια πρωτεϊνική αλληλουχία η οποία περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες 1+2



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

## Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός ιών

- Κυτταροκαλλιέργειες, ανίχνευση ιών, ανίχνευση αντισωμάτων έναντι των ιών
- Τεχνικές: Real Time PCR, NASBA, LCR, bDNA

Viruses are genetic elements enclosed in a protective coat that allows them to move from one cell to another. Viruses may be subdivided by genome type, into those with:

- Double stranded (ds) DNA genomes (including the Adenoviridae), which are amongst the largest of viral genomes;
- Single stranded (ss) DNA genomes, typically small, such as parvovirus.
- ds RNA /RNA genomes, (e.g., reovirus);
- ssRNA genomes, which can be subdivided into those that function as mRNA (positive sense),
- and those that are complementary to the mRNA produced from them (negative sense).
- Viruses with RNA genomes that use a DNA intermediate (a provirus) to produce the RNA genome (Retroviridae);
- Viruses with DNA genomes that use an RNA intermediate stage to produce a DNA genome (Hepadnaviridae).

The replication of RNA viral genomes occurs through the formation of complementary strands, **a process that is catalyzed by RNA polymerase enzymes** .

As mentioned above, there are so called negative strand RNA viruses (e.g., influenza) and positive strand viruses (such as polio).

The difference is that in the former case the infecting viral RNA does not code for protein; it is only the complementary strand and there must be a preformed RNA polymerase present to produce infectious strands.

In the case of positive strand viruses the viral strand is coding and can act as a messenger RNA in the cell. Some viruses can replicate in the cytoplasm, or can incorporate into the host cell DNA. The RNA viruses that do this are called retroviruses, such as HIV, where part of the genome codes for an enzyme not present in higher cells; reverse transcriptase. This produces DNA from RNA, and in this way the viral RNA genome can be integrated into that of the cell.

## **2.6 Some pitfalls in nucleic acid diagnosis**

This is especially true of PCR where the sensitivity of the technique can be a real problem. Great care has to be taken, as it is the PCR product, rather than DNA from other individuals, that is the most likely cause of contamination.

**To minimize the problem, solutions for PCR are prepared in one room, sample is added in another, and the PCR is carried out in another.**

**PCR products are never allowed into the other areas. Some laboratories have different colored lab coats for those people in each room, and different colored pipettes, so it is immediately obvious if anyone or anything is in the wrong place. This may seem excessive, but there are many papers in the literature where positive viral results have proved to be due to contamination. Mutations in the primer sites in PCR can produce anomalous results, especially if they are at the most 3' position. In this case the primer will almost certainly not amplify, and this can give the appearance of a deletion for this region, whereas it is simply a point mutation.**

Molecular probes have the advantages over conventional methods of speed, specificity and sensitivity. In addition they may be the only applicable techniques as many microorganisms are fastidious and cannot be easily grown. This is particularly pertinent to the study of viruses which, as obligate intracellular parasites, require mammalian cells for their culture. Apart from detection, molecular methods are now becoming standard technologies for establishing viral load, particularly with regard to monitoring treatment, and resistance to antiviral therapy. Table 4.1 shows a comparison of molecular probes with more conventional methods.

Viruses are obligate intracellular parasites.

They possess either RNA or DNA. From the viewpoint of probe technologies it is useful to know the type of target nucleic acid. In theory it should be possible to diagnose virus infections rapidly by electron microscopy and culture.

In practice, the former is insensitive, requiring about  $10^6$  virions to be present in a sample, and the latter slow and not always possible. Molecular probes, and gene amplification, overcome these problems and have become routine procedures in the diagnostic setting.



**Table 4.1:** A comparison of molecular probes with conventional methods for the detection of micro-organisms

	Culture	Immuno- fluorescence	ELISA	Non- amplification probes	Gene amplification methods
Speed to produce result	+	+++	+++	++	++/+++
Sensitivity	+++	++	++	++	++++
Specificity	+++	++	++	+++	++++
Quantifiability	++	++	++	+	+++
Ease of use	+	+	+++	+	++/+++

## **4.2 Sample collection and preparation**

Nucleic acid from DNA viruses can be processed in a manner not dissimilar to that used for DNA from eukaryotic and bacterial sources. RNA is, however, more labile and specimens containing viral RNA need to be handled rigorously.

**Containers should be both sterile and treated with diethylpyrocarbonate to minimize RNase activity.**

**Collection should be undertaken with gloves as RNase activity is high in sweat and other bodily fluids. The use of RNase inhibitors may also be required if viral load is low.**

**Extraction of RNA as template requires rigorously controlled conditions and most often employs a guanidium-isothiocyanate (GI ) extraction step.**

## 4.3 Detection of virus

### 4.3.1 PCR methods

For DNA viruses this is straightforward, for RNA viruses an additional reverse transcription step is required either by a separate RT enzyme or a DNA polymerase, such as *Thermus thermophilus* DNA polymerase, which has RT activity.

Human papillomaviruses (HPV) cannot be routinely grown in cell culture and serological assays, are of poor sensitivity and cross-reactivity of antigens. These viruses are recognized by their genotype of which more than 120 are now recognized.

Certain types of HPV, such as 16 and 18, are strongly associated with the risk of cervical cancer. Other types may be more common but are not oncogenic. PCR studies have shown that up to half of Papanicolaou smear-negative cervical specimens carry HPV, including type 16,

suggesting that this is a more sensitive test for determining the risk of subsequent cervical cancer. PCR also allows genotyping with the use of type-specific primers. Other viruses that cannot be grown routinely are shown in *Table 4.3*. Some viruses can be routinely grown in cell culture but grow so slowly as to be clinically unhelpful.

An example of this is the cytomegalovirus (CMV). Standard cell culture techniques can take up to 3 weeks for positive isolation although this can be speeded up by immunofluorescent or enzymatic detection of early antigens in 24-48 hours. Both simple probe and amplification methods have been applied to the detection of CMV. Positive results may occur because of latent virus which is common in adults. In one study in which primers were used that hybridized to regions of the MIE gene (the 'major immediate early' antigen gene, an expressed nonstructural product), all 44 culture-positive neonates were PCR positive in their urine but none of the 27

culture-negative neonates were. The most problematic specimen type is blood as the virus is lymphotropic and latent virus can be detected in white cells. Unless there is bleeding into the meninges, however, CSF would not normally be expected to harbor latent virus and its use on CSF of AIDS patients with neurological disorders has shown PCR to be able to detect almost all cases with disease even though cell culture was more commonly negative. **With viruses expected to be**

**present in low concentrations, nested PCR is often used ;**

the increased sensitivity also, however, makes the risk of false positives due to contamination. With specimens which may

have a number of different viruses or even mixed infections, multiplex PCR methods have been developed. **Specimens such as CSF and respiratory secretions are ideal samples for the use of multiplex PCR as the clinical features are unlikely to identify the causative virus.** Another use of multiplex PCR is to type viruses. There are, for example,

four serotypes of dengue virus which can cause an illness ranging from simple fever to hemorrhagic fever. It is useful to be able to type this virus as it is recognized that infection with one serotype, following prior infection with another is a risk factor for the serious hemorrhagic fever manifestation.

**Table 4.3:** Examples of common viruses that cannot be routinely grown in cell culture

Virus	Disease
Hepatitis A	Infectious hepatitis
Hepatitis B	Infectious hepatitis
Hepatitis C	Infectious hepatitis
Parvovirus B19	Erythema infectiosum
Coronaviruses	Common cold
Enteroviruses	Meningitis, rashes and other infections
Polyomaviruses	Progressive multifocal leukoencephalopathy
Papillomaviruses	Warts
Epstein-Barr virus	Infectious mononucleosis

## Other Amplification Techniques

Following the heels of PCR, a number of alternative in-vitro amplification techniques have been developed, of which some are now available commercially. Examples of these alternative techniques include ligase chain reaction (LCR), nucleic acid sequence based amplification/isothermal amplification (NASBA), and branched DNA probes. Of these techniques, LCR, NASBA and branched DNA are now available commercially in an automated or semi-automated format. A NASBA assay is available for the quantification of HIV-RNA (Organon), and an LCR assay is available for the detection of chlamydia (Abbott). Branched DNA assays are available for the detection and quantification of HIV-RNA, HBV-DNA, and HCV-RNA (Chiron).

*With the exception of the branched DNA probe, all these techniques involve exponential amplification of either the target nucleic acid or the probe.*

Therefore, they are all as susceptible to contamination as PCR. The branched DNA system is really an intermediate between classical hybridization techniques and the newer in-vitro amplification techniques. It is not as sensitive as those techniques which involve exponential amplification but is considerably more sensitive than the classical hybridization techniques.

## **Quantitative viral estimation**

Quantification of viral load is becoming increasingly important as a means of monitoring antiviral therapy of viruses such as HIV and hepatitis C. It is also used, in HIV infection, as a means for deciding when to start therapy. PCR, nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and branched chain DNA (bDNA) amplification methods have all been applied to quantification of viral load in the clinical setting.



This can be enhanced by the use of '**real-time**' **PCR** to 50 copies ml<sup>-1</sup>. **NASBA** is an isothermal RNA amplification system which has a similar lower limit of detection to PCR. It is available commercially with a linear dynamic range of 10<sup>2</sup> -10<sup>7</sup> copies ml<sup>-1</sup> when applied to HIV-1 quantification. This is a transcription-based amplification system (TAS), as is the similar self-sustained sequence amplification (3SR), which utilizes 3 enzyme activities:

### **RT, RNase H and T7 RNA polymerase.**

An oligonucleotide probe primer is bound to target RNA and the RT makes a DNA copy. RNase H removes the RNA portion of the RNA-DNA hybrid and allows a second probe primer to anneal downstream. RT then acts as a DNA-dependent DNA polymerase to extend from one probe binding site to the other. One probe primer has a T7 promoter site incorporated so that this enzyme can then produce a

further RNA copy to allow the process to start again. Typically a  $10^8 - 10^9$  amplification can be achieved.

**bDNA** amplification does not require an internal control template to be quantifiable. It is a signal amplification method that uses branched chain DNA probes that can then act as substrates for further hybridization reactions if the template is present initially. The technology is licensed by Chiron and has a linear range for HIV-1 of  $10^4 - 10^6$  copies  $\text{ml}^{-1}$ .

## **4.5 Measurement of antiviral resistance**

Genotypic determination of viral resistance relies on identification of mutations that confer this state. Thus, it is known that mutations in the UL97 phosphotransferase gene and the UL54 DNA polymerase genes of cytomegalovirus confer resistance to the antiviral drugs, ganciclovir and/or foscarnet. For some viruses, such as HIV which mutates frequently like most other RNA viruses, a battery of probes could be used to look for the common mutations that confer resistance in the RT and protease genes

## **1. Virus Isolation**

Viruses are obligate intracellular parasites that require living cells in order to replicate. Cultured cells, eggs and laboratory animals may be used for virus isolation. Although embryonated eggs and laboratory animals are very useful for the isolation of certain viruses, cell cultures are the sole system for virus isolation in most laboratories. The development of methods for cultivating animal cells has been essential to the progress of animal virology. To prepare cell cultures, tissue fragments are first dissociated, usually with the aid of trypsin or collagenase. The cell suspension is then placed in a flat-bottomed glass or plastic container (petri dish, a flask, a bottle, test tube) together with a suitable liquid medium. e.g. Eagle's, and an animal serum. After a variable lag, the cells will attach and spread on the bottom of the container and then start dividing, giving rise to a primary culture. Attachment to a solid support is essential for the growth of normal cells.

## **Primary and Secondary Cultures**

Primary cultures are maintained by changing the fluid 2 or 3 times a week. When the cultures become too crowded, the cells are detached from the vessel wall by either trypsin or EDTA, and portions are used to initiate secondary cultures. In both primary and secondary cultures, the cells retain some of the characteristics of the tissue from which they are derived.

## **Cell Strains and Cell Lines**

Cells from primary cultures can often be transferred serially a number of times. The cells may then continue to multiply at a constant rate over many successive transfers. Eventually, after a number of transfers, the cells undergo culture senescence and cannot be transferred any longer. For human diploid cell cultures, the growth rate declines after about 50 duplications. During the multiplication of the cell strain, some cells become altered in that they acquire a different morphology, grow faster, and become able to start a cell culture from a smaller number of cells. These cells are immortalized and have an unlimited life-span. However, they retain contact inhibition.

# Cell Cultures

Cell cultures are separated into 3 types:

1. **Primary cells** - prepared directly from animal or human tissues and can be subcultured only once or twice e.g. primary monkey kidney
2. **Semi-continuous diploid cells** - which are derived from human fetal tissue and can be subcultured 20 to 50 times e.g. human diploid fibroblasts such as MRC-5
3. **Continuous cells** - derived from tumours of human or animal tissue e.g. Vero, Hep2

- **Cell cultures vary greatly in their susceptibility to different viruses. It is of utmost importance that the most sensitive cell cultures are used for a particular suspected virus. Specimens for cell culture should be transported to the laboratory as soon as possible upon being taken. Swabs should be put in a vial containing virus transport medium. Bodily fluids and tissues should be placed in a sterile container.**
- **Upon receipt, the specimen is inoculated into several different types of cell culture depending on the nature of the specimen and the clinical presentation. The maintenance media should be changed after 1 hour or if that is not practicable, the next morning. The inoculated tubes should be incubated at 35-37°C in a rotating drum. Rotation is optimal for the isolation of viruses and result in an earlier appearance of the CPE for many viruses. If stationary tubes are used, it is critical that the culture tubes be positioned so that the cell monolayer is bathed in nutrient medium.**
- **The inoculated tubes should be read at least every other day for the presence of cytopathic effect. Certain specimens, such as urine and faeces, may be toxic to cell cultures that may produce a CPE-like effect. If toxic effects are extensive, it may be necessary to passage the inoculated cells. Cell cultures that are contaminated by bacteria should either be put up again or passed through a bacterial filter. Cell cultures should be kept for at least one to two weeks (longer in the case of**

# ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΠΤΥΣΣΟΝΤΑΙ ΣΕ:

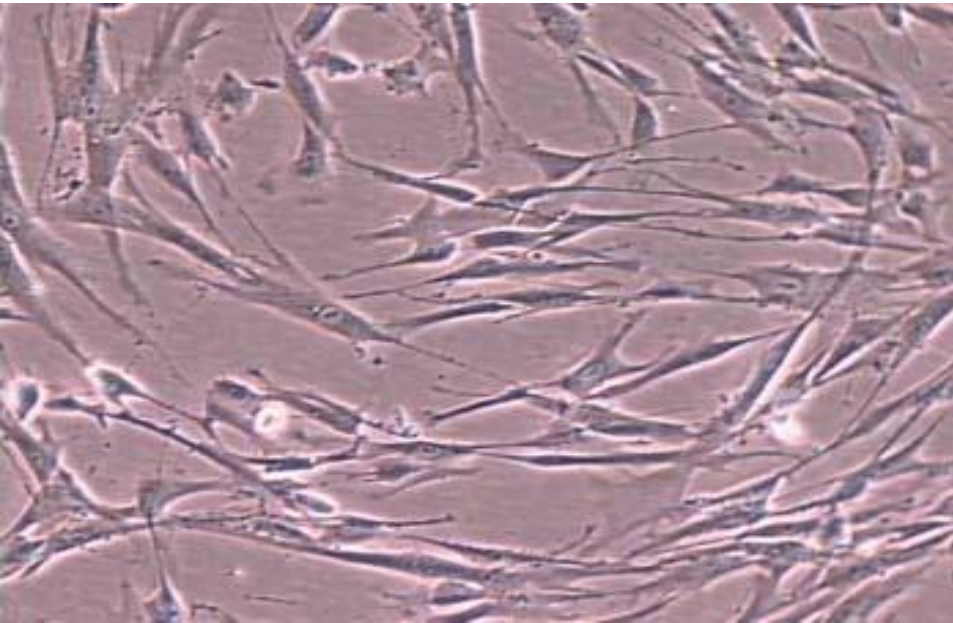
## 1. ΣΤΕΡΕΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ- Κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδες

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ
MRC-5	ΠΝΕΥΜΩΝΑΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ
HEL4	ΤΡΑΧΗΛΟΣ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ
VERO	ΝΕΦΡΑ ΑΦΡΙΚΑΝΙΚΟΥ ΠΙΘΗΚΟΥ	ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ
BHK-21	ΝΕΦΡΑ ΝΕΟΓΕΝΝΗΤΟΥ ΗΑΜΣΤΕΡ	ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ
BAE-1	ΒΟΕΙΟΣ ΛΟΡΤΗ	ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ

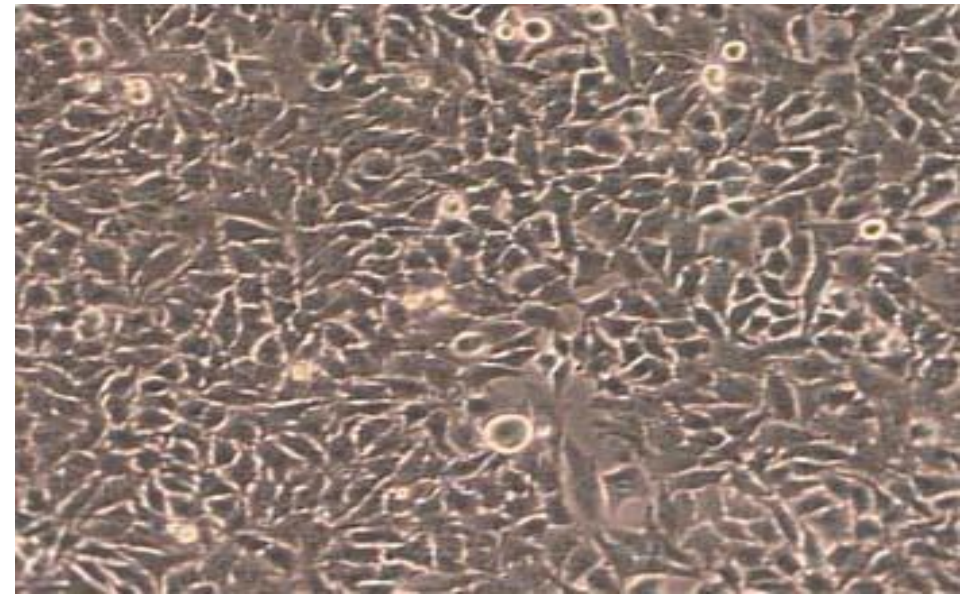
## 2. ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ

ΟΝΟΜΑΣΙΑ	ΙΣΤΟΣ ΚΑΙ ΕΙΔΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ
Namalwa	ΛΕΜΦΩΜΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΟΕΙΔΗΣ
HL60	ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΟΕΙΔΗΣ
U266B1	ΜΥΕΛΩΜΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΛΕΜΦΟΒΛΑΣΤΟΕΙΔΗΣ
SH-SY5Y	ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΩΜΑ ΑΝΘΡΩΠΟΥ	ΝΕΥΡΟΒΛΑΣΤΕΣ

# ΙΝΟΒΛΑΣΤΕΣ



# ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ



ΠΛΑΣΤΙΚΗ ΦΙΑΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ  
ΣΕ ΣΤΕΡΕΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ (A) ή σε ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ (B)

A

B





Η φιάλη (B) μπορεί να επιτρέψει και την ανάπτυξη των κυττάρων τα οποία αναπτύσσονται σε μονοστοιβάδες αρκεί οι φιάλες να περιστρέφονται πάνω στην κατωτέρω συσκευή αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την επιφάνεια προσκόλλησης των κυττάρων στο πλαστικό.



## ΣΥΣΚΕΥΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΕ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑ





430172 Culture Tube



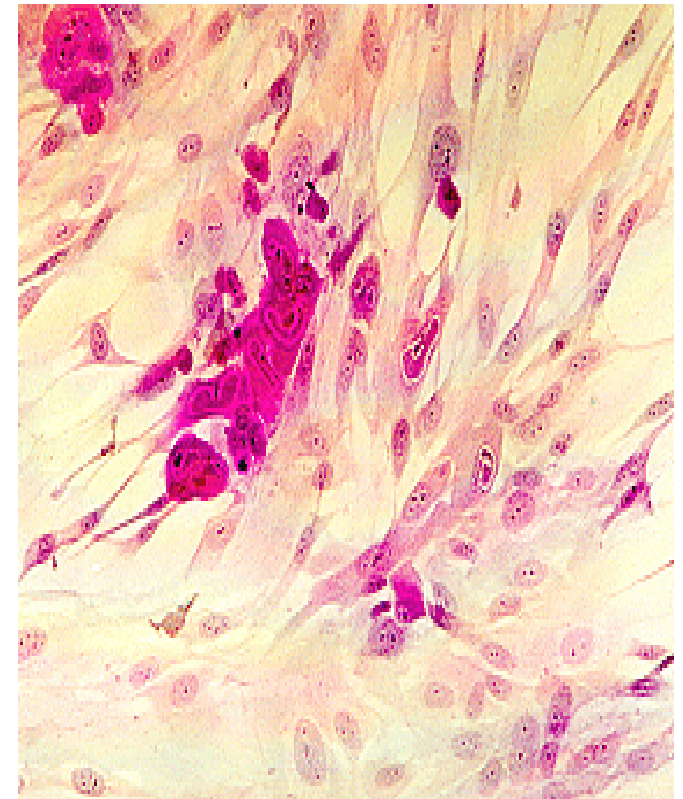
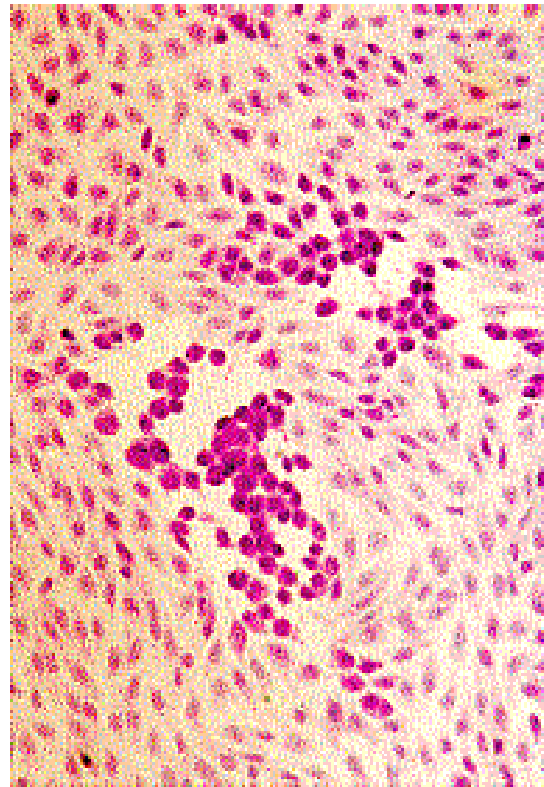
Μετά από την αποκόλληση των κυττάρων από την φιάλη και την δημιουργία εναιωρήματος σε κατάλληλη ποσότητα θρεπτικού μέσου, που περιέχει 10% ορό, το εναιώρημα μεταφέρεται ανά 2ml σε σωλήνες κυτταροκαλλιέργειών. Οι σωλήνες επωάζονται στον κλίβανο (37 °C) στην ανωτέρω συσκευή για 24-48 ώρες.

Αφού διαπιστωθεί η ανάπτυξη μονοστοιβάδας κυττάρων στους σωλήνες, το μέσο ανάπτυξης αποβάλλεται και αντικαθίσταται με 2ml μέσου καλλιέργειας συντήρησης (MM - με 2% ορό). Οι σωλήνες μεταφέρονται σε άλλο θάλαμο καθέτου νηματικής ροής ( επιπέδου τουλάχιστον P2 -BSL-2) για τον ενοφθαλμισμό των ιών και μάλιστα σε εργαστήριο εκτός εκείνου των κυτταροκαλλιέργειών.

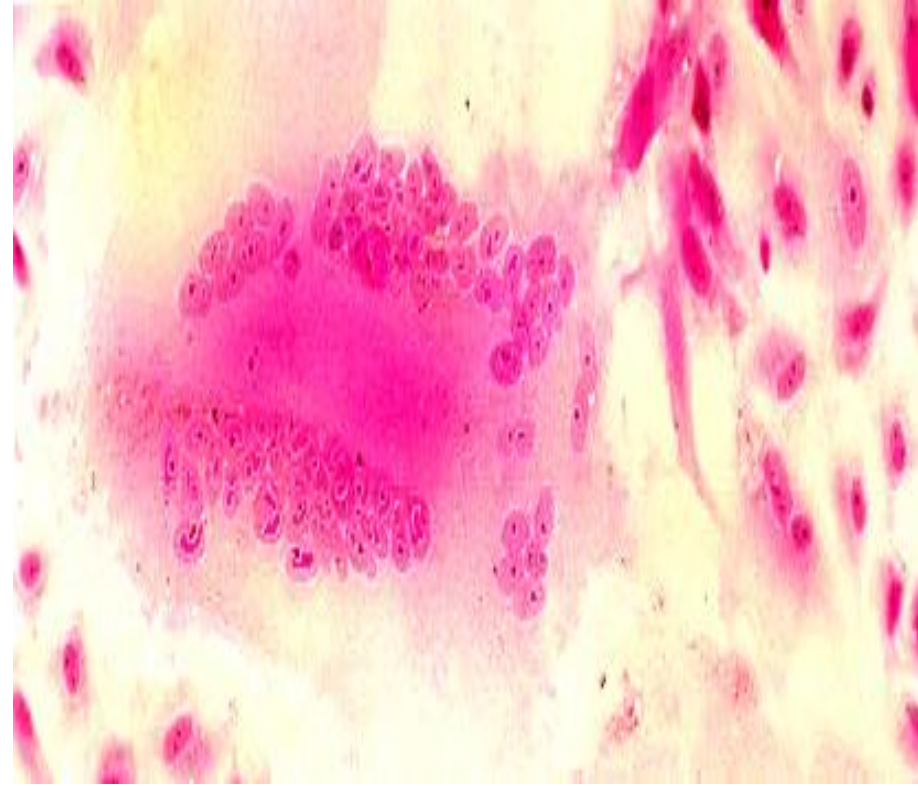
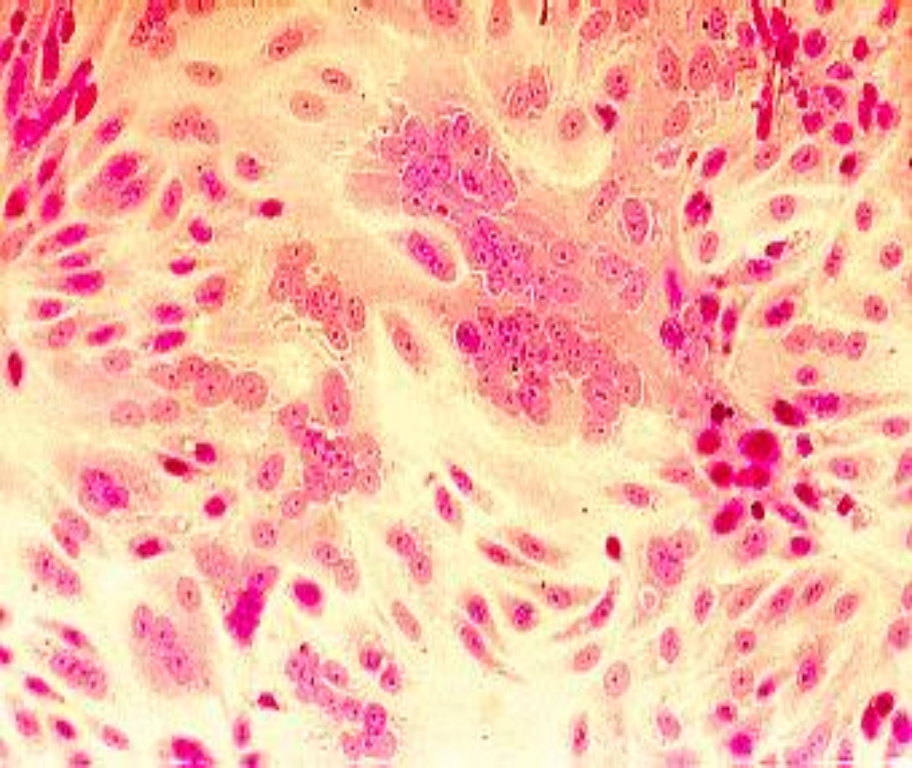
•Cell cultures should be refed with fresh maintenance medium at regular intervals or if required should the culture medium become too acidic or alkaline. When CPE is seen, it may be advisable to passage infected culture fluid into a fresh culture of the same cell type. For cell-associated viruses such as CMV and VZV, it is necessary to trypsinize and passage intact infected cells. Other viruses such as adenovirus can be subcultured after freezing and thawing infected cells.



Fig. 1. Cytopathic effects of enterovirus 71 in rhesus monkey kidney cells

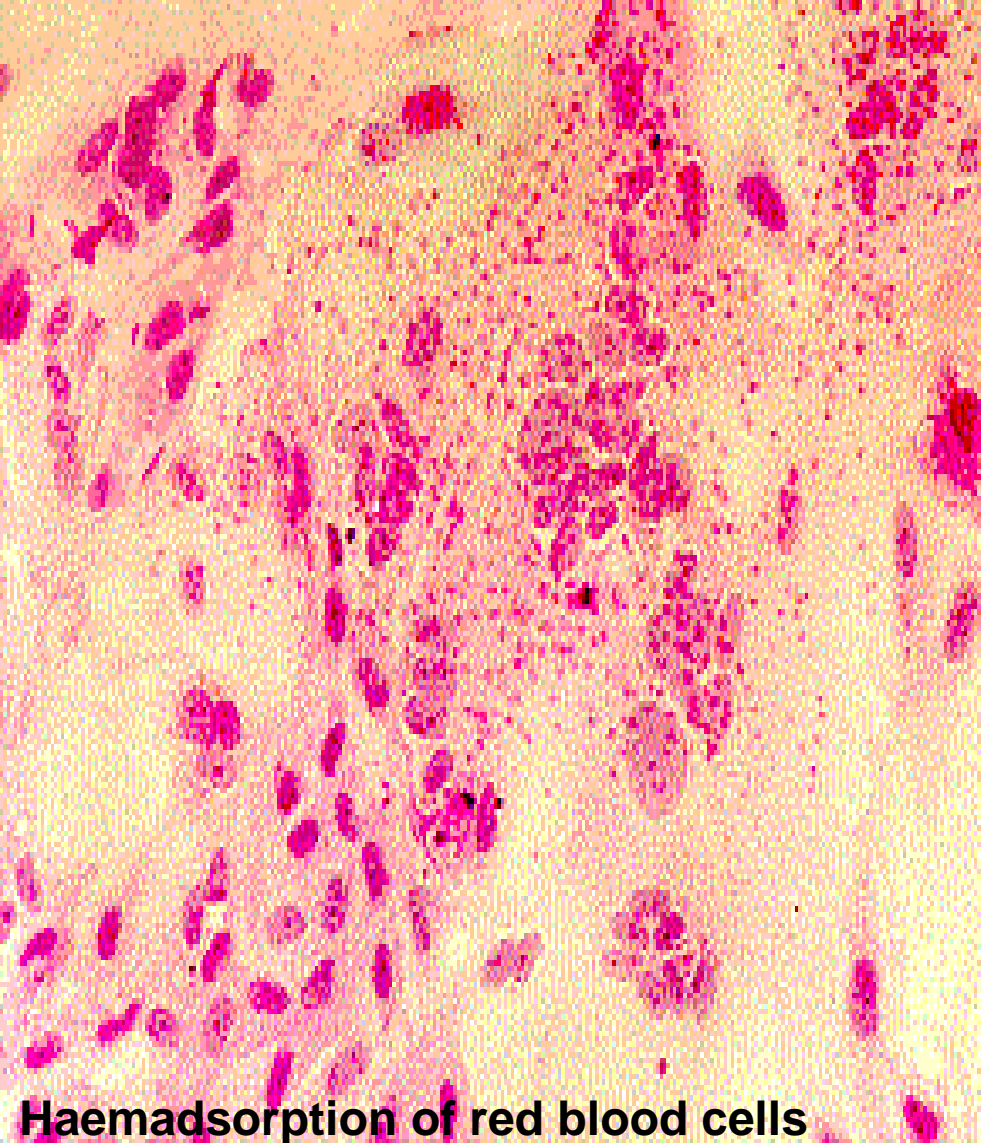


Cytopathic effects of enterovirus 71, HSV, and CMV in cell culture: note the ballooning of cells.



**Cytopathic effects of mumps and measles viruses in cell culture: note the formation of syncytia.**

**Influenza and parainfluenza viruses do not ordinarily induce CPE, however they possess haemagglutinins and thus the ability to absorb guinea pig RBCs as they bud from the cell. This phenomenon is known as haemadsorption.**



**Commonly employed cell cultures include primary monkey kidney, LLC-MK2 and MDCK cells. The cell cultures are incubated with a suspension of guinea pig RBCs at 4°C or RT for 30 minutes. The unabsorbed RBCs are then removed and the cell sheet observed microscopically for the presence of haemadsorption.**

**Haemadsorption of red blood cells**

**onto the surface of a cell sheet infected by mumps virus.**

**Also note the presence of syncytia**

**Presumptive identification of virus isolates can usually be made on the basis of the type of CPE, haemadsorption and selective cell culture susceptibility. For final identification, immunofluorescence, neutralization, haemadsorption inhibition, electron microscopy, or molecular tests are normally carried out.**

### **Rapid Culture Techniques e.g. DEAFF test**

**One of the most significant contributions to rapid diagnosis has been the application of centrifugation cultures to viral diagnosis. The cell culture is stained by monoclonal antibodies for the presence of specific viral antigens 24-48 hours later. The best known example of this technique is the DEAFF test used for the early diagnosis of CMV infection. In the DEAFF test, the specimen is inoculated onto human embryonic fibroblasts and then spun at a low speed. After a period of 24-48 hours, the cells are then stained by monoclonal antibodies against CMV early antigen. Therefore a rapid diagnosis of CMV infection can be made without having to wait 1-3 weeks for the CPE to appear**

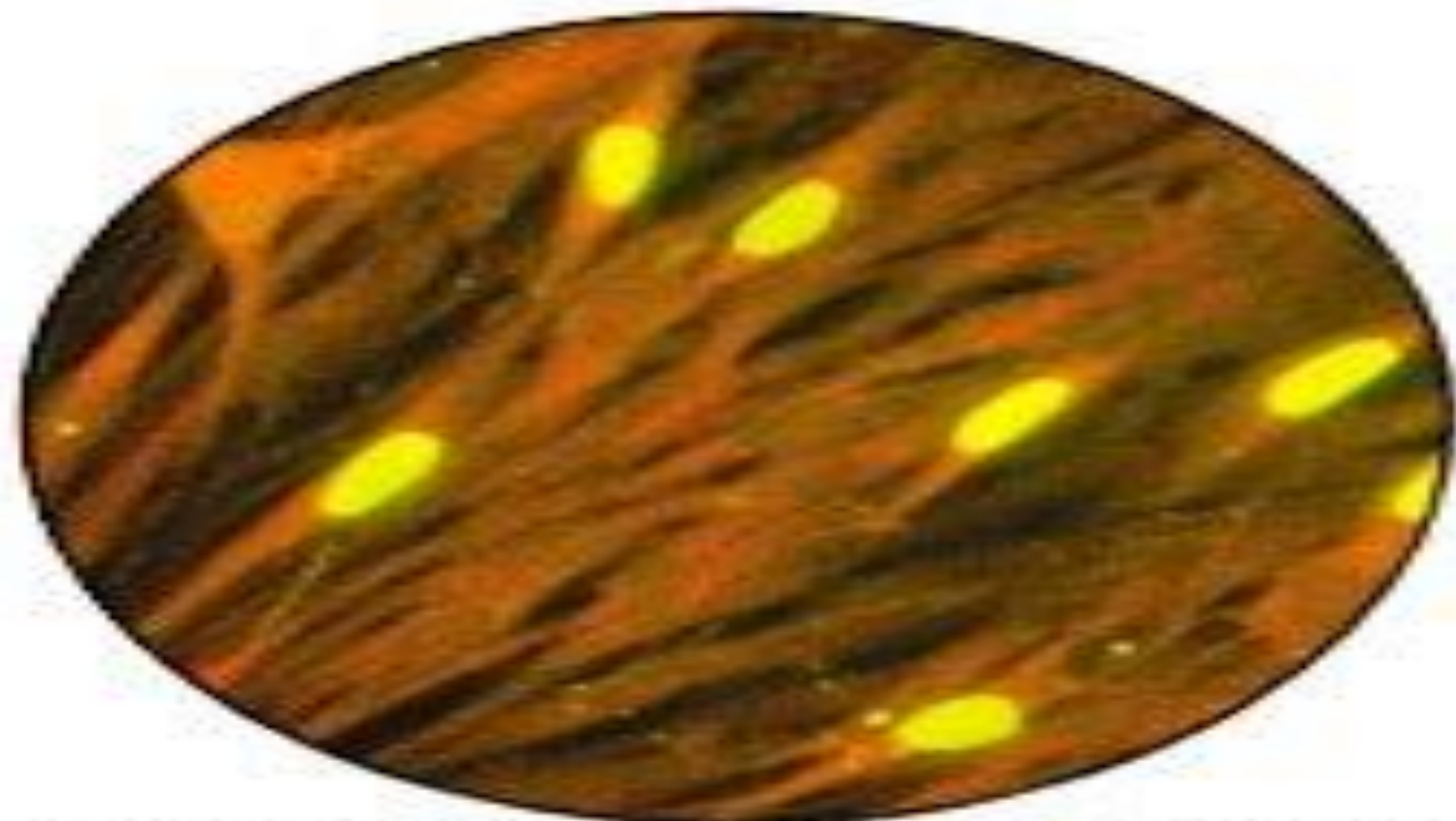


Fig. 2, CMV centrifugation culture fixed and stained 16 hrs after inoculation showing viral proteins in nuclei of infected human fibroblast cells

## Susceptible Cell Lines

1. **Herpes Simplex** Vero Hep-2, human diploid (HEK and HEL), human amnion
2. **VZV** human diploid (HEL, HEK)
3. **CMV** human diploid fibroblasts
4. **Adenovirus** Hep2, HeLa,
5. **Poliovirus** MK, BGM, LLC-MK2, human diploid, Vero, Hep-2, Rhabdomyosarcoma
6. **Coxsackie B** MK, BGM, LLC-MK2, vero, hep-2
7. **Echo** MK, BGM, LLC-MK2, human diploid, Rd
8. **Influenza A** MK, LLC-MK2, MDCK
9. **Influenza B** MK, LLC-MK2, MDCK
10. **Parainfluenza** MK, LLC-MK2
11. **Mumps** MK, LLC-MK2, HEK, Vero
12. **RSV** Hep-2, Vero
13. **Rhinovirus** human diploid
14. **Measles** MK, Vero
15. **Rubella** Vero, RK13



## **2. Electron Microscopy**

**Virus diagnosis by electron microscopy relies on the detection and identification of viruses on the basis of their characteristic morphology. A major advantage of virus diagnosis by EM is the ability to visualize the virus.**

**Speed is another advantage of EM as the specimen can be processed within minutes of receipt and thus EM can be used as a rapid diagnostic method.**

**On the other hand, the main disadvantage of EM is its inability to examine multiple specimens coincidentally.**

**Secondly, there must be a minimum number of virus particles present (around  $10^6$  virus particles per ml for detection) Some viruses may give a non-distinct morphological appearance which may make detection very difficult.**

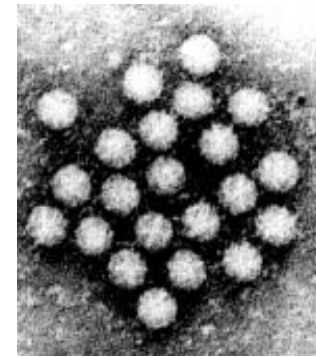
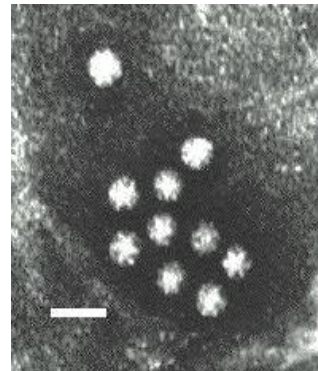
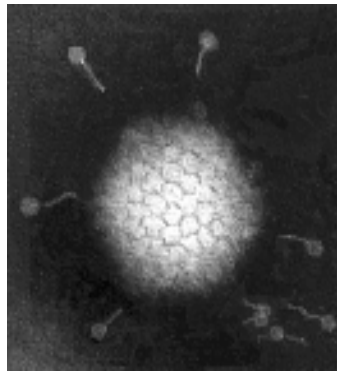
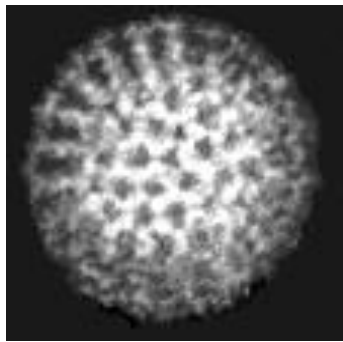
**Finally, EM is a very expensive service to provide and requires highly skilled personnel. EM has found a particular niche in the detection of fastidious gastroenteritis viruses such as rota, adeno, astro, Norwalk, and Caliciviruses.**

**There are two types of EM methods; direct or immunoelectron microscopy (IEM).**

**With direct methods, negative staining is normally used which requires little special equipment, in contrast to thin sectioning techniques. The specimens may be used directly or the virus particles may be concentrated before negative staining. Immunoelectron microscopy is a means of increasing the sensitivity and specificity of EM and is particularly useful in the following situations;**

- 1.The number of virus particles present is small.
- 2.Many different viruses have different morphology e.g. herpesviruses and picornaviruses. IEM may identify the virus .

There are 2 types of IEM, simple IEM, where the specimen is incubated with specific antibody before staining in the hope that the antibody will agglutinate the specimen, and solid phase IEM (SPIEM), where the copy grid is coated with specific antibody which is used to capture virus particles from the specimen.



Electronmicrographs of viruses commonly found in stool specimens from patients suffering from gastroenteritis. From left to right: rotavirus, adenovirus, astroviruses, Norwalk-like viruses.

## ELISA

**ELISA was developed in 1970 and became rapidly accepted. A wide variety of assay principles can be used in ELISA techniques. Currently the most important ones are;**

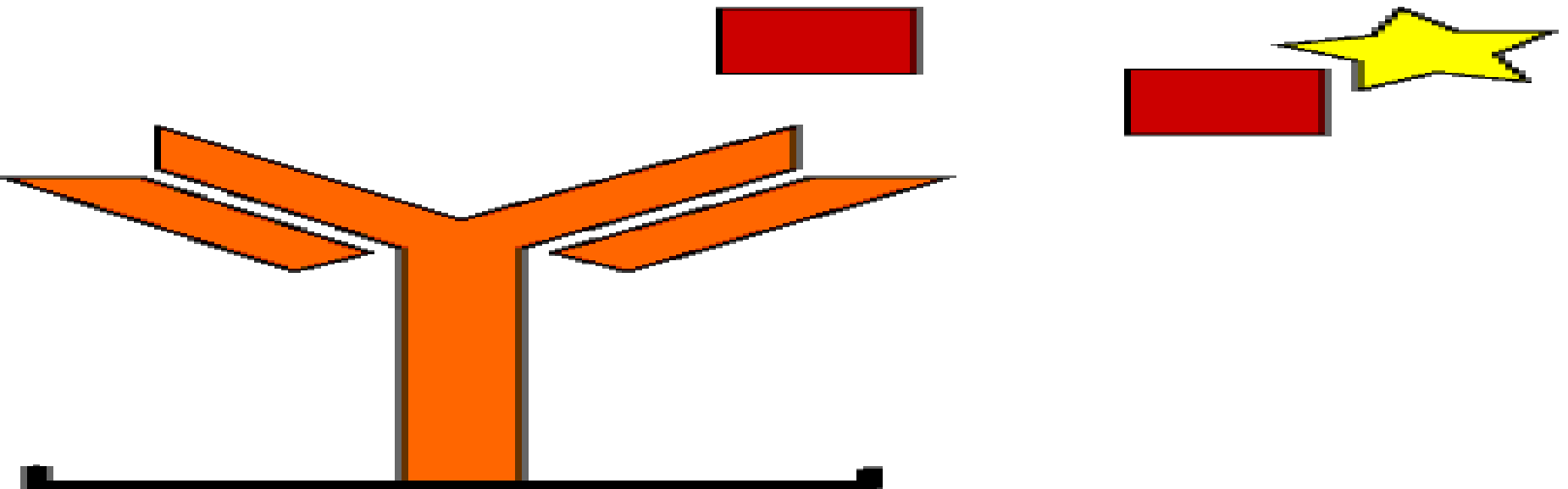
- 1.Competitive methods**
- 2.Sandwich methods**
- 3.Antibody capture methods**

## Competitive methods

One component of the immune reaction is insolubilized and the other one labeled with an enzyme. The analyte can then be quantified by its ability to prevent the formation of the complex between the insolubilized and the labelled reagent.

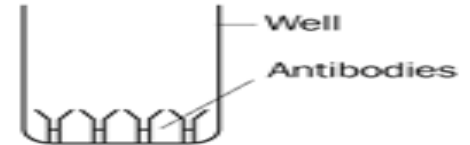
Advantages of this approach are that only one incubation step is necessary and that the "prozone effect" at high analyte concentrations cannot occur.

Disadvantages are that the concentration range in which the analyte can be quantified without sample dilution is rather narrow and that the antigen or antibody therefore cannot be distinguished in a one step assay



## Easy-to-Use Assay Procedure

Plates are precoated with the primary antibody, secondary antibody or Protein A. The plate is ready for use. DO NOT WASH.



A sample or standard solution is added to each well. Next the enzyme conjugate is added and the mixture is incubated for 1 hour at room temperature.



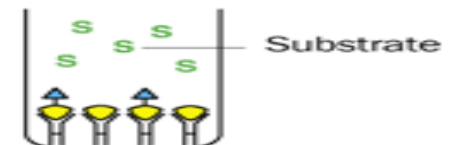
Wash 3 times to remove all unbound materials.



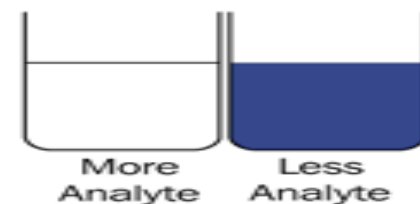
The bound materials now remain in the microplate.



Add substrate to each well and allow the color to develop for 30 minutes.

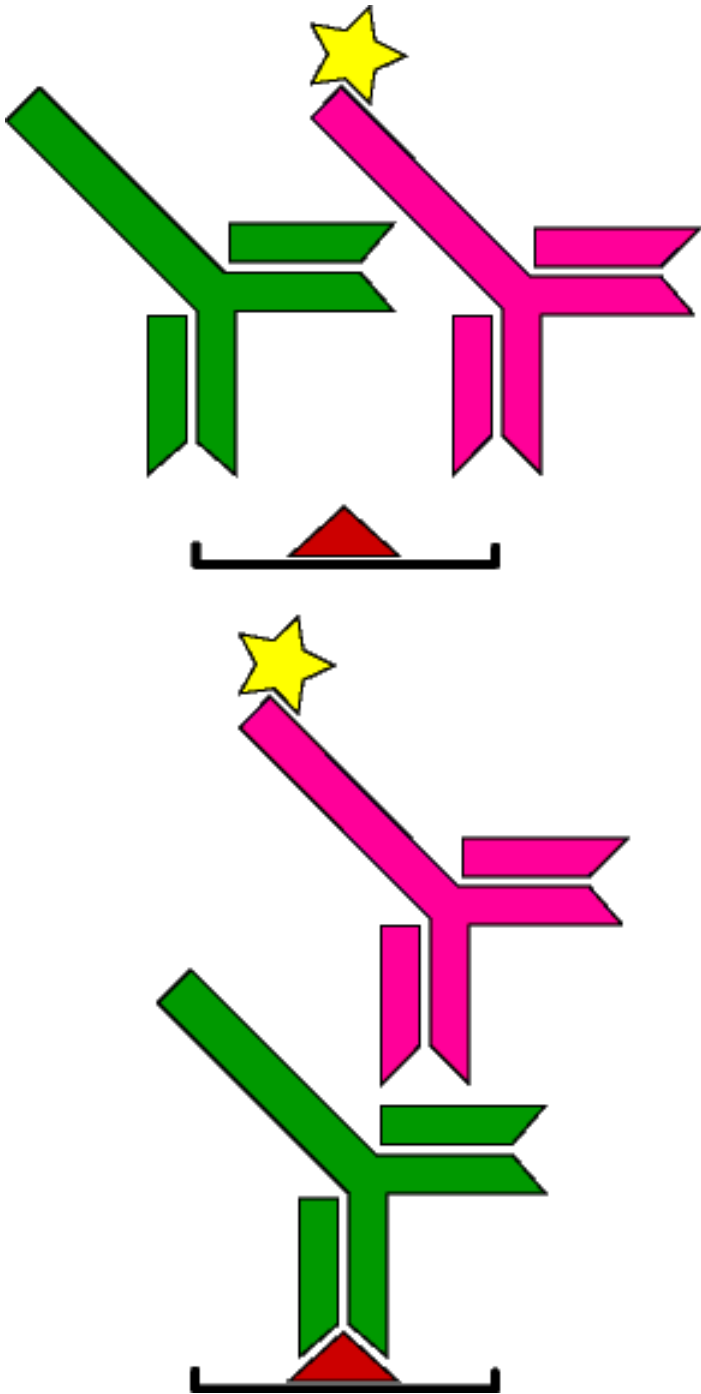


Quantitative results are obtained by measuring the absorbance reading at 650 nm.



**Direct Competitive ELISA:**  
operate on the basis of competition between the horseradish peroxidase (HRP) enzyme conjugate and the analyte in the sample for a limited number of specific binding sites on the precoated microplate

## Competitive or Blocking ELISA



In a **competitive ELISA**, a patient serum and an Ag-specific conjugate (pink) are co-incubated with a captured Ag.

The amount of colour developed is inversely proportional to the amount of Ag-specific patient Ig present. Careful standardisation is required to interpret the results

In a **blocking ELISA**, the patient serum is added first, incubated and the excess washed off.

Next an Ag-specific conjugate is added and the results interpreted as above. Titres here may be lower if the conjugate is of a high enough titer to displace patient Ab.

## **Indirect Method**

**1. The method in which one component (usually the antigen) is used in an insolubilized form to bind the analyte from the sample (the antibody), which is subsequently determined by addition of labelled second antibody against the same class of antibody as the analyte antibody .**

**In principle, quantification can be achieved over an extremely wide analyte concentration range in such sandwich methods. The "prozone effect" can be avoided in the following ways;**

**(i) using sequential incubation steps for sample and label,  
or (ii) by using monoclonal antibodies. Modification of the test in so that antibodies of a specific class such as IgM, can be detected in the sample.  
Also RF ( rheumatoid factor ) is known to be a potentially interfering factor.**

**Types of  
ELISA  
Direct ELISA**



Direct ELISA is the most basic of ELISA configurations. It is used to detect an Ag (red triangle; virus/bacteria/fungus, recombinant peptide/protein, or another Ab) after it has been attached to the solid phase (eg. a membrane or polystyrene microwell or dipstick).

An Ab (green), conjugated with a label (yellow star; eg. HRPO, AP, FITC) is then incubated with the captured antigen. After washing off excess conjugate and incubating with a substrate and chromogen, the presence of an expected colour indicates a specific Ab-Ag interaction.

The conjugate could be a commercial preparation specific for the Ag of interest, or an in-house conjugated monoclonal or polyclonal Ab, or even patient serum. This format is identical to the Direct Fluorescent Assay (DFA) except this is performed on patient cells, usually with a glass slide as the solid phase and an FITC .

Types of ELISA  
Direct ELISA

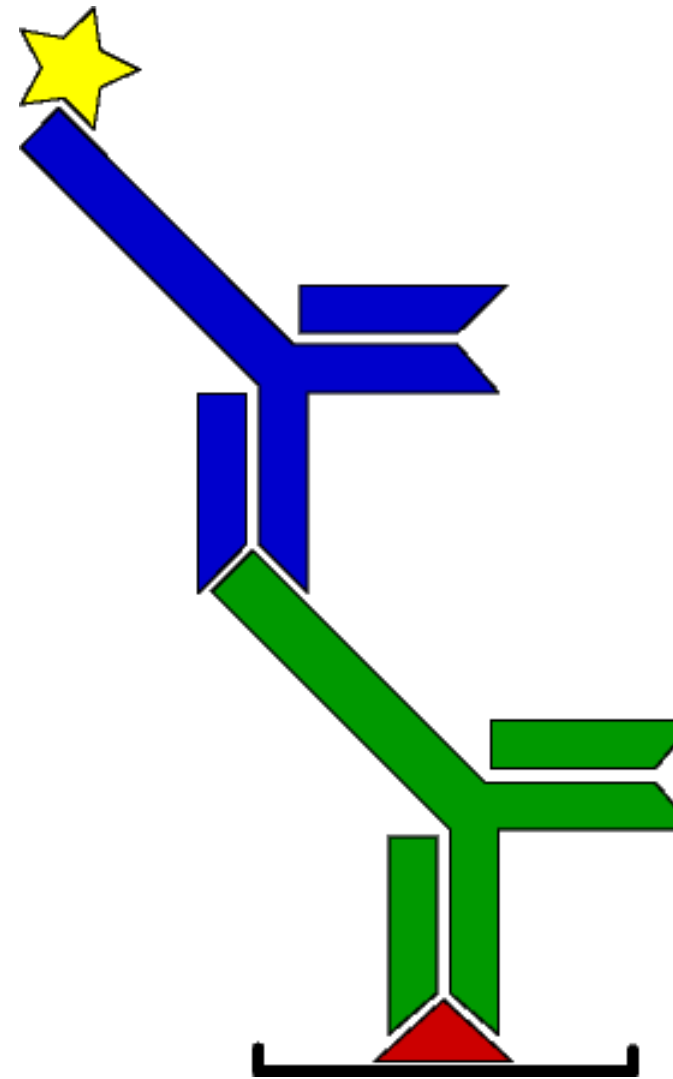


## Indirect

Once again an Ag is adsorped onto a solid phase. The first, or **primary** Ab (green) is incubated with the Ag, then the excess is washed off. A second or **secondary** Ab (blue), the conjugate, is then incubated with the samples. The excess is again removed by washing.

For colour to develop, a primary Ab that is specific for the Ag must have been present in the sample (eg. human serum, CSF or saliva or the supernatant from a hybrodoma culture).

This indiactes a positive reaction. It is important, during assay optimisation, to ensure that the secondary Ab does not bind non-specifically to the Ag preparation or impurities within it, nor to the solid phase.



## **Sandwich method**

**The method in which the same component of the immune reaction (e.g. the antibody) is used in the insolubilized and the enzyme labelled form. The other component, the analyte (i.e. the antigen in the sample forms a bridge between the two reagents).**

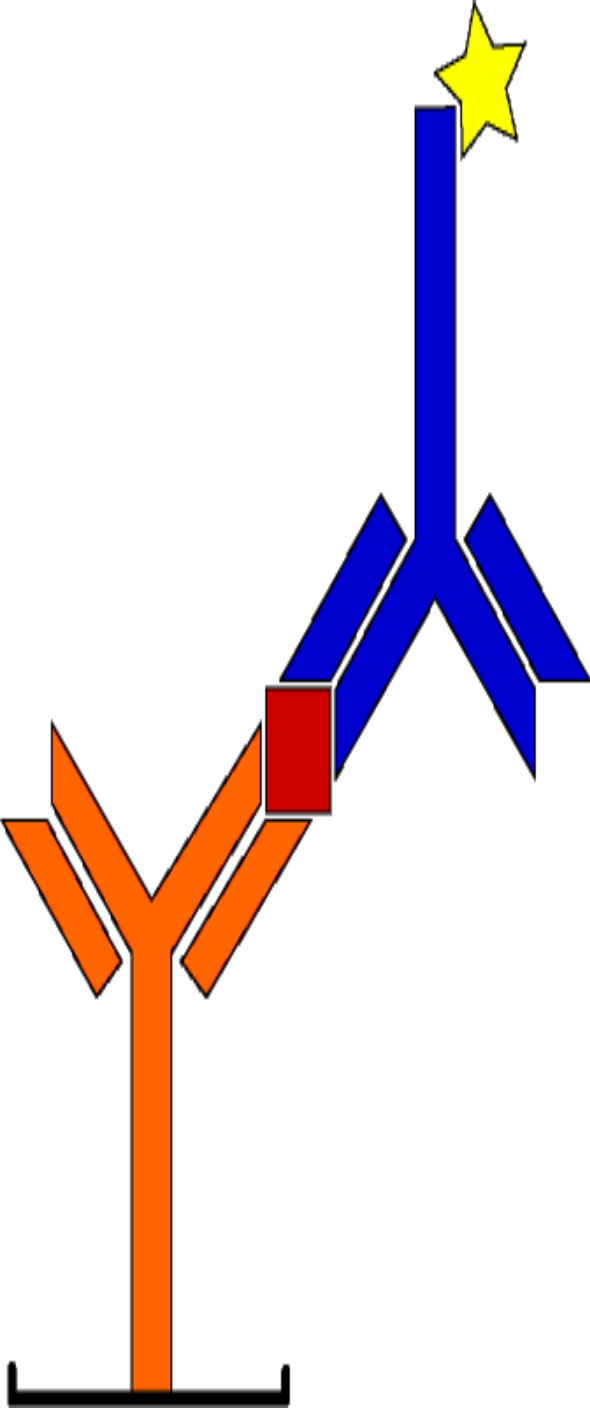
### **Antibody capture methods**

**These methods used to detect antibodies of specific immunoglobulin subclasses, by first reacting the sample with e.g. insolubilized anti-IgM and subsequently with either enzyme labelled antigen or with antigen followed by enzyme linked antibody. Neither antibodies from other immunoglobulin subclasses nor rheumatoid factor interfere significantly in such assays.**

**They are widely used for the diagnosis of acute infections by IgM detection.**

**These assays may be used for detecting IgG and IgA.**

## Capture ELISAs Antigen Capture

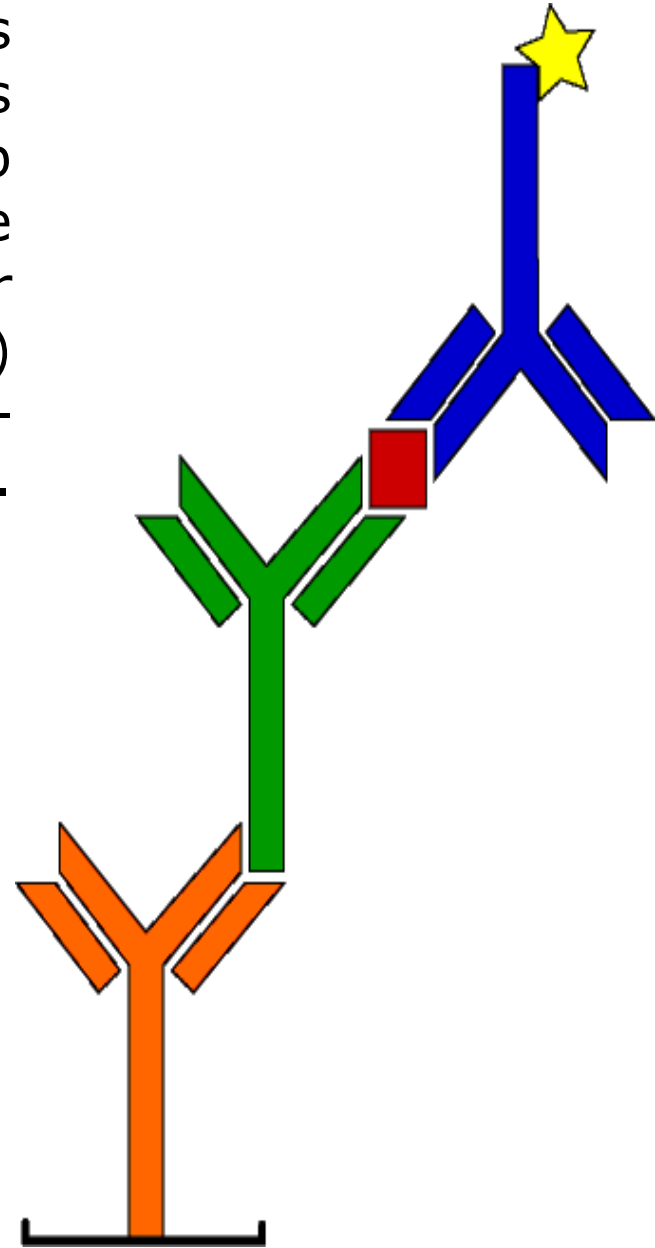


In this, more specific approach, a capturing Ab (orange) is adsorbed onto the solid phase. The capture antibody may be the reagent to be tested (eg. the titre of a patient's immune response to a known Ag). However, the Ab may be a standard reagent and the antigen the unknown (as when a patient's serum is being investigated for the presence of a microbial infection).

The same stringent optimisation is required as for Indirect ELISA. This will ensure that the Ab do not cross-react in the absence of Ag, or non-specifically bind to the solid phase.

## Antibody Capture

In this approach, a capturing Ab (orange) is adsorped onto the solid phase. The Ab is designed to capture a class of human Ab (green; eg. IgG, IgA or IgM). Next the sample is applied, containing the Ab under investigation. After washing, an Ag (red) specific for the Ab is added and finally an anti-Ag conjugate (blue) provides the signal.



## **Assay Characteristics**

**The use of monoclonal antibodies has led to many improvements in ELISA systems.**

- 1.Higher sensitivity ;- either by selection of antibodies with a extremely high affinity, which makes very low concentrations of analyte more readily detectable.**
- 2.Higher specificity ;- by avoiding the presence of any antibody in the assay system with specific reactivity against non-analyte epitopes, and by selecting combinations of monoclonal antibodies which may further increase specificity.**

**The enzyme label ;**

- Most of the assays employ horse-radish peroxidase, alkaline phosphatase, or B-D-galactosidase. Methods are available to detect horse radish peroxidase by means of chemiluminescence.**
- TMB is gradually replacing mutagenic substrates such as OPD, leading to increased sensitivity and safety.**



**Microplate ELISA: coloured wells indicate reactivity. The darker the colour, the higher the reactivity**

## Problem: *Interference*

The validity of IgM detection can be compromised by the presence of pathogen-specific (immune) IgG, thereby requiring its removal before testing. There are two major mechanisms in which immune IgG can interfere with assays for IgM antibodies: (1) by competing with specific IgM for substrate binding sites and (2) by forming immune complexes with rheumatoid factor.

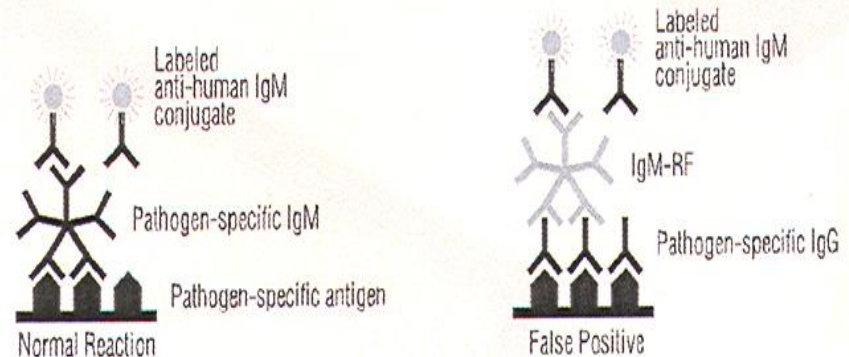
### *1. Interference by Competitive Binding*

Immune IgG more effectively competes for available binding sites on an antigen substrate than does immune IgM. In some instances, such as samples with low IgM titers, the competition by immune IgG can effectively block IgM binding and cause a false negative test result.

### *2. Interference by Rheumatoid Factor (RF)*

Rheumatoid factor (RF) interference presents one of the most serious drawbacks to IgM testing. RF is an autoimmune antibody (usually an IgM class). This anti-IgG antibody can bind with immune IgG in the sample to form an immune complex, which can bind to the antigen. This RF-IgG complex often cannot be distinguished from immune IgM complexes and invariably yields an IgM false positive test result.

#### Interference from RF



## Immunofluorescence

**Immunofluorescence (IF) is widely used for the rapid diagnosis of virus infections by the detection of virus antigen in clinical specimens, as well as the detection of virus-specific IgG or IgA or IgM antibody. The technique makes use of a fluorescein- labelled antibody to stain specimens containing specific virus antigens, so that the stained cells fluoresces .**

**In the case of direct IF, the specimen is probed directly with a specific labelled antibody against a particular virus antigen.**

**In the case of indirect IF, the specimen is first probed with a non-labelled specific antibody, followed by a labelled antibody against the first antibody. Direct or indirect IF can be used for the detection of virus antigen, whereas indirect IF is virtually always used for the detection of antibody. Indirect IF possess the advantage of an extra amplification step for the signal, however, it requires an extra step in comparison to direct IF.**

## Detection of viral antigens

**Nasopharyngeal aspirates are the best specimens to use and is usually collected from babies less than 12 months old. A number of respiratory viruses can be detected by direct or indirect IF, including RSV, influenza A and B, adenoviruses and parainfluenza viruses. However, the sensitivities vary greatly between different viruses.**



**A typical indirect IF procedure for the detection of viral antigens is as follows;**

**-cells from the clinical specimen are immobilized onto individual wells on a slide. Specific polyclonal or monoclonal sera is then added to each well and the slide is incubated at 37oC for 30 to 60 minutes. The slide is then washed 3 times for 5 minutes each with PBS and fluorescein labelled antibody against the first antibody is added.**

**-The slide is further incubated at 37oC for 30 to 60 minutes and washed again. The slide is then prepared for microscopy. Specific monoclonal or polyclonal sera raised against the viral antigen can be used. Monoclonal sera offer the advantage of increased sensitivity and specificity. However, one must be certain that it can detect all the different strains of the virus. IF is highly dependent on the quality of the specimen. In many instances it has proved to be more sensitive than equivalent EIAs. This is because a firm diagnosis can be made on the identification of a few cells only that contain fluorescence of the right colour and with the correct antigen distribution.**

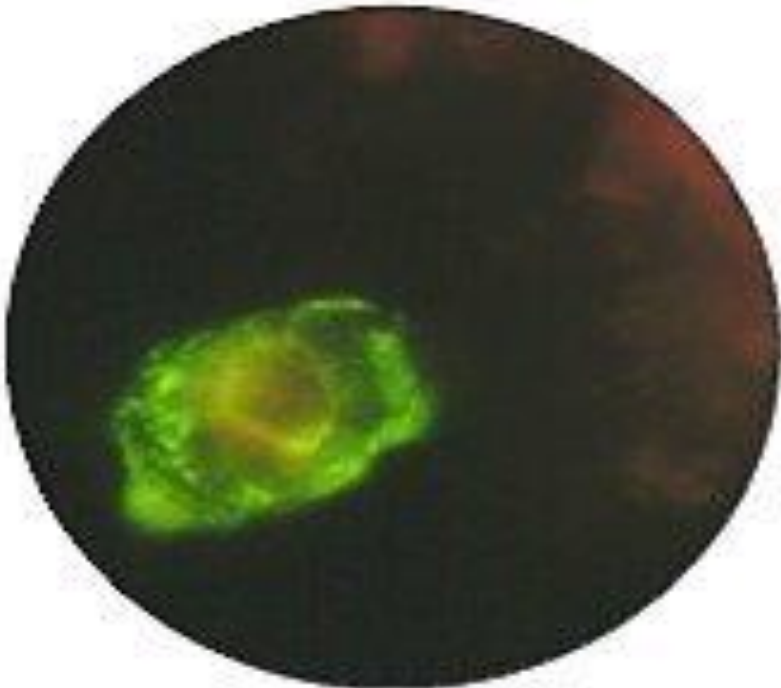


Fig. 3, HSV-infected epithelial cell from skin lesion (DFA)

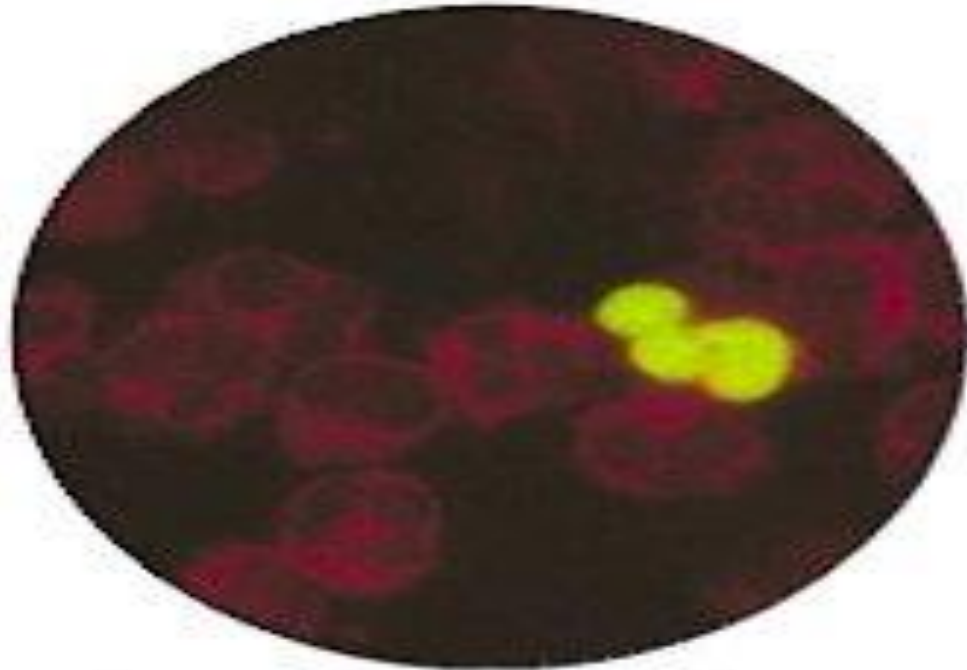


Figure 4 CMV pp65 antigens detected in nuclei of peripheral blood neutrophils

**Positive immunofluorescence tests of HSV antigen from epithelial cell and CMV pp65 antigen from peripheral blood neutrophils.**

**Detection of viral antibodies**

**IF is probably the simplest serological assay to set up. It simply requires virally infected cells that express viral antigens and a fluorescein-labelled antiserum against human immunoglobulin. IF can be used to detect IgG, IgM and IgA. IF is extensively used for the diagnosis of EBV infections .**

## **8. Neutralization**

**Neutralization of a virus is defined as the loss of infectivity through reaction of the virus with specific antibody. Virus and serum are mixed under appropriate condition and then inoculated into cell culture. The presence of unneutralized virus may be detected by reactions such as CPE. The loss of infectivity is brought about by interference by the bound Ab with any one of the steps leading to the release of the viral genome into the host cells.**

**Stable neutralization - with time, Ag-Ab complexes usually become more stable (several hours) . Such neutralization is generally produced by Ab molecules that establish contact with 2 antigenic sites on different monomers of a virion, greatly increasing the stability of the complexes. An example of stable neutralization is the neutralization of polioviruses, whereby, the attachment of the antibody to the viral capsid stabilizes the capsid and inhibits the uncoating and release of viral nucleic acid.**

**Viral evolution must tend to select for mutations that change the antigenic determinants involved in neutralization. In contrast, other antigenic sites would tend to remain unchanged because mutations affecting them would not be selected for and could even be detrimental. Because of its high immunological specificity, the neutralization test is often the standard against which the specificity of the other serological techniques is evaluated.**

**Before the neutralization test is carried out, the components that are to be used must be standardized.**

**To identify a virus isolate, a known pretitred antiserum is used.**

**Conversely, to measure the antibody response of an individual to a virus, a known pretitred virus is used.**

**To titrate a known virus, serial tenfold dilutions of the isolate is prepared and inoculated into a susceptible host system such as cell culture . The virus endpoint titre is the reciprocal of the highest dilution of virus that infects 50% of the host system eg. 50% of cell cultures develop CPE. This endpoint dilution contains one 50% tissue culture infecting dose (TCID<sub>50</sub>) or one 50% lethal dose (LD<sub>50</sub>) of virus per unit volume.**

**The concentration of virus generally used in the neutralization test is 100 TCID<sub>50</sub> or 100 LD<sub>50</sub> per unit volume.**

**The antiserum is titrated in the neutralization test against its homologous virus. Serial twofold dilutions of serum is prepared and mixed with an equal volume containing 100TCID<sub>50</sub> of virus. The virus and serum mixtures are incubated for 1 hour at 37oC. The time and temperature for incubation varies with different viruses. The mixtures are then inoculated into a susceptible host system.**

**The endpoint titration contains one antibody unit and is the reciprocal of the highest dilution of the antiserum protecting against the virus.**

**Generally 20-100 antibody units of antiserum is used in the neutralization**



Μια παραλλαγή της ανωτέρω τεχνικής είναι η αναστολή της αιμοσυγκόλλησης. Στην τεχνική αυτή επωάζονται πρώτα π.χ. το αντίσωμα έναντι του ιού της Γρίππης Α με τον ιό και εν συνεχεία προσθέτουμε τα ερυθρά ( χήνας ή κοτόπουλου) τα οποία προκαλούν αιμοσυγκόλληση. Στην περίπτωση αυτή η ποσότητα του αντισώματος που επωάσαμε δεσμεύει την αιμοσυγκολλητίνη του ιού και έτσι έχουμε αναστολή της αιμοσυγκόλλησης. Πρακτικά η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για την ανίχνευση στον ορό ασθενών αντισωμάτων έναντι του ιού της Γρίππης Α. Συνήθως χρησιμοποιούμε 4 αιμοσυγκολλητικές μονάδες του ιού τις οποίες έχουμε προσδιορίσει προηγουμένως με τον τρόπο που αναφέρεται ανωτέρω. Ως αιμοσυγκολλητική μονάδα ορίζεται η υψηλότερη αραίωση του ιού η οποία δίνει αιμοσυγκόλληση ( στο ανωτέρω παράδειγμα 1/32 ) οπότε οι 4 αιμοσυγκολλητικές μονάδες αντιστοιχούν στην αραίωση 1/8 του ιού.

**Πραγματοποιούμε διαδοχικές αραιώσεις του ορού του ασθενούς συνήθως από 1/8 μέχρι 1/1024 σε ρυθμιστικό διάλυμα και απ'ευθείας σε μικροπλάκες τιτλοποίησης των 96 δεξαμενών σχήματος V ή U . Προσθέτουμε εν συνεχεία 4 αιμοσυγκολλητικές μονάδες του ιού σε όλες τις δεξαμενές εκτός από την δεξαμενή στη θέση 1 η οποία θα αποτελέσει τον μάρτυρα ορού ( serum control ) και στην θέση 12 η οποία θα αποτελέσει τον μάρτυρα ερυθροκυττάρων. Οι οροί είναι πιθανόν να περιέχουν αναστολείς της αιμοσυγκόλλησης και γ'αυτό το λόγο τους επωάζουμε συνήθως στους 56 0C επί 30 λεπτά. Όπως επίσης επωάζουμε τον ορό με τα ερυθροκύτταρα πριν το τεστ έτσι ώστε ο ορός να απαλλαγεί από τις τυχόν μη ειδικές αιμοσυγκολλητίνες τις οποίες ενδεχομένως να περιέχει.**

**Η μικροπλάκα αφήνεται στη συνέχεια επί 60 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και εν συνεχεία προσθέτουμε 0,5% ερυθρά και επωάζουμε την μικροπλάκα επί 60 λεπτά στους +4 0C. Η μικροπλάκα είναι πλέον έτοιμη για ανάγνωση.**

**Στις θέσεις 1 και 12 της μικροπλάκας τα ερυθροκύτταρα θα καθιζάνουν στο βάθος της δεξαμενής. Στις θέσεις όπου τα αντισώματα θα έχουν εξουδετερώσει τον ιό θα έχουμε αναστολή της αιμοσυγκόλλησης . Ο τίτλος του αντισώματος κάθε ασθενούς εκφράζεται με την υψηλότερη αραιώση του ορού η οποία δίνει αναστολή της αιμοσυγκόλλησης . Στις θέσεις όπου θα παρατηρείται αιμοσυγκόλληση τα αντισώματα δεν θα είναι σε συγκέντρωση ικανή να δεσμεύσουν τον ιό.**

## Serology

Following exposure, the first antibody to appear is IgM, which is followed by a much higher titre of IgG. In cases of reinfection, the level of specific IgM either remain the same or rises slightly. But IgG shoots up rapidly and far more earlier than in a primary infection. Many different types of serological tests are available. With some assays such as EIA , one can look specifically for IgM or IgG, whereas with other assays such as CFT and HAI, one can only detect total antibody, which comprises mainly IgG. Newer techniques such as EIAs offer better sensitivity, specificity and reproducibility than classical techniques such as CFT and HAI. The sensitivity and specificity of the assays depend greatly on the antigen used.

Assays that use recombinant protein or synthetic peptide antigens tend to be more specific than those using whole or disrupted virus particles.

### Criteria for diagnosing Primary Infection

1. A significant rise in titre of IgG/total antibody between acute and convalescent sera

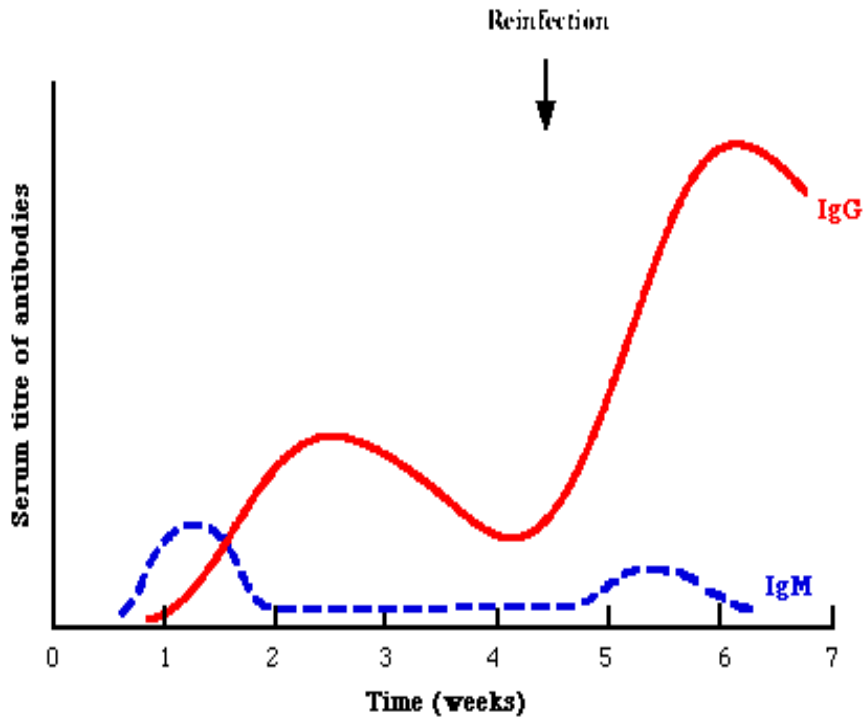
- however, a significant rise is very difficult to define and depends greatly on the assay used. In the case of CFT and HAI, it is normally taken as a four-fold or greater increase in titre.



**The main problem is that diagnosis is usually retrospective because by the time the convalescent serum is taken, the patient had probably recovered.**

- 1. Presence of IgM - EIA and IF are used for the detection of IgM. This offers a rapid means of diagnosis. However, there are many problems with IgM assays, such as interference by rheumatoid factor, re-infection by the virus, and unexplained persistence of IgM years after the primary infection.**
- 2. Seroconversion - this is defined as changing from a previously antibody negative state to a positive state e.g. seroconversion against HIV following a needle-stick injury, or against rubella following contact with a known case.**
- 3. A single high titre of IgG (or total antibody) - this is a very unreliable means of serological diagnosis since the cut-off is very difficult to define.**

Serological events following primary infection and reinfection. Note that in reinfection, IgM may be absent or only present transiently at a low level.



**Criteria for diagnosing re-infection/re-activation**  
It is often very difficult to differentiate re-infection/re-activation from a primary infection. Under most circumstances, it is not important to differentiate between a primary infection and re-infection. However, it is very important under certain situations, such as rubella infection in the first trimester of pregnancy: primary infection is associated with a high risk of fetal damage whereas re-infection is not. In general, a sharp large rise in antibody titres is found in re-infection whereas IgM is usually low or absent in cases of re-infection/re-activation.

## **Limitations of serological diagnosis**

**How useful a serological result is depends on the individual virus.**

**1. For viruses such as rubella and hepatitis A, the onset of clinical symptoms coincide with the development of antibodies. The detection of IgM or rising titres of IgG in the serum of the patient would indicate active disease.**

**2. However, many viruses often produce clinical disease before the appearance of antibodies such as diarrhoeal viruses. So in this case, any serological diagnosis would be retrospective and therefore will not be so useful.**

**3. There are also viruses which produce clinical disease months or years after seroconversion e.g. HIV and rabies. In the case of these viruses, the mere presence of antibody is sufficient to make a definitive diagnosis.**

**There are a number of problems associated with serology:**

**1. long length of time required for diagnosis for paired acute and convalescent sera**

**2. mild local infections such as HSV genitalis may not produce a detectable humoral immune response**

**3. Extensive antigenic cross-reactivity between related viruses e.g. HSV and VZV, may lead to false positive results**

**4. immunocompromised patients often give a reduced or absent humoral immune response**

## **Antibody in the CSF**

**In a healthy person, there should be little or no antibodies in the CSF. Where there is a viral meningitis or encephalitis, antibodies may be produced against the virus by lymphocytes in the CSF.**

**The finding of antibodies in the CSF is said to be significant when ratio between the titre of antibody in the serum and that in the CSF is less than 100.**

**But this does depend on an intact blood-brain barrier. The problem is that in many cases of meningitis and encephalitis, the blood-brain barrier is damaged, so that antibodies in the serum can actually leak across into the CSF.**

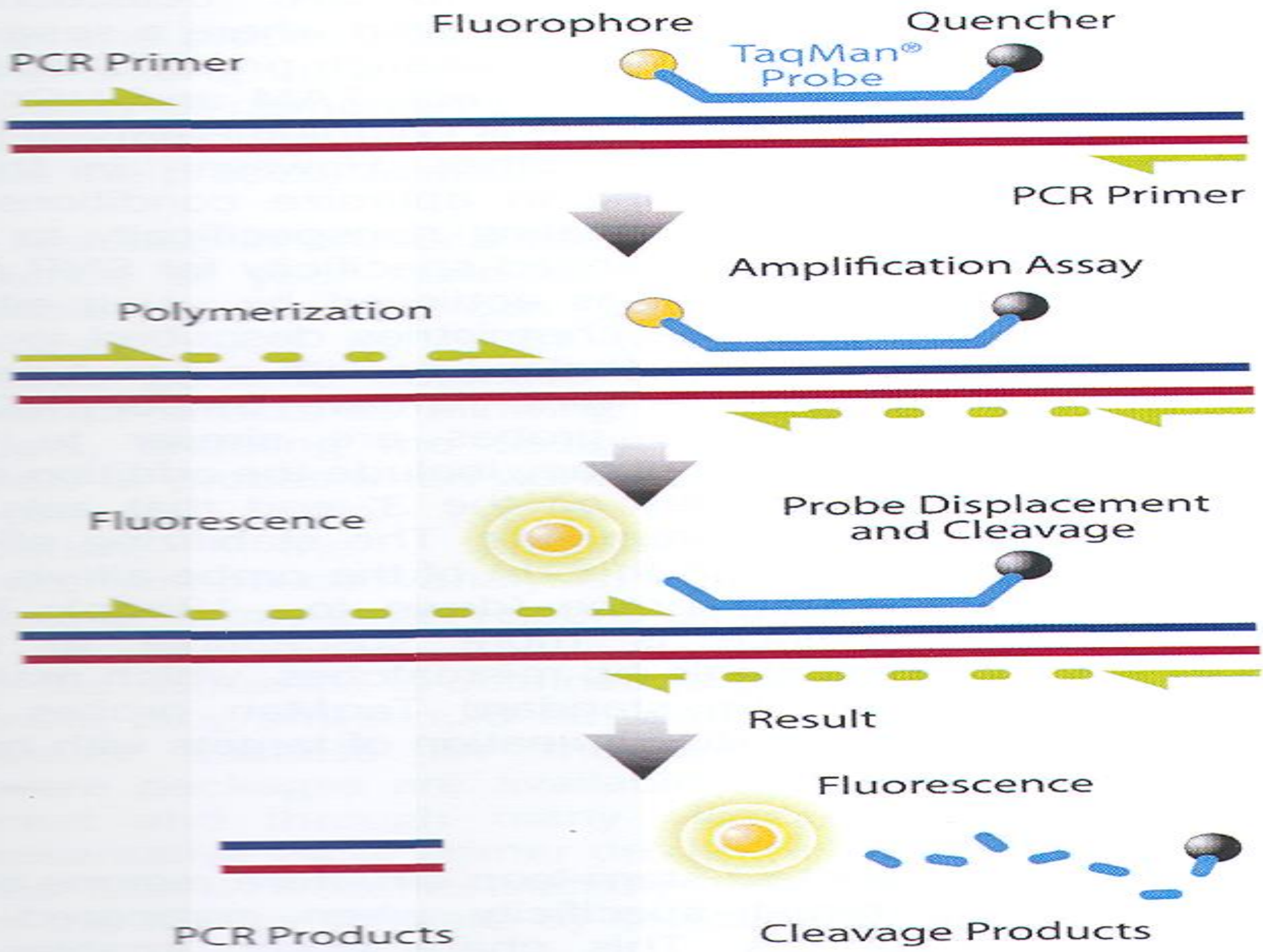
**This also happens where the lumbar puncture was traumatic in which case the spinal fluid would be bloodstained.**

**So really, one should really check the integrity of the blood-brain barrier before making a definite diagnosis.**

**One way to check the integrity of the blood brain barrier is to use a surrogate antibody that most individuals would have, such as measles virus, since most people would have been vaccinated.**

**If the blood-brain barrier is intact, there should be little or no measles antibodies in the CSF.**

# Real-Time PCR Method

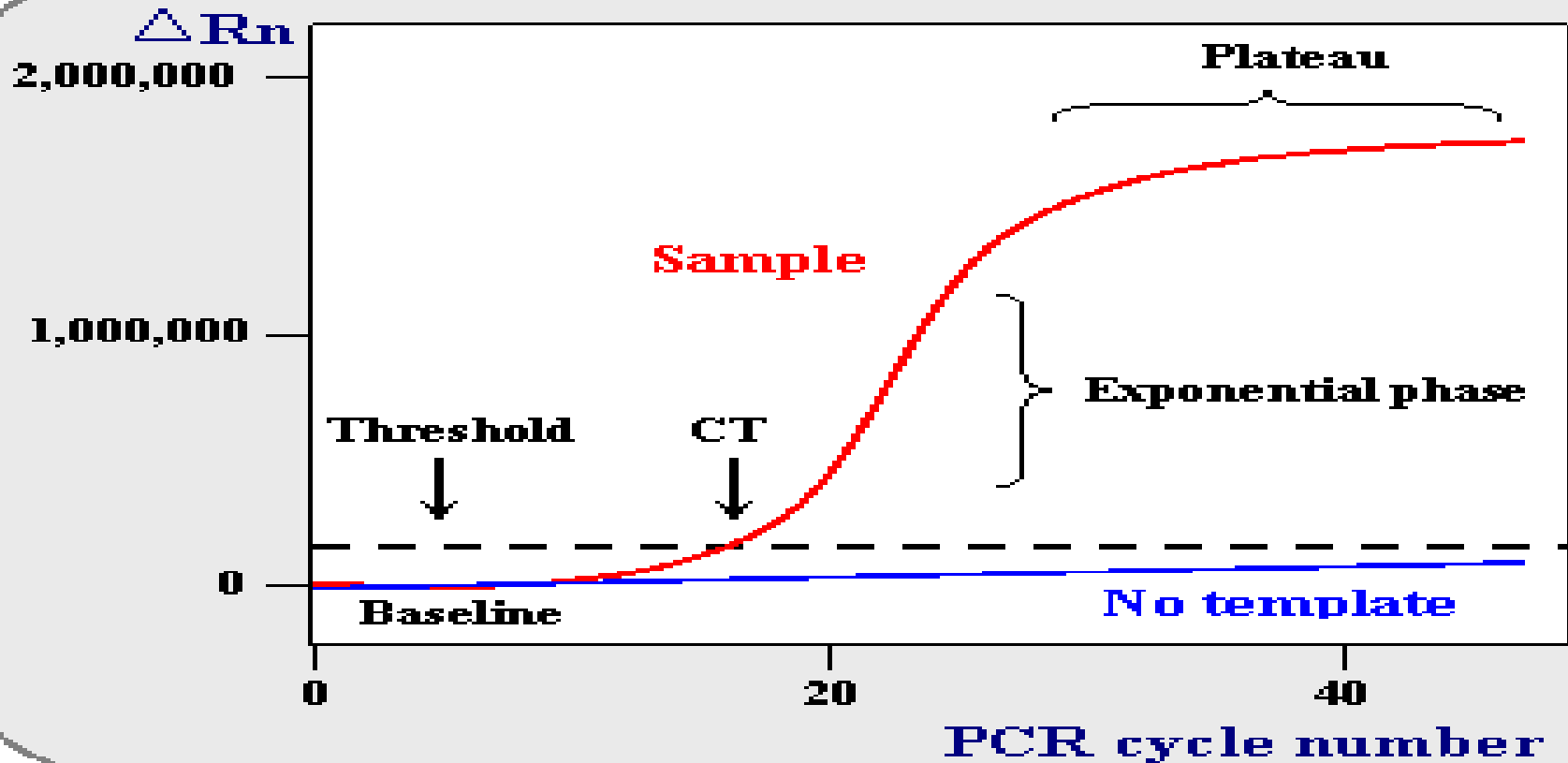


**TaqMan** assay (named after *Taq* [DNA polymerase](#)) was one of the earliest methods introduced for real time PCR reaction monitoring and has been widely adopted for both the quantification of mRNAs and for detecting variation. The method exploits the 5' endonuclease activity of *Taq* DNA polymerase to cleave an oligonucleotide probe during PCR, thereby generating a detectable signal. The probes are fluorescently labeled at their 5' end and are non-extendable at their 3' end by chemical modification.

Specificity is conferred at three levels: via two PCR primers and the probe.

**Applications of real time quantitative RT-PCR:** relative and absolute quantification of [gene expression](#), validation of DNA [microarray](#) results, [variation analysis](#), counting bacterial, viral, or fungal loads, etc.

## Model of real time quantitative PCR plot



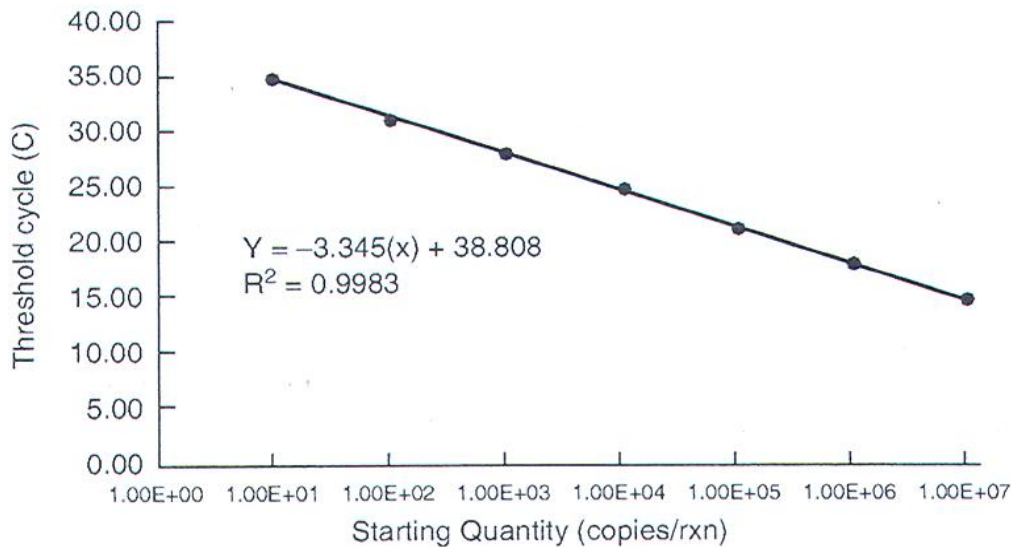
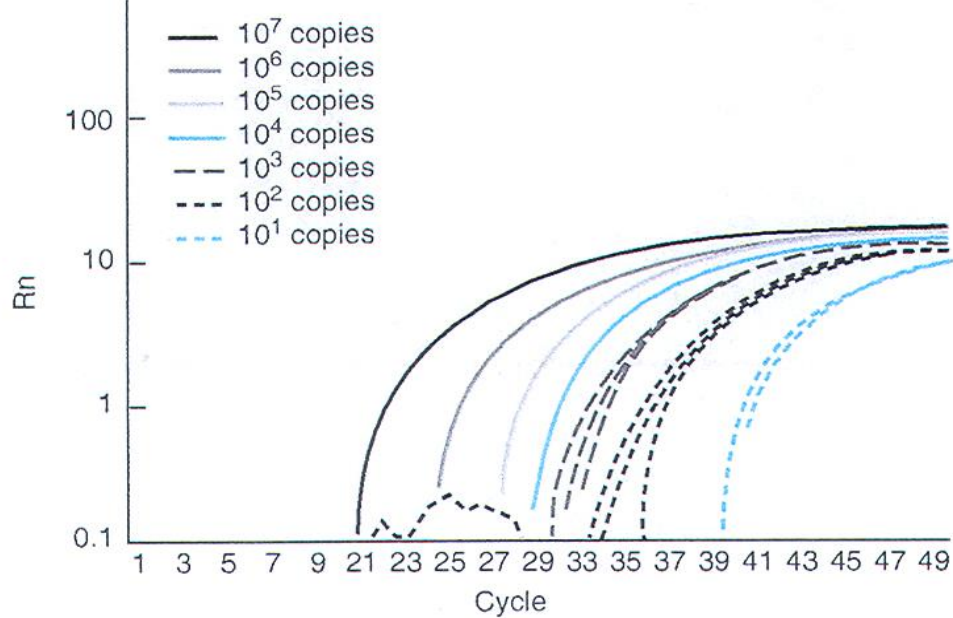
Nomenclature commonly used in real time quantitative PCR:  
**Baseline** is defined as PCR cycles in which a reporter fluorescent signal is accumulating but is beneath the limits of detection of the instrument.  
 $\Delta R_n$  is an increment of fluorescent signal at each time point. The  $\Delta R_n$  values are plotted versus the cycle number.



**Threshold** is an arbitrary level of fluorescence chosen on the basis of the baseline variability.

A signal that is detected above the threshold is considered a real signal that can be used to define the threshold cycle (Ct) for a sample. Threshold can be adjusted for each experiment so that it is in the region of exponential amplification across all plots.

**Ct** is defined as the fractional PCR cycle number at which the reporter fluorescence is greater than the threshold. The Ct is a basic principle of real time PCR and is an essential component in producing accurate and reproducible data.



■ **Figure 7-15** A plot of the accumulation of PCR product over 50 cycles of PCR (A) is a sigmoid curve. The generation of fluorescence occurs earlier with more starting template (solid lines) than with less (dotted lines). The cycle number at which fluorescence increases over a set amount, or fluorescence threshold, is inversely proportional to the amount of starting material.

**The more starting material, the fewer cycles are necessary to reach the fluorescence threshold. Samples that differ by a factor of 10 ( as in a 10-fold dilution series) would be about 3,3 cycles apart and the slope of the standard curve should be -3,3.**

The fluorogenic 5' nuclease assay is a convenient, self-contained process. The assay uses a fluorogenic probe consisting of an oligonucleotide to which a reporter dye and a quencher dye are attached. During PCR, the probe anneals to the target of interest between the forward and reverse primer sites. During extension, the probe is cleaved by the 5' nuclease activity of the DNA polymerase. This separates the reporter dye from the quencher dye, generating an increase in the reporter dye's fluorescence intensity. (See diagram.)

#### POLYMERIZATION



The reporter (R) and the quencher (Q) dyes are attached to the probe.

#### STRAND DISPLACEMENT



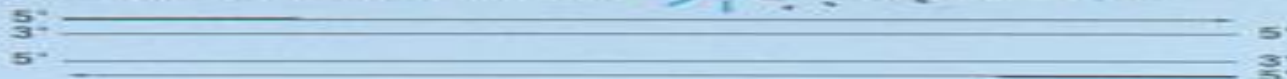
When both dyes are attached to the probe, reporter dye emission is quenched.

#### CLEAVAGE



During extension, DNA polymerase cleaves the reporter dye from the probe.

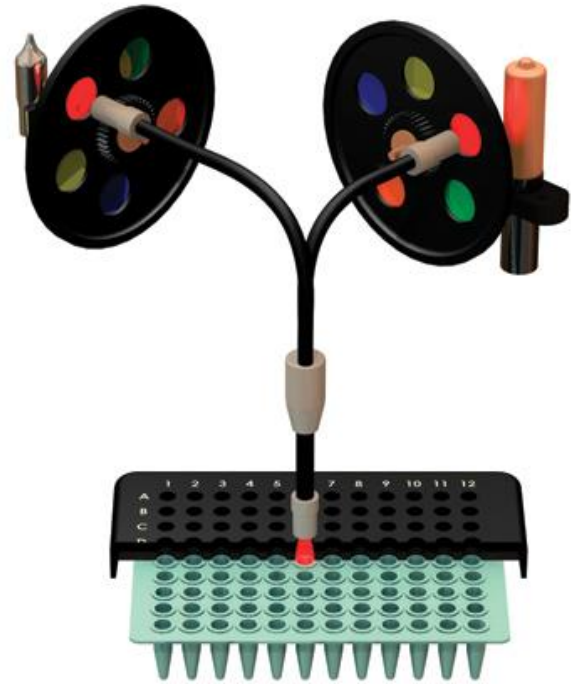
#### POLYMERIZATION COMPLETED



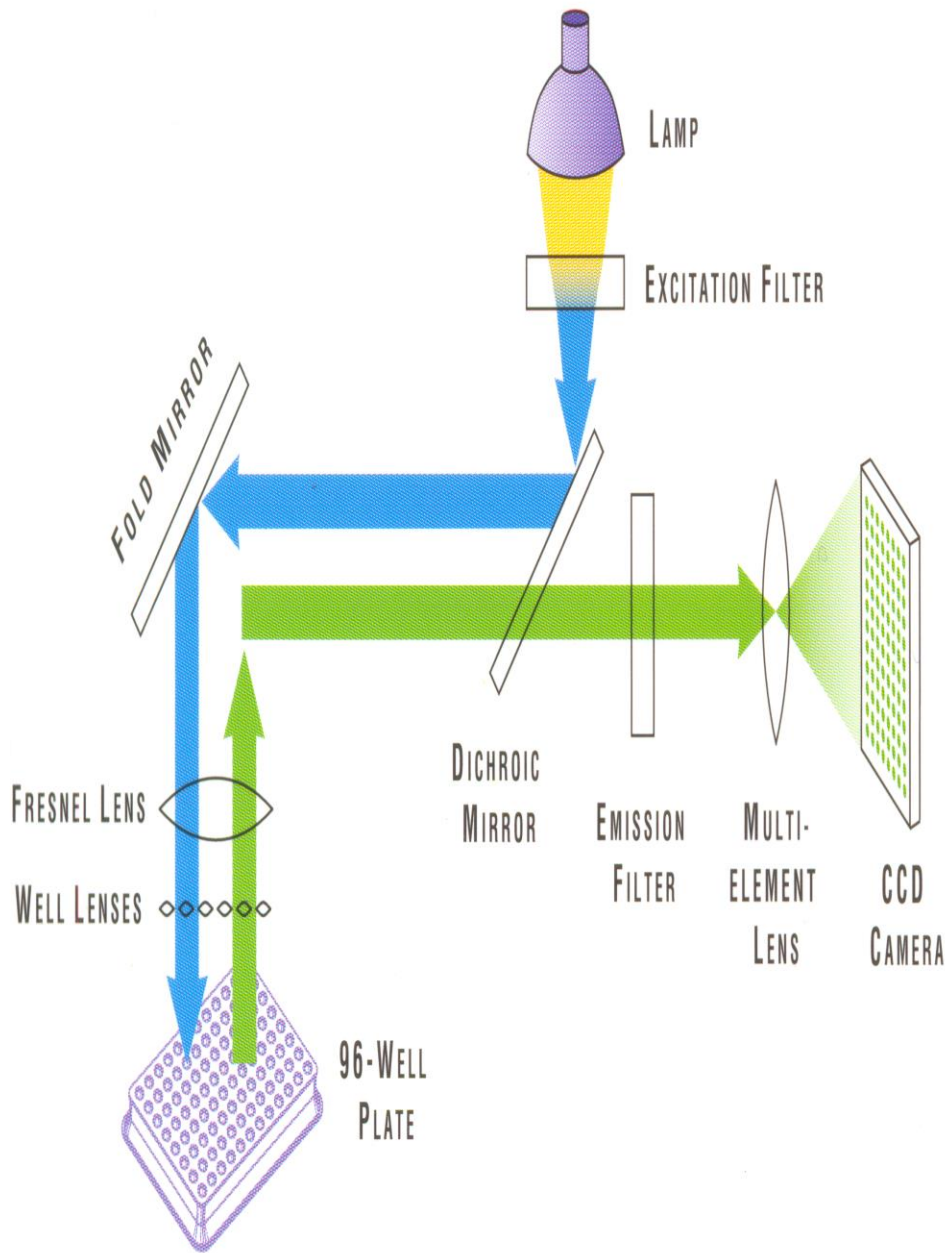
Once separated from the quencher, the reporter dye emits its characteristic fluorescence. The ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 and GeneAmp<sup>®</sup> 5700 Sequence Detection Systems measure the increase in the reporter dye's fluorescence during the thermal cycling of the PCR. This data is then used by the sequence detection software to generate quantitative results.

Ως μόρια ανταποκριτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι 4,7,2',4',5',7'-εξαχλωρο-6-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (HEX), οι 4,7,2',7'-τετραχλωρο-6-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (TET) ή 6-καρβοξυφλουορεσκεΐνη (FAM), ενώ ως μόριο αποσβέστης μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ροδαμίνη ανάλογα με τα φίλτρα διέγερσης και εκπομπής που διαθέτει η συσκευή ποσοτικής PCR.

Filter Set	Excitation Wavelength	Emission Wavelength
Alexa Fluor® 350	350	440
FAM™/SYBR® Green	492	516
TET™	517	538
HEX™/JOE™/VIC™	535	555
Cy™3	545	568
TAMRA™	556	580
ROX™/Texas Red®	585	610
Cy™5	635	665
FR 640	492	635
FR ROX™	492	610
FR Cy™5	492	665



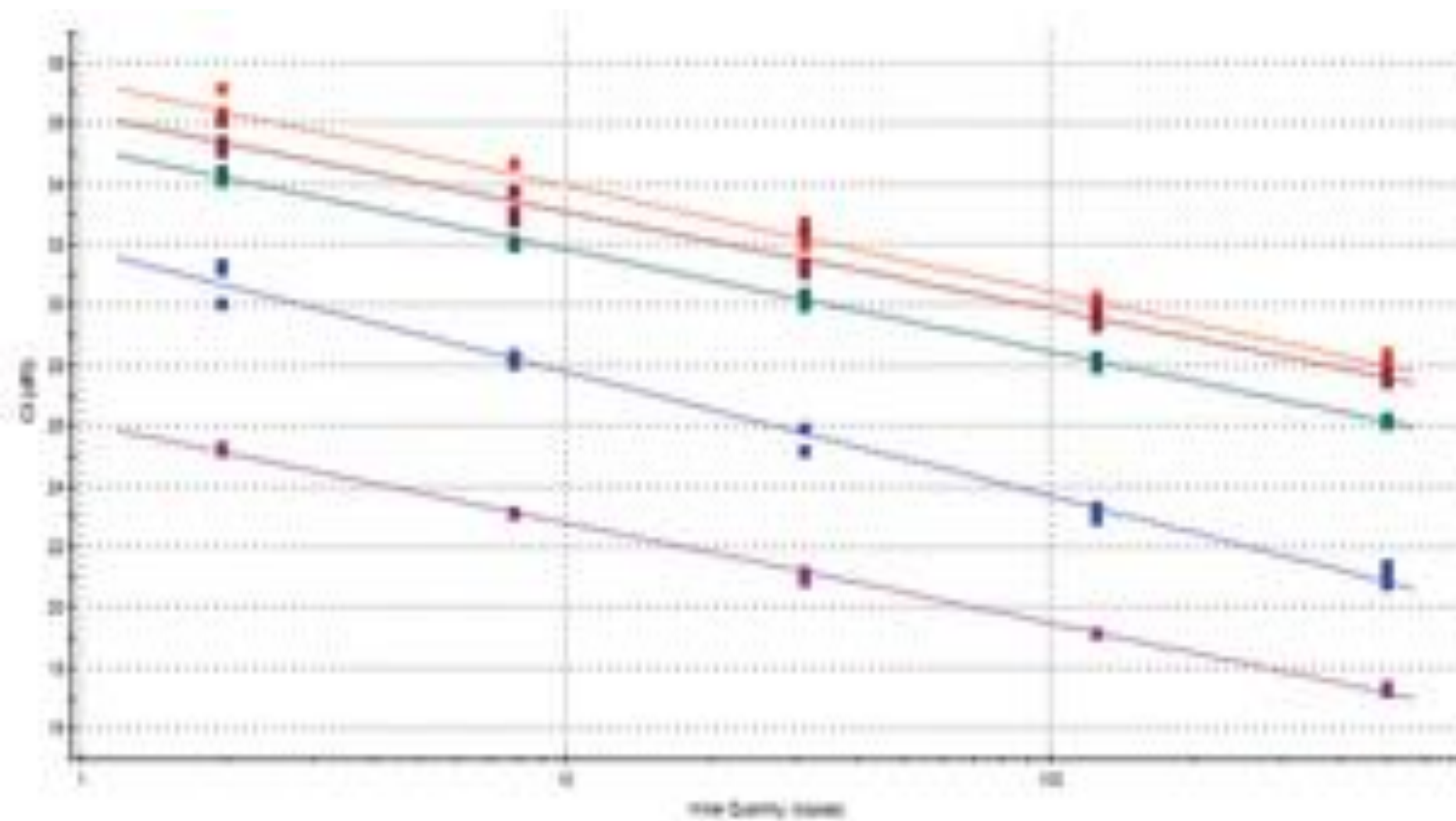
**ΣΥΣΚΕΥΗ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ PCR 96 ΘΕΣΕΩΝ Η ΟΠΟΙΑ ΔΙΑΘΕΤΕΙ ΦΩΤΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟ ΕΧΟΝΤΑΣ ΤΗΝ ΔΥΝΑΤΟΤΗΤΑ ΝΑ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΕΙ ΤΗΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΣΕ ΚΑΘΕ ΦΡΕΑΤΙΟ/ΑΝΑ ΚΥΚΛΟ , ΝΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΓΡΑΨΕΙ ΚΑΙ ΜΑΛΙΣΤΑ ΔΥΝΑΤΑΙ ΝΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΕΙ ΜΕΧΡΙ ΚΑΙ 5 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΔΗΛ. ΝΑ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙ ΑΝΑ ΦΡΕΑΤΙΟ ΜΕΧΡΙ ΚΑΙ 5 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ PCR ( MULTIPLEX QUANTITATIVE PCR )**



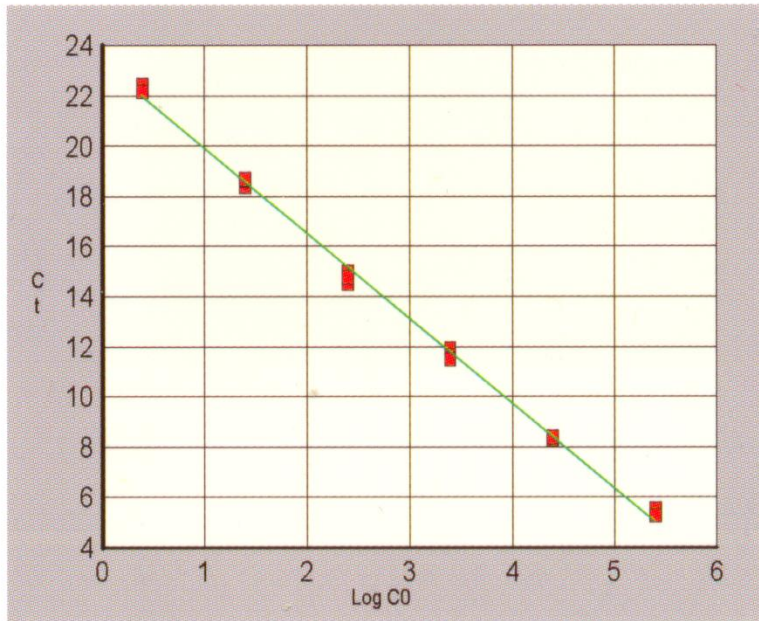
The GeneAmp® 5700 system accurately monitors the fluorescence emission (530-590 nm) from all 96 sample wells after each cycle using precision optics and a CCD camera. The CCD camera collects the fluorescence intensity from all 96 wells in parallel and transfers the information to a computer for analysis. The software monitors the data throughout the PCR at every cycle and generates an amplification plot for each reaction.

**ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ STANDARDS ΓΝΩΣΤΩΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ DNA ΣΤΟΧΟΥ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΖΕΤΑΙ Η ΠΡΟΤΥΠΗ ΚΑΜΠΥΛΗ ΣΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΑΝΑΦΕΡΟΜΑΣΤΕ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΑΝΤΙΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ ΠΡΟΣ ΕΞΕΤΑΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ**

**ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΚΑΜΠΥΛΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ 5 ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΧΡΩΣΤΙΚΕΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΦΡΕΑΤΙΟ ( MULTIPLEX QUANTITATIVE PCR )**



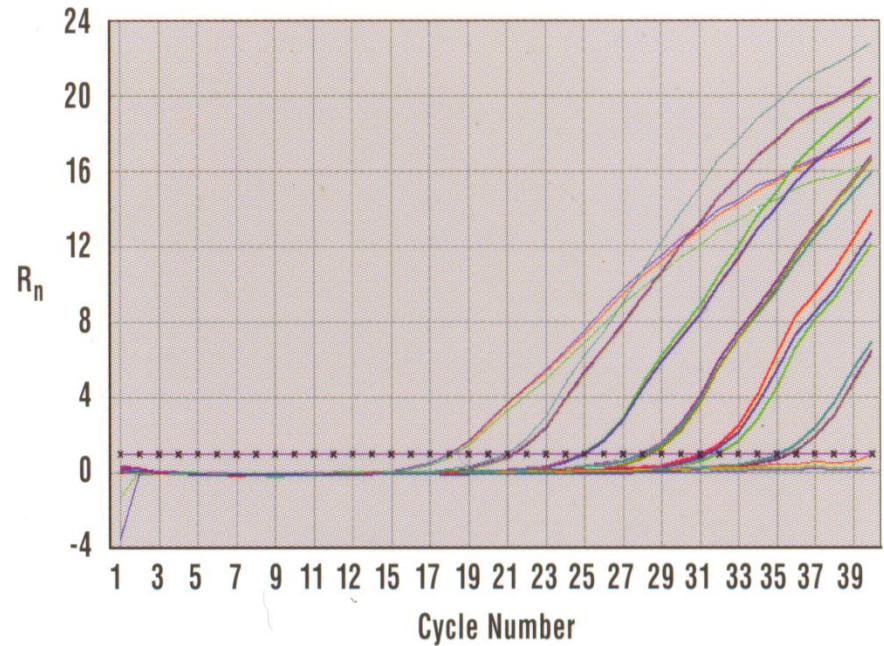
### Standard Curve



Room to grow: Amplification plots (right) from PCRs of several serial dilutions of samples with known starting copy number are used to generate a standard curve (above). This provides at least five orders of linear dynamic range for both DNA and RNA samples.

**Multiple chemistries offer versatile assay development**

### DNA Target Amplification Plot



These amplification plots show real-time, cycle-to-cycle increases in signal from three replicates of  $\beta$ -actin at different starting copy numbers: 1,000; 2,000; 5,000; 10,000; and 20,000. The software calculates the threshold cycle ( $C_t$ ) where the amplification plot crosses a defined fluorescence threshold. The overlapping plots at the threshold demonstrate the precision of the 5700 system.



The incorporation of SYBR Green 1 dye into a real-time PCR reaction allows the detection of any double-stranded DNA generated during PCR. This provides great flexibility because no target specific probes are required, however both specific and non-specific products will generate signal. The use of the hot-start enzyme AmpliTaq Gold DNA Polymerase in all SYBR Green 1 reagent kits allows the highest performance available by minimizing non-specific product formation. SYBR Green 1 assays are ideal for use in target identification (screening assays), or when only a small number of reactions are required for a given assay.

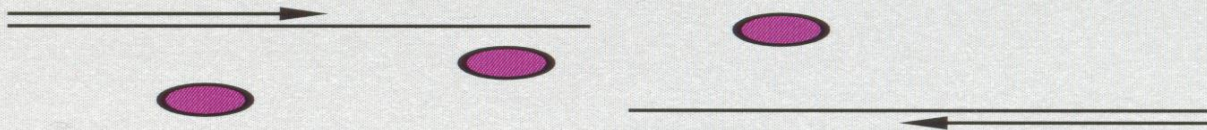
### SYBR Green 1 assay



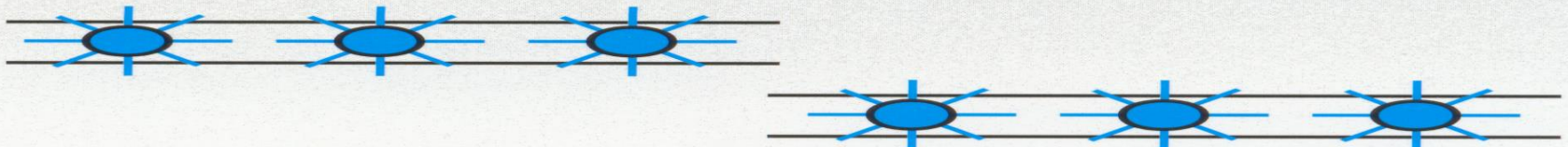
SYBR Green 1 dye fluoresces when bound to double-stranded DNA.



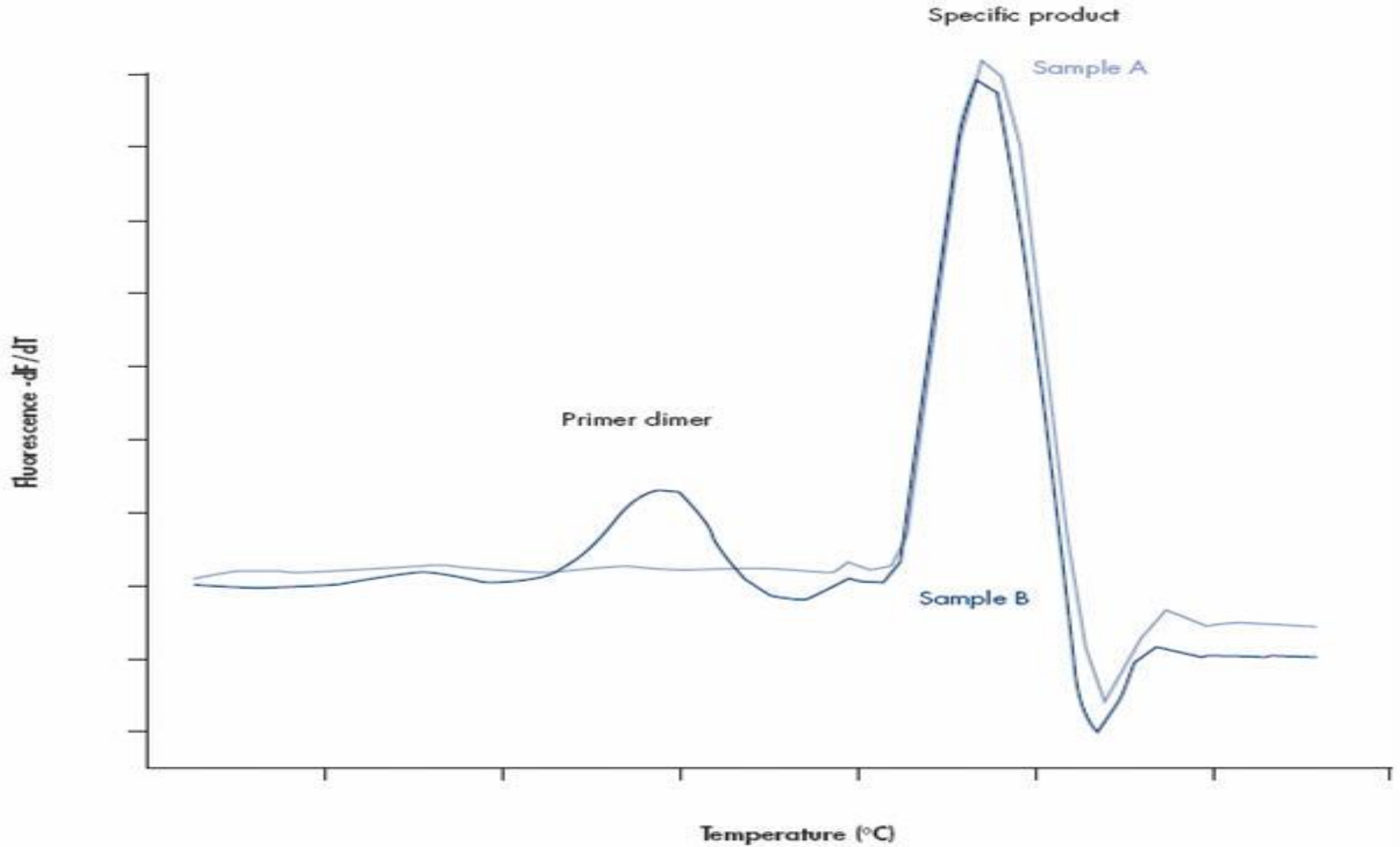
When DNA is denatured, the SYBR Green 1 dye is released and fluorescence is drastically reduced.



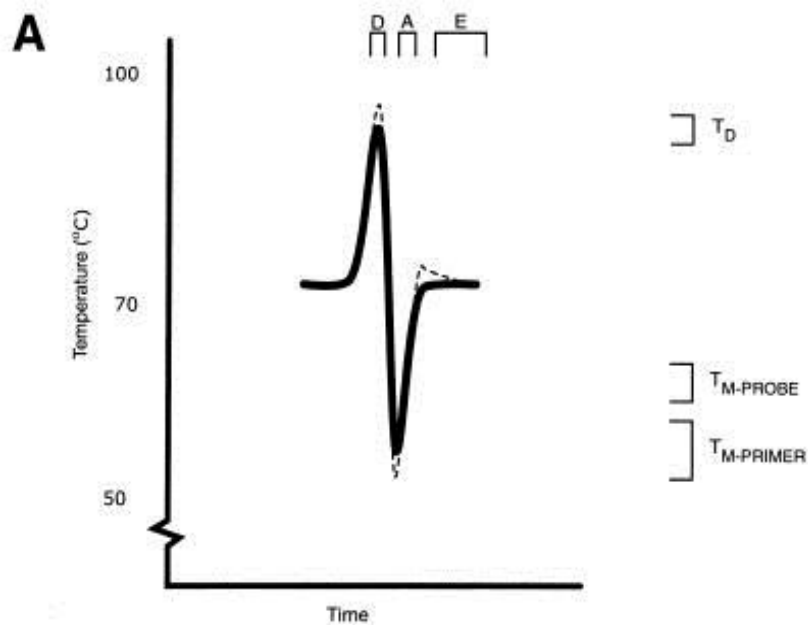
During extension phase, primers anneal and PCR product is generated.



Polymerization is complete and SYBR Green 1 dye binds, resulting in a net increase in fluorescence.

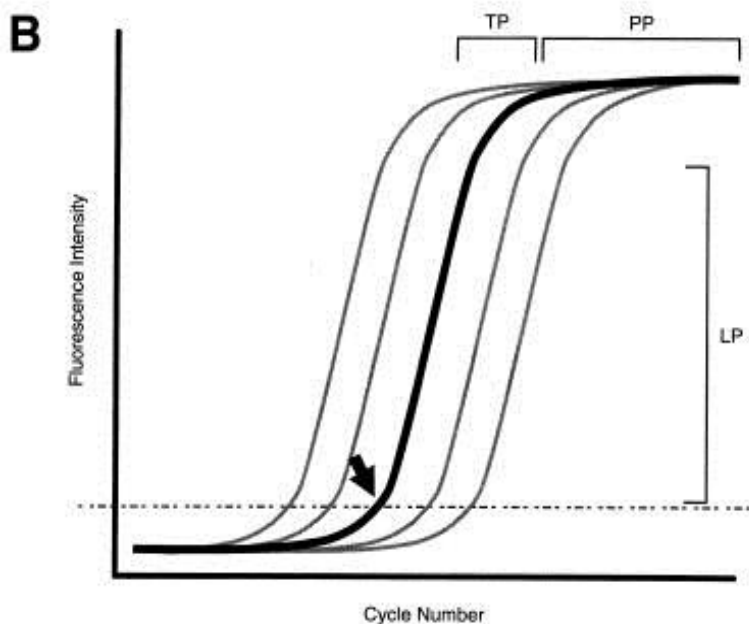


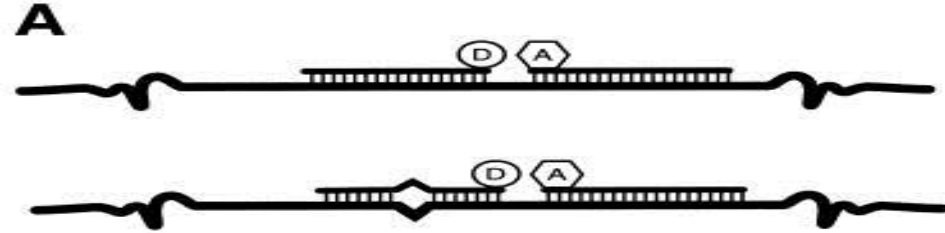
***Sample A yields only 1 peak resulting from the specific amplification product (primer-dimers not coamplified). Sample B shows a peak from the specific product and a peak at a lower temperature from amplification of primer-dimers.***



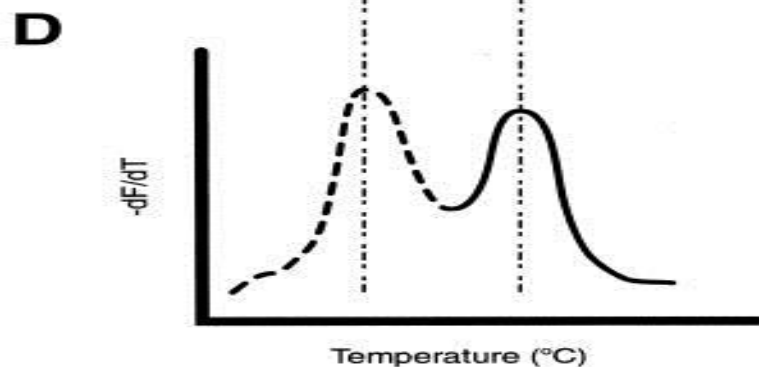
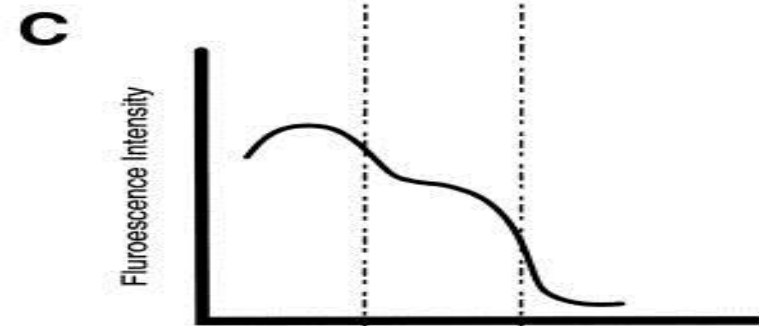
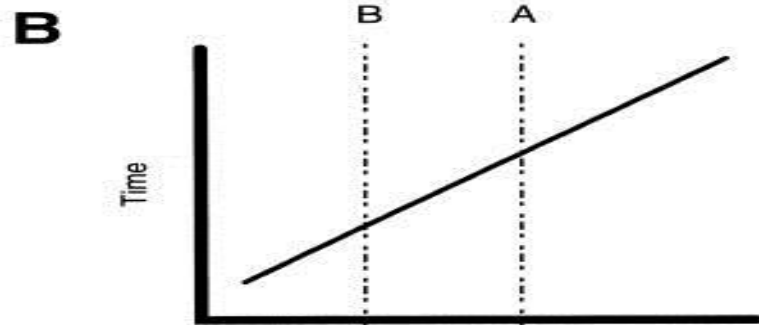
**Kinetic amplification. (A)** An idealised plot of temperature versus time during a single PCR cycle comprised of the denaturation (D), primer and probe annealing (A) and primer extension (E) steps. At the indicated optimal temperature ranges, dsDNA is denatured ( $T_D$ ), oligoprobes anneal ( $T_{M-PROBE}$ ) and finally the primers anneal as a precursor to their extension ( $T_{M-PRIMER}$ ).

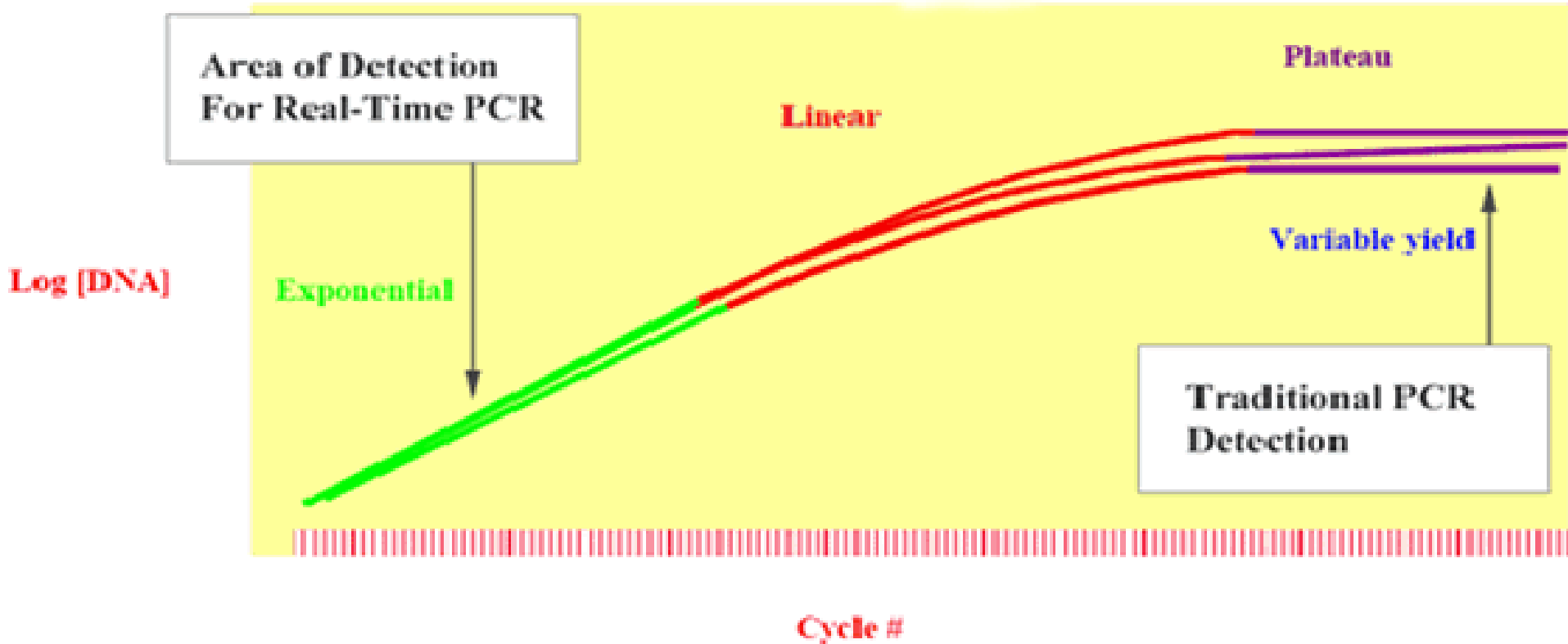
**(B)** The ideal amplification curve of a real-time PCR (bold), when plotted as fluorescence intensity against the cycle number, is a typical sigmoidal growth curve. Early amplification cannot be viewed because the detection signal is indistinguishable from the background. However, when enough amplicon is present, the assay's exponential progress can be monitored as the rate of amplification enters a log-linear phase (LP). Under ideal conditions, the amount of amplicon increases at a rate of approximately one log<sub>10</sub> every 3,32 cycles. As primers and enzyme become limiting and products inhibitory to the PCR accumulate, the reaction slows, entering a transition phase (TP), eventually reaching the plateau phase (PP) where there is little or no further increase in product yield. The point at which the fluorescence passes from insignificant levels to clearly detectable is called the threshold cycle (CT; indicated by an arrow), and this value is used in the calculation of template quantity during quantitative real-time PCR. Also shown are curves representing an optimal titration of template (grey), consisting of higher and lower starting template concentrations, which produce lower or higher CT values, respectively. Data for the construction of a standard curve are taken from the LP, which subsequently allows the concentration of unknown samples to be determined.





**A** Fluorescent melting curve analysis. At the completion of a real-time PCR using a pair of adjacent oligoprobes, the reaction can be cooled to a temperature below the expected  $T_M$  of the oligoprobes then heated above  $85^\circ\text{C}$  at a fraction of a degree per second (B). During heating, the emissions of the acceptor can be constantly acquired (C). Software calculates the negative derivative of the fluorescence over time, producing clear peaks that indicate the  $T_M$  of the oligoprobe-target melting transition (D). When one or more mutations are present under one or both oligoprobes (A), this  $T_M$  is shifted and this shift can be used diagnostically to discriminate single nucleotide polymorphisms in the template. Ideally, one of the oligoprobes, the anchor, is designed to bind to a stable sequence region, whereas the other, sensor, will span the mismatch. Mismatches near the centre of the probe and flanked by G:C pairs are more destabilising than mismatches near the ends of the oligoprobe flanked by A:T pairs.



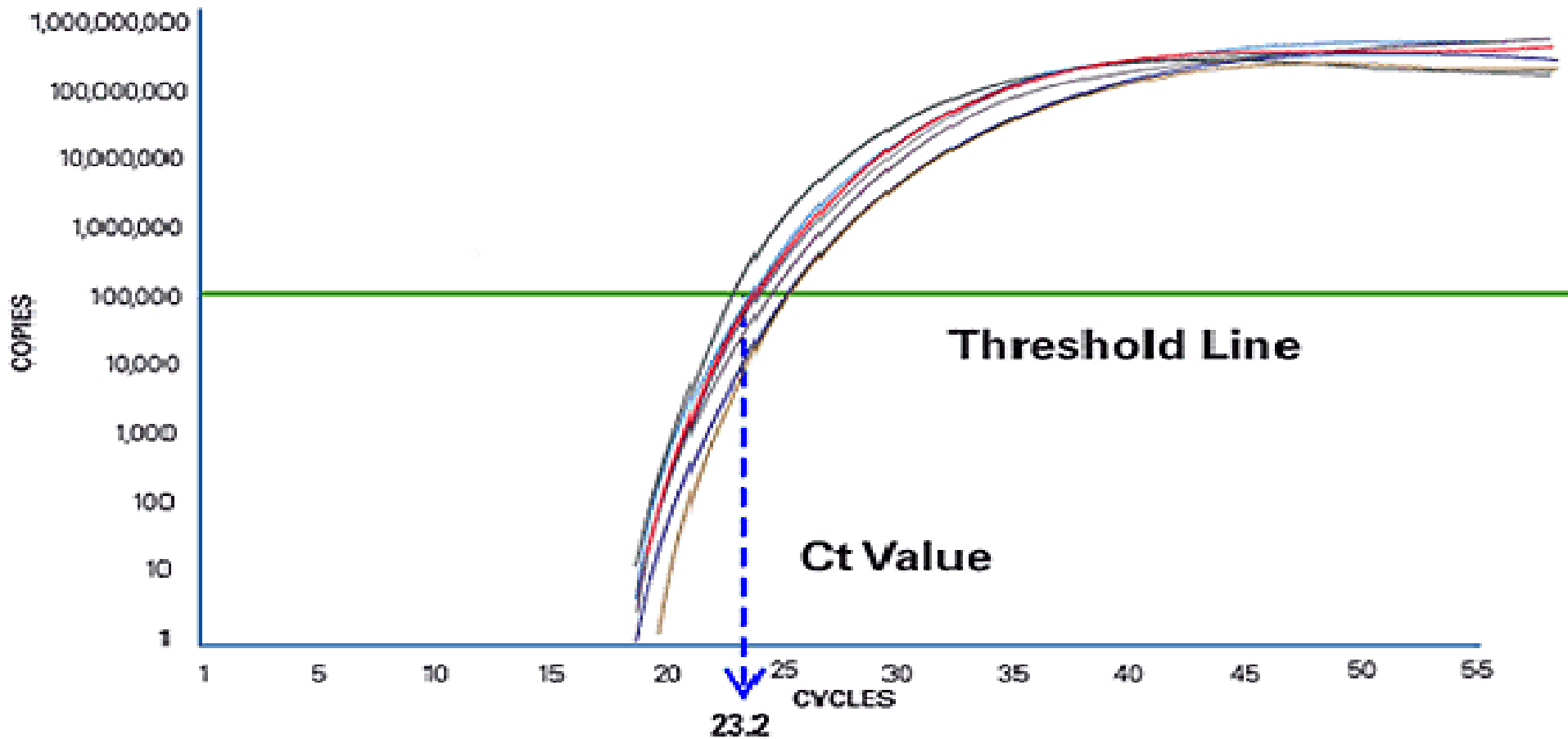


**Plateau end point : gel detection for traditional methods. No more products are made and if left long enough the PCR products may begin to degrade. Each tube will plateau at a different point, due to the different reaction kinetics for each sample.**

**These differences can be seen in the plateau phase.**

**Three replicates samples, which have same amount of DNA in the beginning of the reaction , have different quantities of PCR product at the plateau phase of the reaction due to variations in reactions kinetics.**

**Therefore it is more precise to take measurements during the exponential phase, where samples are amplifying exponentially.**



**Within the exponential phase, the real-time PCR instrument calculates two values. The threshold line is the level of detection at which a reaction reaches a fluorescent intensity above background.**

**The PCR cycle at which the sample reaches this level is called the Cycle Threshold, Ct.**

**By comparing the Ct values of samples of unknown concentration with a series of standards, the amount of template DNA in an unknown reaction can be accurately determined.**

# Real-Time PCR Method

Real-time PCR is able to detect sequence-specific PCR products as they accumulate in "real-time" during the PCR amplification process. As the PCR product of interest is produced, real-time PCR can detect their accumulation and quantify the number of substrates present in the initial PCR mixture before amplification began.

There are a few different variations of the procedure, but the one illustrated here is called molecular beacon <[www.molecular-beacons.org/](http://www.molecular-beacons.org/)>. Molecular beacons are short segments of single-stranded DNA (Figure 1).

The sequence of each molecular beacon must be customized to detect the PCR product of interest. In figure one, you can see there are nine bases on one end of the molecular beacon that can base pair with nine bases on the other end of the beacon. This complementation permits the molecular beacon to form a hairpin structure. The loop portion of the molecular beacon is composed of bases (shown as pink lines) that are complementary to one strand of the PCR product the investigator wants to detect and quantify.

Attached to opposite ends of the beacon are a fluorescent reporter dye and a quencher dye. When the molecular beacon is in the hairpin conformation, any fluorescence emitted by the reporter is absorbed by the quencher dye and no fluorescence is detected.

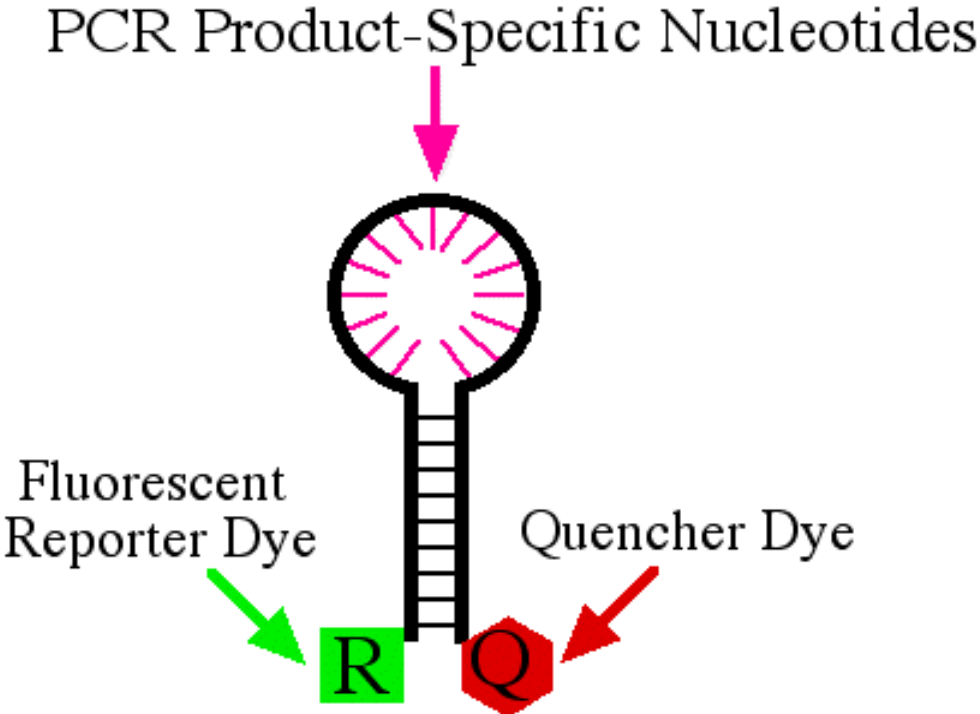


Figure 1. Diagram of molecular beacon. This beacon is 33 nucleotides long with a reporter dye attached to the 5' end and a quencher attached to the 3' end. The nine 5' bases are able to form base pairs with the nine 3' bases which brings the reporter and quencher in very close proximity. Therefore, when the reporter is excited by the appropriate light, its emission is absorbed by the quencher and no fluorescence is detected. The pink lines represent nucleotides that can form base pairs with the PCR product under investigation

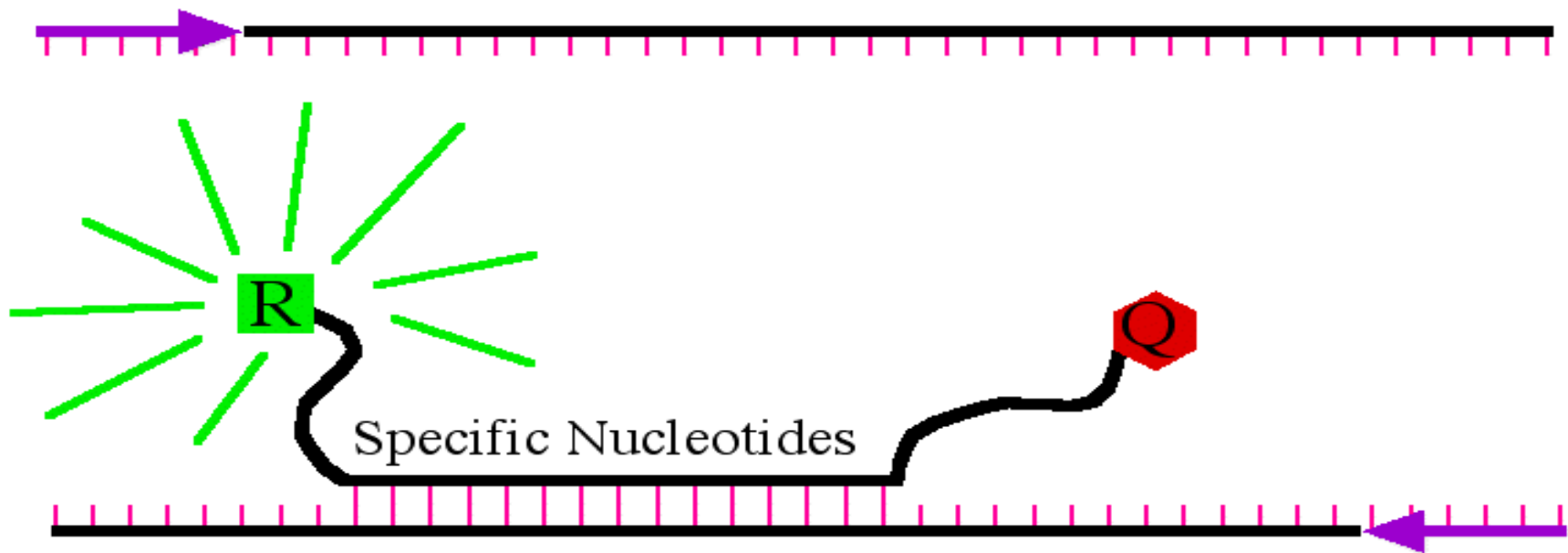


The PCR portion of real-time PCR is standard. Two PCR primers are used to amplify a segment of DNA (Figure 2).



Figure 2. PCR product of interest. The two primers are shown as purple arrows and the base pairing between the two strands is shown in pink.

As the PCR continues, the newly synthesized PCR products are denatured by high temperatures. As each strand of the product is separated, the molecular beacon is also denatured so the hairpin structure is disrupted. As the temperatures cool for the next round of primer annealing, the molecular beacon is capable of forming base pairs with the appropriate strand of the PCR product (Figure 3). Any molecular beacons that do not bind to PCR product reform the hairpin structures and thus are unable to fluoresce. However, molecular beacons that bind to PCR product remove the ability for the quencher to block fluorescence from the reporter dye. Therefore, as PCR product accumulates, there is a linear increase in fluorescence.



**Figure 3. Detection of PCR product by molecular beacon. When the beacon binds to the PCR product, it is able to fluoresce when excited by the appropriate wavelength of light. The amount of fluorescence is directly proportional to the amount of PCR product amplified. Real-time PCR can be performed in a "multiplex" format which means that more than one PCR product can be detected in a single reaction tube. For each sequence, there is a unique color of fluorescent dye and therefore, each PCR product is associated with its own color which is detected by the real-time PCR machine.**

## **Other Amplification Techniques**

**Following the heels of PCR, a number of alternative in-vitro amplification techniques have been developed, of which some are now available commercially. Examples of these alternative techniques include ligase chain reaction (LCR), nucleic acid sequence based amplification/isothermal amplification (NASBA), and branched DNA probes. Of these techniques, LCR, NASBA and branched DNA are now available commercially in an automated format.**

***With the exception of the branched DNA probe, all these techniques involve exponential amplification of either the target nucleic acid or the probe.***

**Therefore, they are all as susceptible to contamination as PCR.**

**The branched DNA system is really an intermediate between classical hybridization techniques and the newer in-vitro amplification techniques. It is not as sensitive as those techniques which involve exponential amplification but is considerably more sensitive than the classical hybridization techniques. Below is a brief summary of the features of the different amplification methods available**

## Ligase Chain Reaction

Also called ligase amplification reaction, LCR is a target amplification technique that was first described in 1989 (183) (Fig. 5). Successful ligation relies on contiguous positioning and correct base pairing of the 3' and 5' ends of oligonucleotide probes on a target DNA molecule. In this process, probes are annealed to template molecules in a head-to-tail fashion, with the 3' end of one probe abutting the 5' end of the second. DNA ligase then joins the adjacent

3' and 5' ends to form a duplicate of the target sequence. A second primer set, complementary to the first, then uses this duplicated strand (as well as the original target) as a template for ligation. Repeating the process results in exponential accumulation of ligation products, which can be detected via functional groups attached to the probes (143). Ligation-based methods were further simplified through the use of thermostable DNA ligase (6), allowing only a single addition of enzyme at the beginning of a reaction. When used in conjunction with a second amplifica-

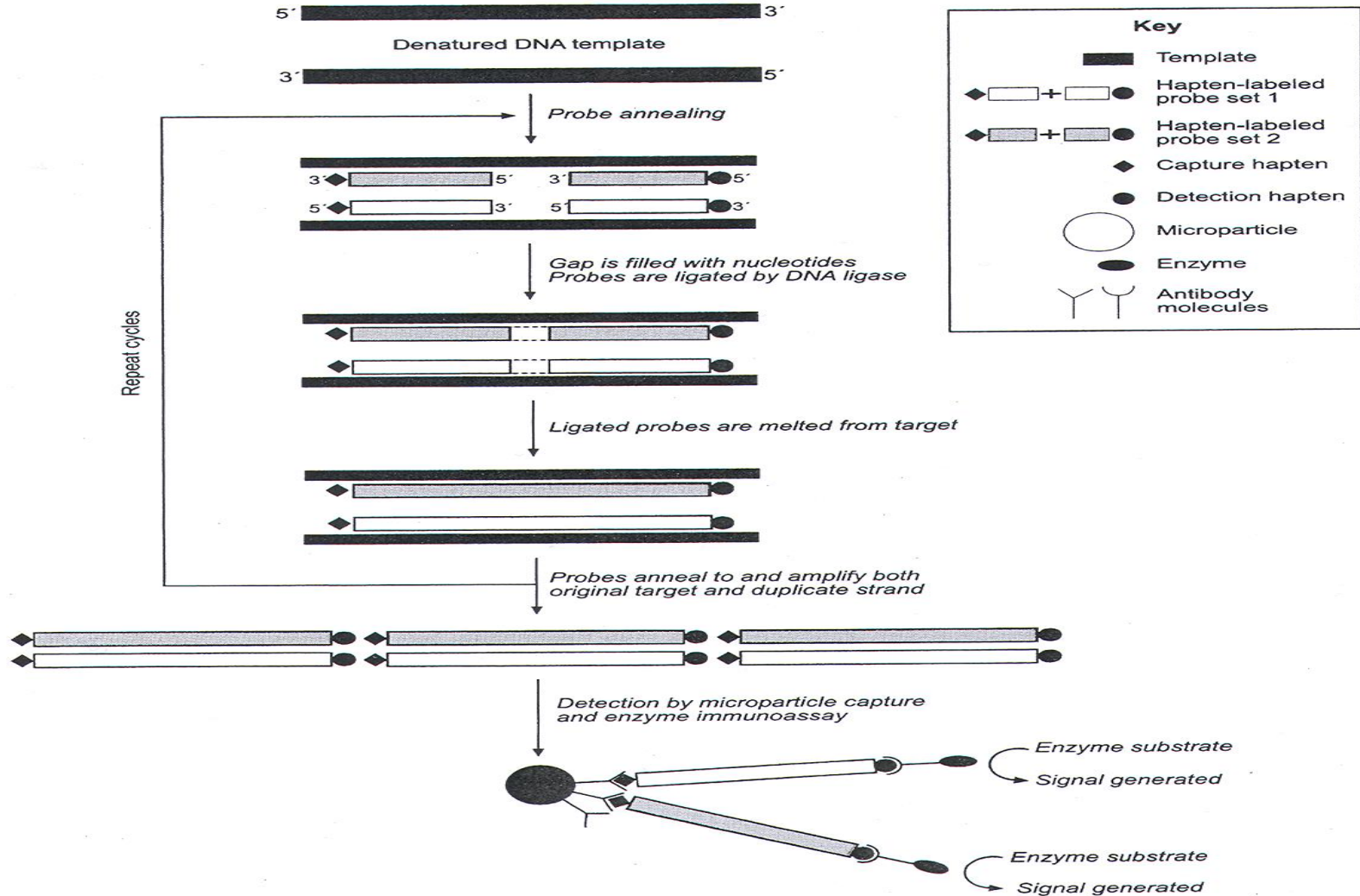
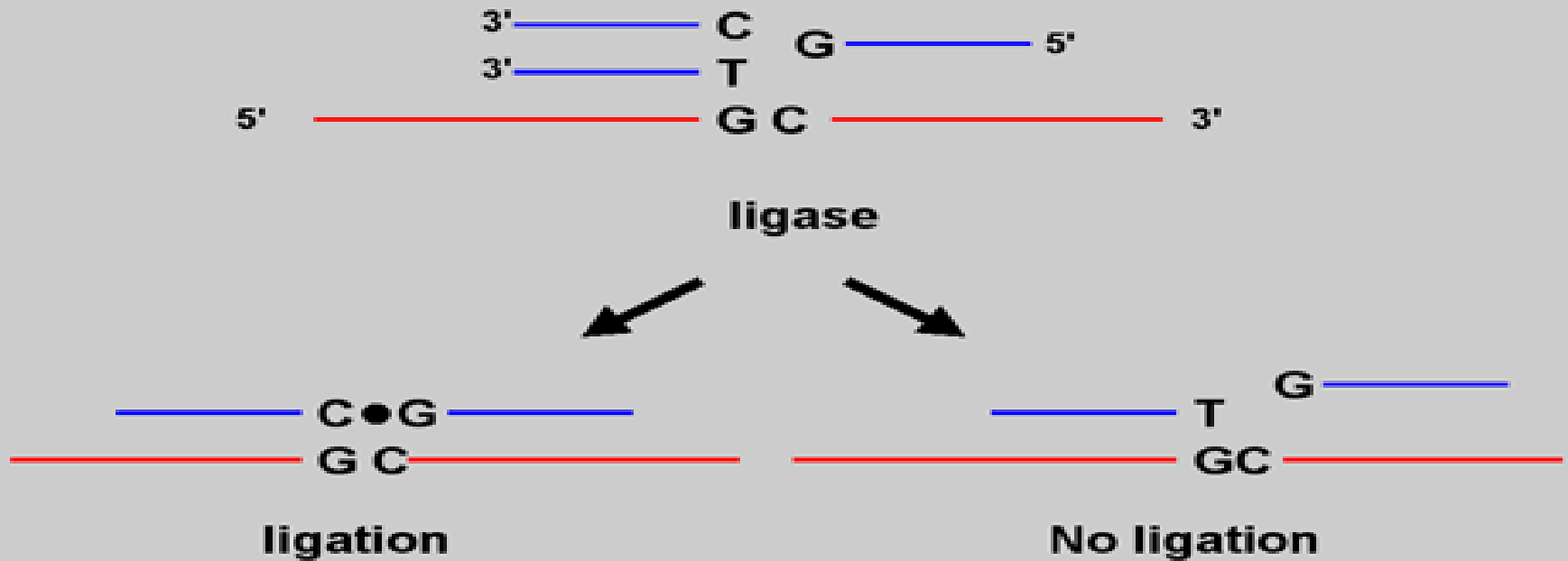


Figure 5. Scheme for LCR. Reprinted with permission (181).

**tion method, such as PCR ,LCR can be highly sensitive and is useful for the detection of point mutations.**

**So LCR is useful for the detection of mutations which are frequent in HIV . It depends on the ability of a thermostable DNA ligase to seal nicked double stranded DNA.**

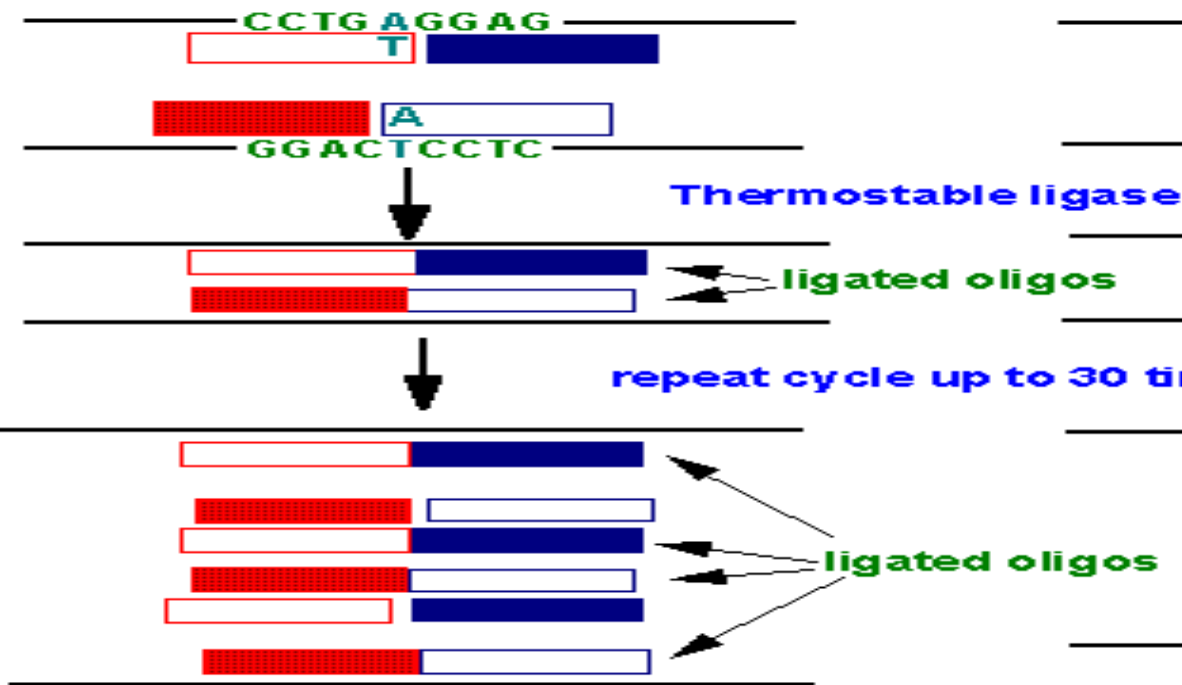
## LIGASE DETECTION REACTION



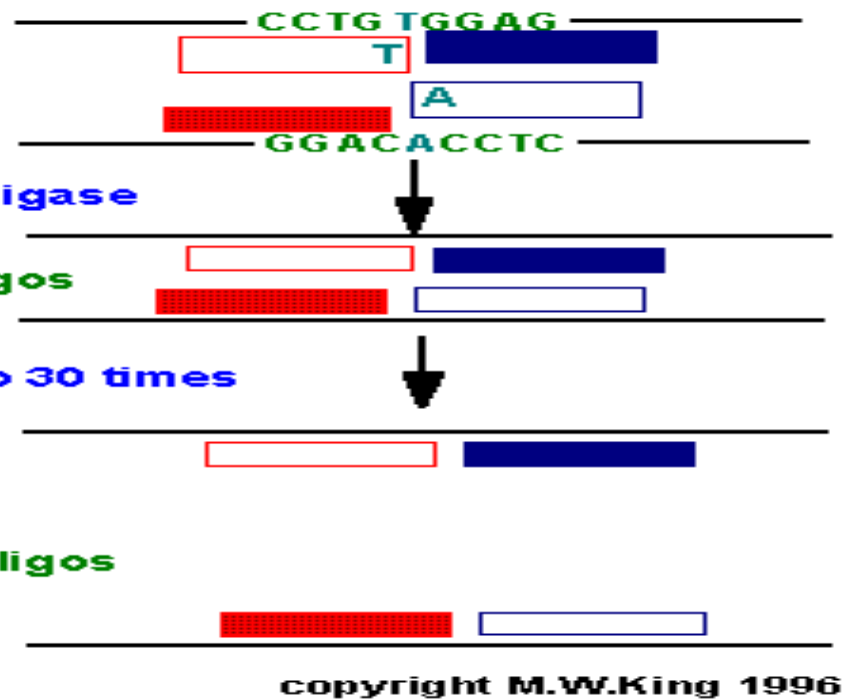
Barany F *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991); 88: 189-93.

The ligase detection reaction relies on the high specificity of DNA ligase to discriminate base variations in DNA. A primary PCR reaction amplifies the region of DNA containing mutations or polymorphisms. Mutation specific discriminating oligonucleotides hybridize adjacent to a common primer, resulting in the formation of a short DNA duplex containing a nick between the oligonucleotides. If there is a perfect match at the nick, then the oligonucleotides will be covalently linked by DNA ligase to generate a uniquely labelled ligation product. A single base mismatch at the junction inhibits ligation, and thus single-base mutations or polymorphisms are distinguished.

## Normal $\beta$ -Globin



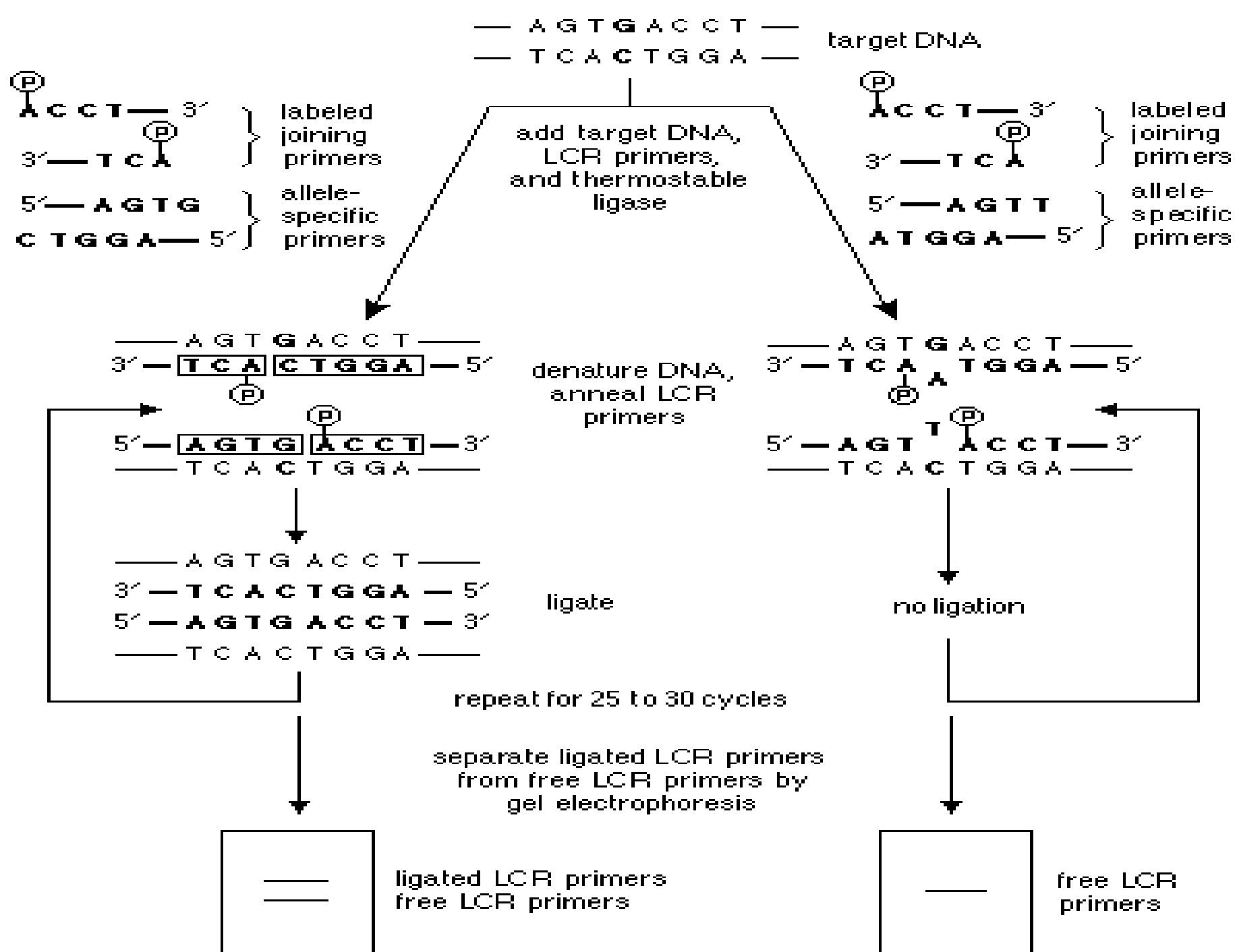
## Sickle $\beta$ -Globin



LCR differs from PCR because it amplifies the probe molecule rather than producing amplicon through polymerization of nucleotides. Two probes are used per each DNA strand and are ligated together to form a single probe. LCR uses a thermostable DNA ligase enzyme to drive the reaction. Like PCR, LCR requires a thermal cycler to drive the run and each cycle results in a doubling of the target nucleic acid molecule. In the example shown above for the sickle cell mutation the 3' nucleotide of one oligo in each pair is mismatched.

This mismatch prevent the annealing of the oligos directly adjacent to each other. Therefore DNA ligase will not ligate the two oligos of each pair together.

With the wild type sequence the oligo pairs that are ligated together become targets for annealing the oligos and result in an exponential amplification of the wild type target





**Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) is a method which is used to amplify RNA sequences.**

**NASBA was developed by J Compton in 1991, who defined it as "a primer-dependent technology that can be used for the continuous amplification of nucleic acids in a single mixture at one temperature."**

**Immediately after the invention of NASBA it was used for the rapid diagnosis and quantification of HIV-1 in patient sera.**

**NASBA's main advantage is that it works at isothermic conditions - usually at a constant temperature of 41°C.**

**Explained briefly, NASBA works as follows:**

**RNA template is given to the reaction mixture, the first primer attaches to its complementary site at the 3' end of the template**

**Reverse transcriptase synthesizes the opposite, complementary DNA strand**

**RNase H destroys the RNA template (RNase H only destroys RNA in RNA-DNA hybrids, but not single-stranded RNA)**

**the second primer attaches to the 5' end of the DNA strand**

**T7 RNA polymerase produces a complementary RNA strand which can be used again in step 1, so this reaction is cyclic.**

**The NASBA technique has been used to develop rapid diagnostic tests for several pathogenic viruses with single-stranded RNA genomes, e.g. influenza A, foot-and-mouth disease virus, severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus, HCV , HIV.**

**Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) is the basis of the NucliSens system of Organon Teknika (now part of bioMerieux) and offers a simple and rapid alternative method for nucleic acid amplification.**

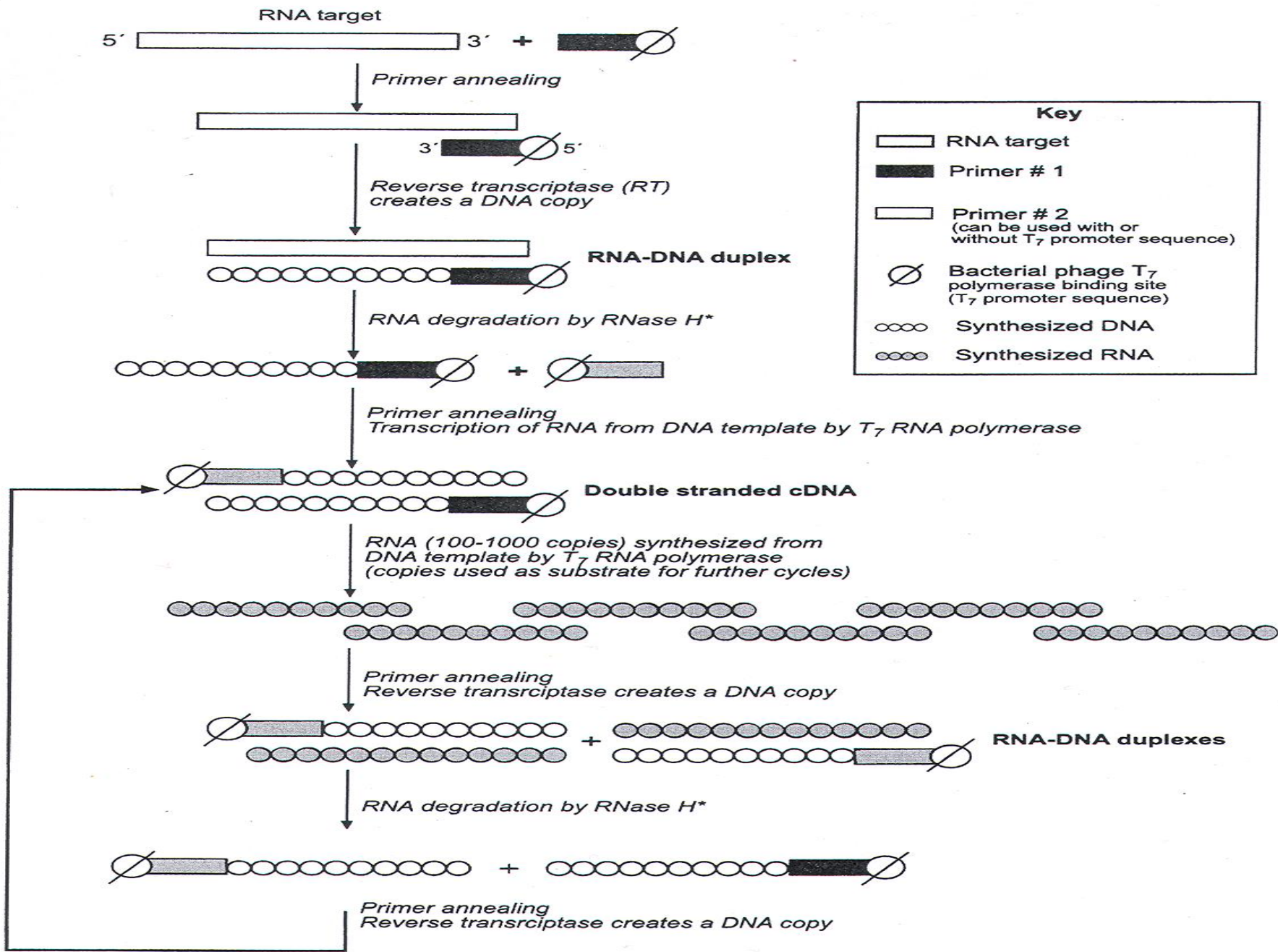
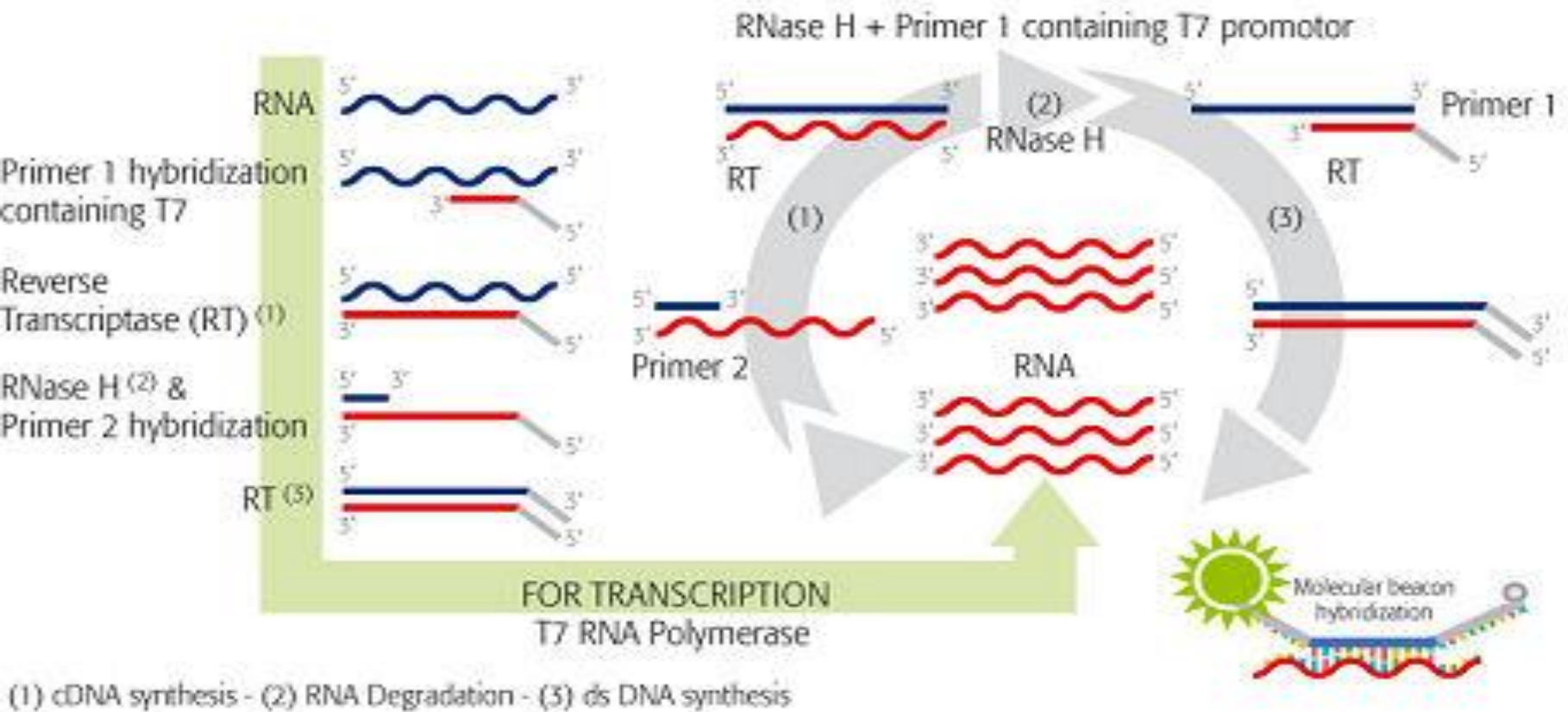


Figure 7. Scheme for transcription-based amplification systems. Reprinted with permission (181).



**NASBA amplification pathway. Target ssRNA binds to Primer 1. An RNA/DNA hybrid is formed by the action of reverse transcriptase. RNaseH then degrades the RNA component of the hybrid and reverse transcriptase using Primer 2 makes a cDNA of the target region. Because Primer 1 contains a T7 RNA polymerase promoter, many copies of the target RNA are made.**

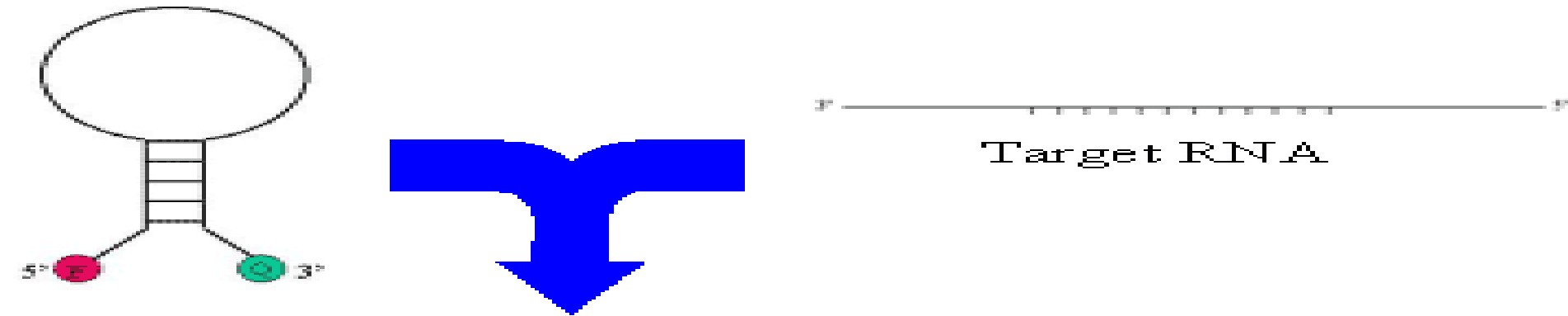
**NASBA reagents are available from Biomerieux under the product name Nuclisens**  
<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/nucleicacid/index.htm>

**NASBA technology is based on simultaneous enzymatic activity of reverse transcriptase, T7 RNA polymerase, and RNase in combination with two oligonucleotides. It depends on selective primer-template recognition to drive a cyclical, exponential amplification of the target sequence.**

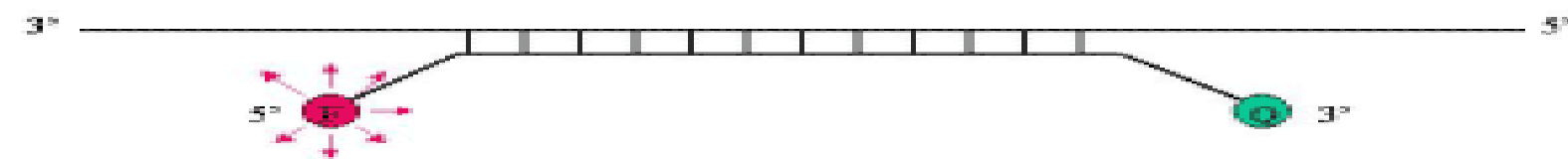
**The amplification reaction is isothermal, proceeds at 41°C, and results in single stranded RNA molecule synthesis. The detection is performed with specific probes molecular beacons , carrying a fluorescent molecule and a quencher at their extremities. The loop sequence of the beacon is specific and complementary to the nucleic acid sequence targeted.**

**The beacon then binds to the target and when it is opened, the quencher is distant from the fluorescent molecule and consequently allows the emission of fluorescence .**

Unbound: No Fluorescence



Bound to Target: Fluorescent



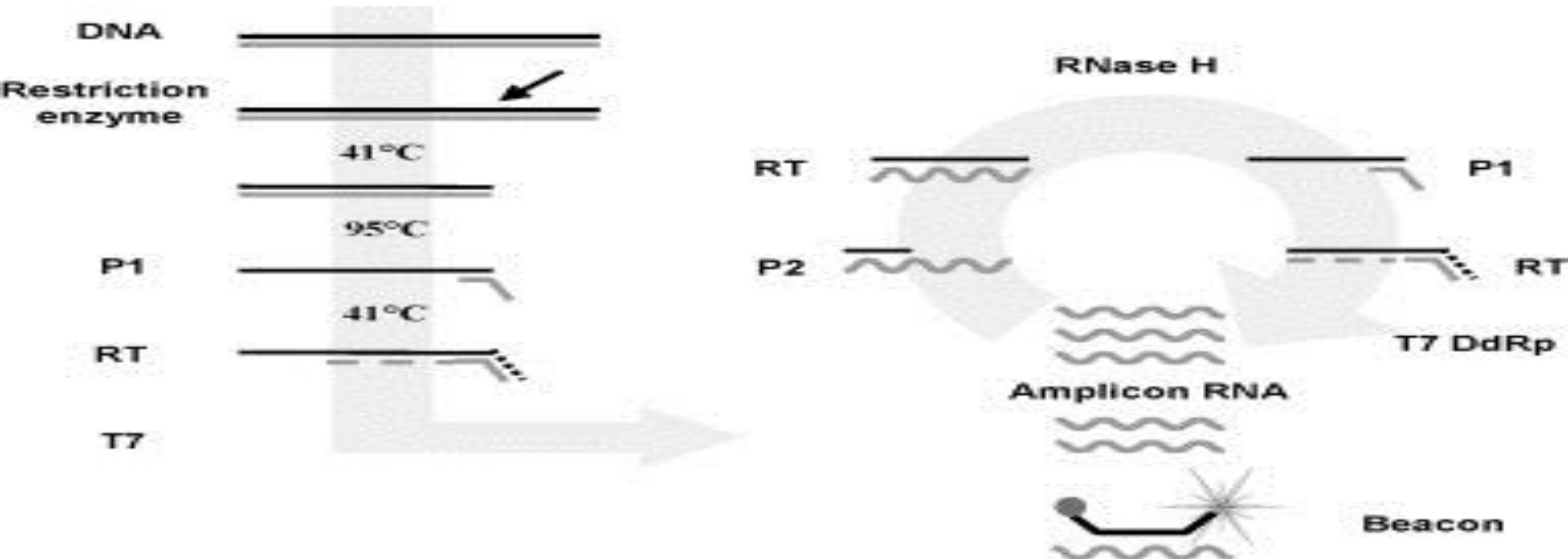
**Molecular Beacon probe in the unbound hairpin conformation (upper figure) and in the bound, fluorescent conformation. Amplification of the target sequence can be monitored by fluorescence measurements made every cycle.**

**NASBA® (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) is an isothermal nucleic acid amplification technology allowing the amplification of RNA or DNA targets (with a slight modification in the protocol) through a transcription process, after insertion of a T7 promotor.**

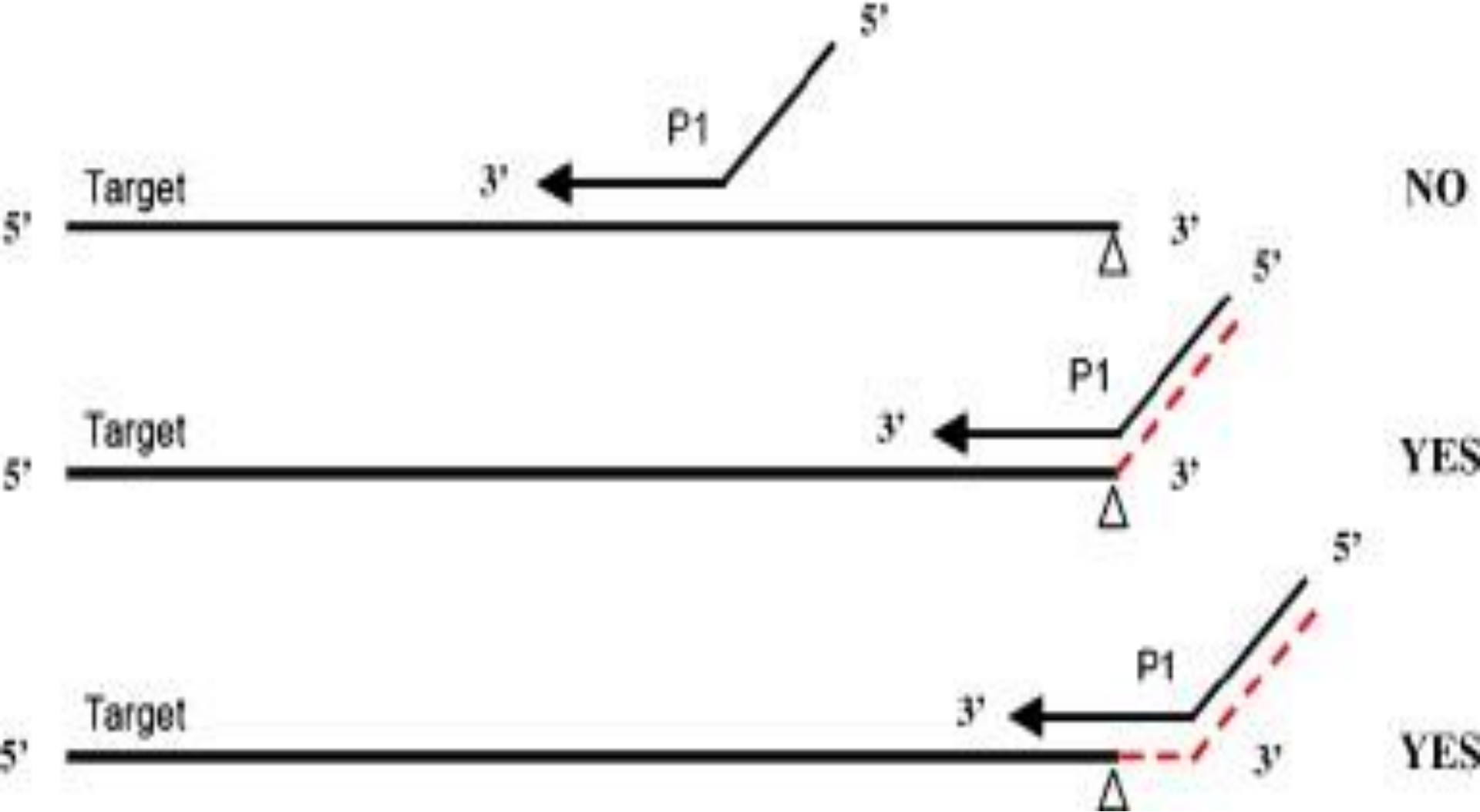
**A DNA NASBA in which restriction enzyme digestion is incorporated into the NASBA reaction to allow controlled initiation of amplification. RE digestion of the target takes place prior to amplification. The P1 primer is designed in such a way that the hybridizing part will interact with the target directly upstream of the digestion.**

After the addition of the NASBA enzymes AMV RT will extend the 3' end of the target at the digestion site using the hybridized P1 primer as template. As the P1 primer includes a 5' T7 promoter sequence this will become a functional double stranded T7 promoter site.

T7 polymerase ( T7 DdRp) will start transcription generating a single strand RNA amplicon to which the P2 primer will anneal as in RNA NASBA.



Schematic representation of new mechanism for DNA NASBA®. The activities of restriction enzyme digestion (black arrow), extension of the primers and target DNA (dotted lines) by reverse transcriptase (RT), transcription by T7 polymerase (T7) and digestion of the RNA amplicon by RNaseH is indicated. Amplicons are detected by molecular beacon binding.



**Design of the P1 primer in DNA NASBA. Three different situations in which the p1 is bound to the DNA target are presented. The position of restriction enzyme digestion is indicated (Δ). The possibility to extend the DNA by AMV RT after restriction enzyme digestion is indicated with YES or NO. Extension of the DNA target strand by AMV RT after primer binding is shown by a dotted line.**



**After digestion of the target DNA and hybridization of the primer , AMV-RT could extend the 3' end of the target strand using the P1 as a template. Thereby a double stranded T7 promoter sequence is created that could directly be used by the T7 enzyme to start the production of amplicons. As expected without restriction enzyme digestion amplicons will be detectable only at high input levels ( at least 1000 times less sensitive).**

**It is preferred to make use of more than one restriction site to minimize loss of assay sensitivity due to mutations in the restriction site.**

## bDNA Amplification System

Developed by the Chiron Corp., the bDNA amplification system uses bDNA to provide multiple hybridization sites for enzyme-coupled reporter molecules (141, 168) (Fig. 8). The target nucleic acid sequence is initially bound to a solid phase (i.e., a microwell surface) by a series of five to nine capture

probes (capture extenders). Once immobilized, a second series of probes (label extenders) mediates the binding of either bDNA amplifier molecules (version 1.0 of the assay) or preamplifier molecules (versions 2.0 and 3.0) (30, 109). The preamplifiers, in turn, provide multiple (eight per preamplifier) sites for binding of amplifier molecules. The branches of the latter then direct the binding of multiple alkaline

phosphatase-labeled oligonucleotides. Alkaline phosphatase is detected via its dephosphorylation of the chemiluminescent substrate dioxetane (Lumi-Phos Plus; Lumigen, Detroit, Mich.). Detection and quantitation take place by luminometry and comparison of the signal intensity with a standard curve (109).

Amplifier molecules are chemically synthesized branched multimers, with the backbone of their comb structure built with a branching nucleoside analog that can be incorporated at regular intervals during oligonucleotide synthesis. Each branching site is then extended with a short oligonucleotide fragment, to which a longer target-specific region is ligated. Each multimer contains 15 identical branches, and each branch of the molecule can bind 3 labeled probes, for a total of up to 45 labeled probes per amplifier. The use of preamplifiers has allowed the binding of eight amplifiers each, further increasing the sensitivity of the system. While the first commercial versions of these assays were cited as having diminished sensitivity in comparison to target ampli-

cation systems, more recent versions, which include the preamplification step, have a detection limit of approximately 50 target molecules/ml (30). This gives them roughly the same level of sensitivity of other systems while maintaining the advantages of a signal-based amplification system, which include a reduction in the risk of carryover contamination (82) and relatively facile and accurate quantitative capability. Additional benefits stem from the discontinuous design of capture probes and the target-specific extender probes. This makes the bDNA approach well suited to detecting a nucleic acid target with sequence heterogeneity, as is the case for HCV and HIV. If one or two of the capture or extender probes fail to hybridize because of sequence variation, signal-generating capacity is not lost because of the presence of several remaining probe complexes. The requirement for multiple, independent probe-target hybridization events provides specificity; nonspecific hybridization rarely allows hybridization of both capture and extender probes to the same nontarget se-

quence.

**bDNA quantitative assays are commercially available for HBV, HCV and HIV.**

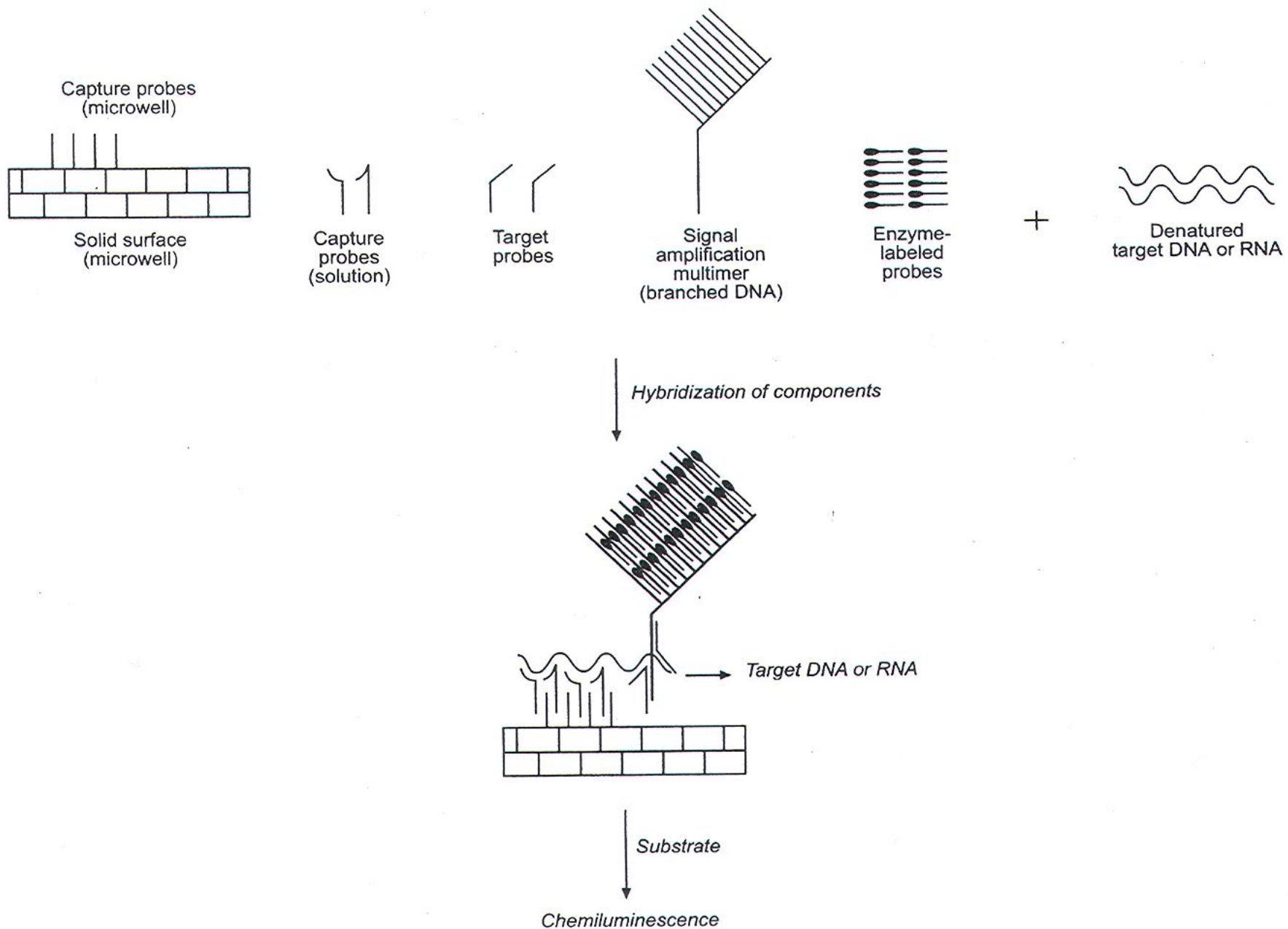


Figure 8. Scheme for bDNA signal amplification. Reprinted with permission (181).

**Diagrammatically, we have Base -> Capture Probe -> Extender -> Target -> label extender -> pre-amplifier -> amplifier**

**The assay can be used to detect and quantify many types of RNA or DNA target. In the assay, branched DNA is mixed with a sample to be tested. The detection is done using a non-radioactive method and does not require preamplification of the nucleic acid to be detected. The assay entirely relies on hybridization. Enzymes are used to indicate the extent of hybridization. Thus, small amounts of a nucleic acid can be detected and quantified without a reverse transcription step (in the case of RNA) and/or PCR. The assay can be run as a "high throughput assay", on a large number of samples.**

**The capture and capture-extender oligonucleotide bind to the target nucleic acid and immobilize it on a solid support. The label oligonucleotide and the branched DNA then detects the immobilized target nucleic acid. The immobilization of the target on a solid support makes extensive washing easier, which reduces false positive results. After binding of the target to the solid support it can be detected by branched DNA which is coupled to an enzyme (e.g. alkaline phosphatase). The branched DNA binds to the sample nucleic acid by specific hybridization in areas which are not occupied by capture hybrids. The enzyme catalyzes a reaction of a substrate which generates light (detectable in a luminometer). The amount of light emitted increases with the amount of the specific nucleic acid present in the sample. Despite the fact that the starting material is not preamplified, bDNA assays can detect less than 100 copies of HIV-RNA per mL of blood**

# **RNA Quantification with Branched DNA Technology**

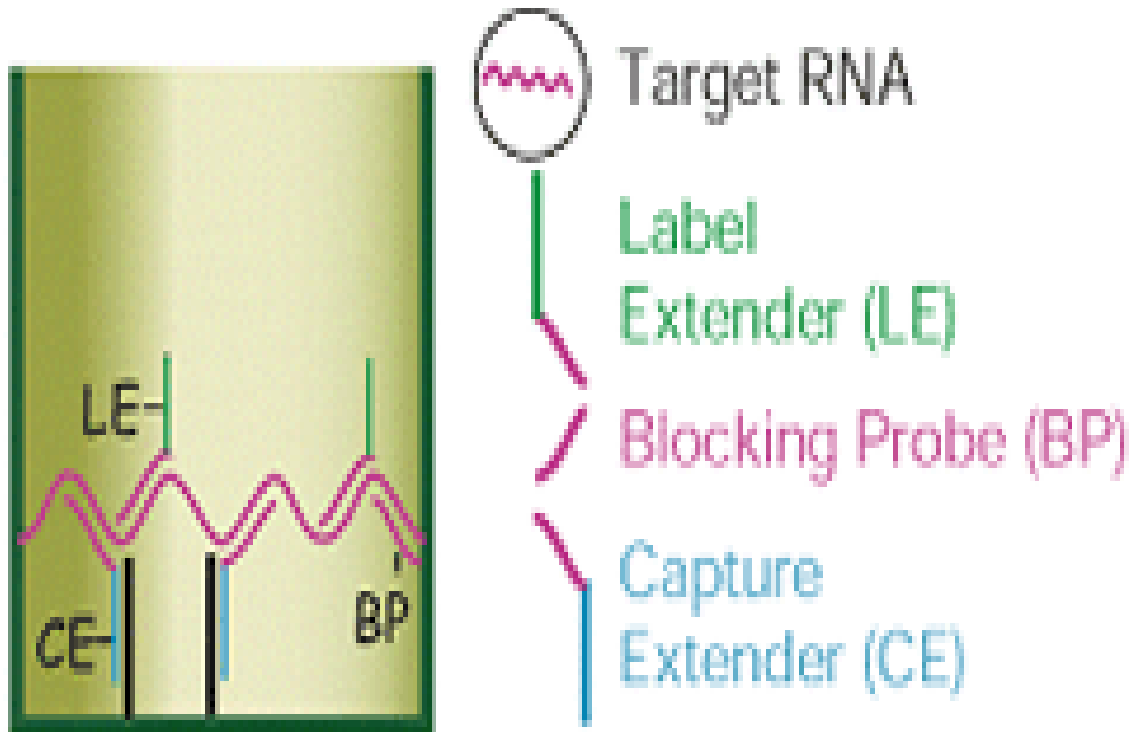
## **Simple ELISA-like workflow**

- **Use a standard luminometer (singleplex) or Luminex based instruments (multiplex) to quantify RNA targets**
- **RNA quantitation directly from crude cell lysates, tissue homogenates, blood**
- **Versatile: Can be used for cell culture, fresh/frozen tissue samples, blood, and purified RNA**
- **No reverse RNA transcription step, thus no enzymatic bias**

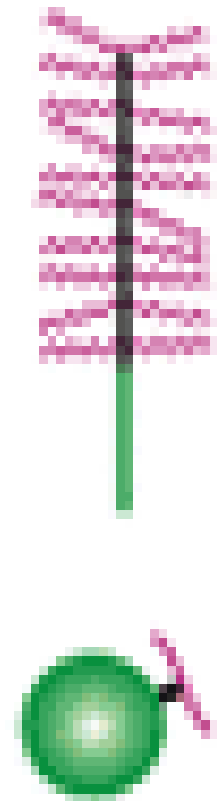
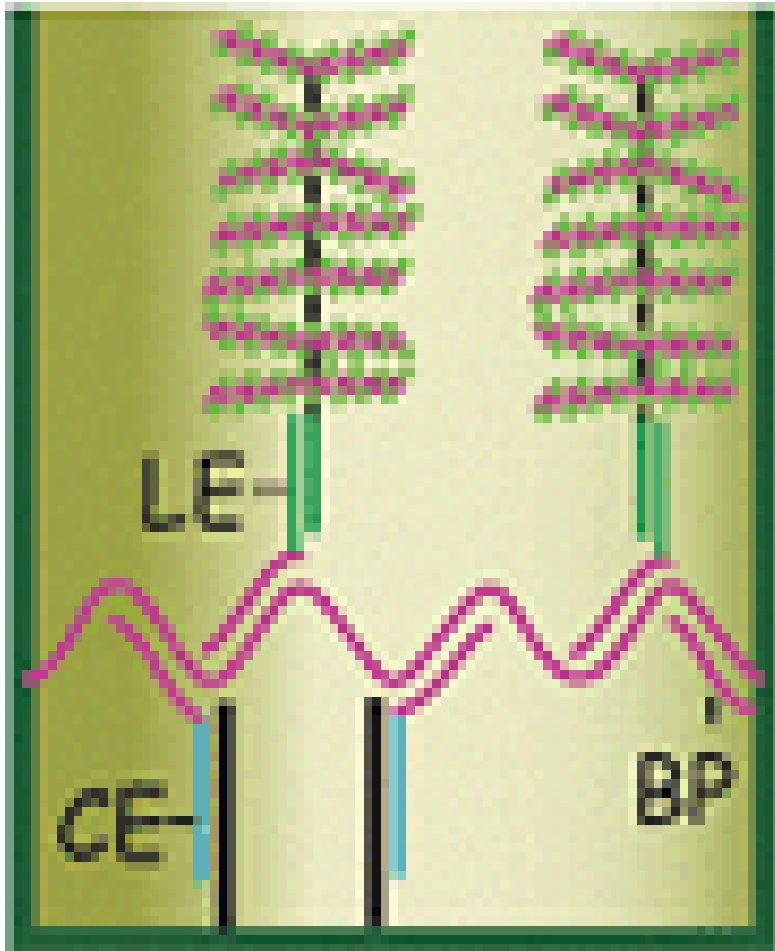


**QuantiGene Reagent System is a sandwich nucleic acid hybridization assay that provides a unique approach for RNA detection and quantification by amplifying the reporter signal using branched DNA (bDNA) technology.**

## **Principle of QuantiGene Assay**



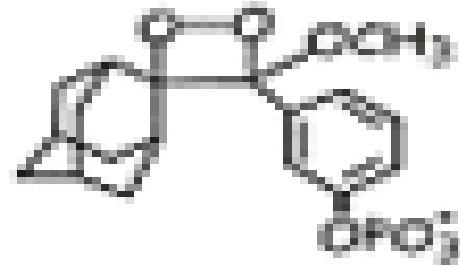
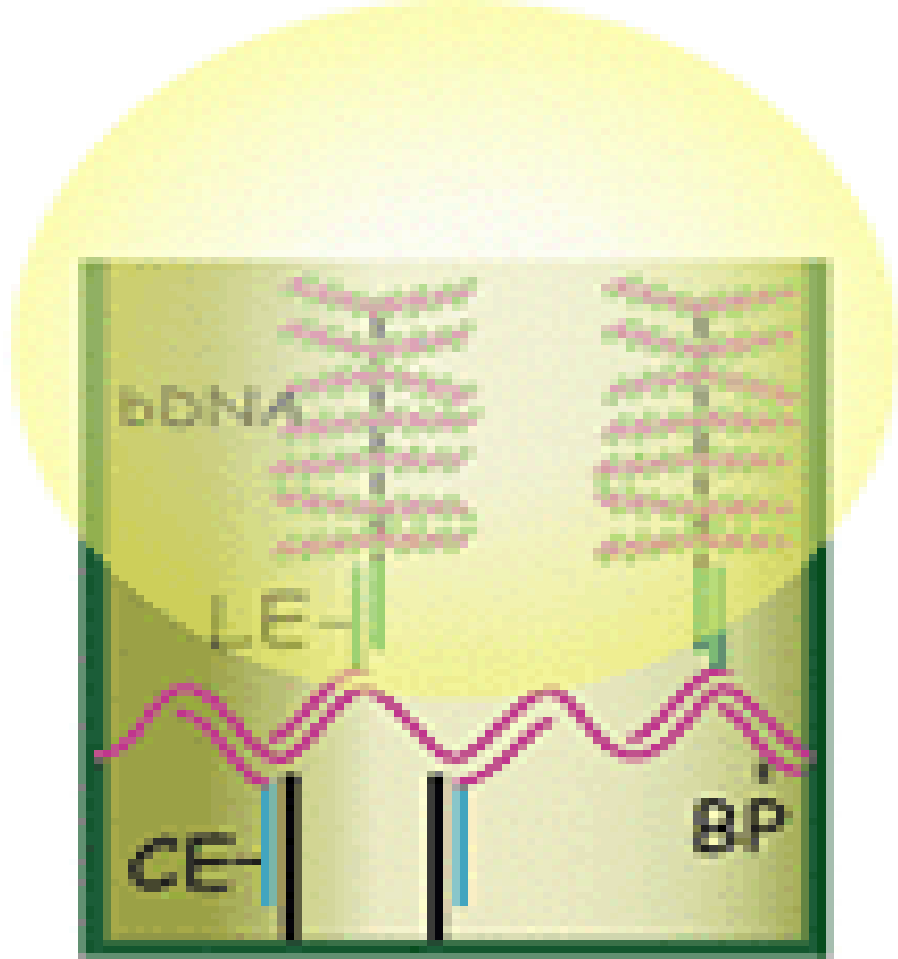
**Step 1: Lyse cells to release mRNA in the presence of target probes. Target mRNA from lysed cells is captured by hybridization and transferred to the Capture Plate.**



bDNA Amplifier

Label Probe

**Step 2: Signal amplification is performed by hybridization of the bDNA Amplifier and Label Probe.**



Substrate

**Step 3: Addition of chemiluminescence substrate yields a luminescent signal that is proportional to the amount of mRNA present in the sample.**

**Branched DNA technology is the basis of clinically proven viral load tests commercialized by Bayer Corporation and has been in practice for over a decade**

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Principles of Molecular Virology . Fourth Edition, Alan J. Cann , Elsevier Academic Press , 2005.

Principles of Molecular Virology . Fifth Edition, Alan J. Cann , Elsevier Academic Press , 2011.

Fundamentals of Molecular Virology .Nicholas H. Acheson , John Wiley & Sons , 2001.

BROCK Βιολογία των Μικροοργανισμών .Τόμος Ι , M. Madigan , J. Martinko , J. Parker , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης , 2005.

Molecular Microbiology .David H. Persing , ASM press , 2004.

Virology: Principles and Applications.John B. Carter and Venetia A. Saunders , John Wiley & Sons , 2007

Σημειώσεις Μοριακής Ιολογίας. Π. Μαρκουλάτος , Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας , 2011.

Fields Virology . 5th Edition Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M.Lippincott Williams & Wilkins , 2007

<http://pathmicro.med.sc.edu/book/virol-sta.htm> University of South Carolina. On line Virology Course.

<http://www.virology.net/courseware.html> On line Virology Course .

<http://pathmicro.med.sc.edu/lecture/chemo.htm>. **University of South Carolina.Antiviral Chemotherapy.**

<http://www.microbiologybytes.com/virology/Antivirals.html>