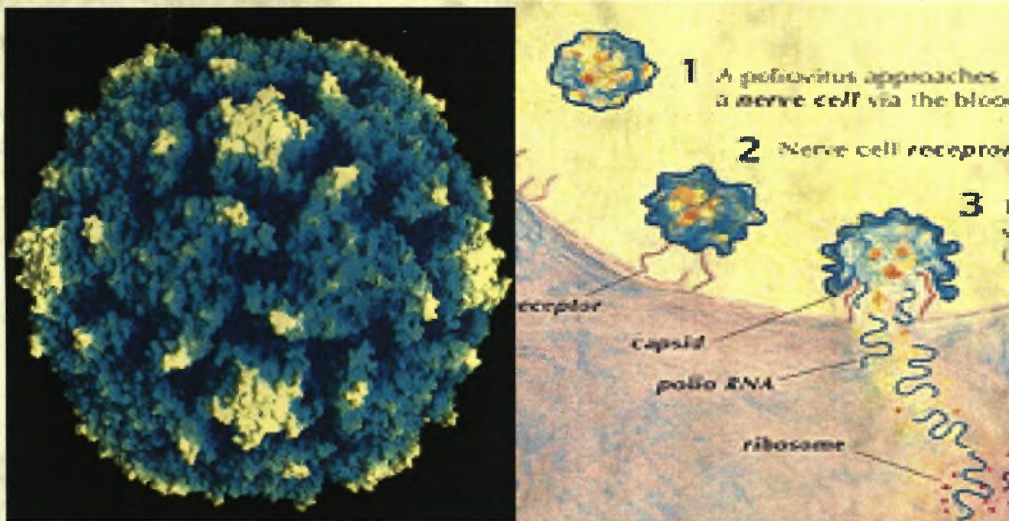


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΓΟΝΙΚΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ
ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΩΝ ΤΟΥΣ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ



ΚΙΟΥΣΗ ΠΑΥΛΙΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής : Π. Μαρκουλάτος

ΛΑΡΙΣΑ 2008



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 6595/1
Ημερ. Εισ.: 18-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2008
ΚΙΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



00400008734 1

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ : ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΕΦΑΡΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ
ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΖΩΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ -
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Δ. ΜΟΣΙΑΛΟΣ : ΛΕΚΤΟΡΑΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΜΙΚΡΟΒΙΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ- ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ:

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας –Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Π. Μαρκουλάτου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Π. Μαρκουλάτο για την ανάθεση του θέματος της διπλωματικής μου εργασίας ,για την καθοδήγηση του και τις υποδείξεις του καθ'όλη τη διάρκεια της εργασίας μου . Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες Δεδεψίδη Ευάγγελο, Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και ιδιαιτέρως την Πλιάκα Βίκυ για την καθοδήγηση και τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστίσω την οικογένειά μου, η οποία με στήριξε πάντα σε κάθε μου προσπάθεια, καθώς και τους φίλους μου, Ιωάννου Σκέντερ Μαρία, Πεππέ Παναγιώτα και Χρηστίδη Κωνσταντίνο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο την μελέτη των ανοσολογικών ιδιοτήτων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών. Αρχικά έγινε απομόνωση των ιϊκών στελεχών σε κυτταρική σειρά Hep2, οροταυτοποίηση και χρησιμοποιήθηκαν μοριακές μέθοδοι και προγράμματα βιοπληροφορικής για την αλληλούχιση και τον εντοπισμό μεταλλάξεων σε πρωτεΐνες του ιϊκού καψιδίου. Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιήθηκε οροεξουδετέρωση με αντιορούς ανθρώπινης προέλευσης ηλικιών 1 έως 40 ετών. Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν τον εντοπισμό μεταλλάξεων κυρίως σε θέσεις που αποτελούν καθοριστές του εξασθενημένου φαινότυπου των Sabin στελεχών και σε μικρότερο βαθμό σε αντιγονικές θέσεις. Η οροεξουδετέρωση έδειξε σταθερότητα των ανοσολογικών ιδιοτήτων των ιϊκών στελεχών ακόμα και σε αυτά που παρουσίαζαν μεταλλάξεις στις κύριες αντιγονικές τους θέσεις. Η ανοσία του πληθυσμού έναντι τόσο των τριών οροτύπων Sabin όσο και των αντίστοιχων ανασυνδιασένων εμβολιακών στελεχών εμφανίζεται να είναι εξίσου υψηλή στην ομάδα ατόμων ηλικιών 1-10 αλλά να μειώνεται στις ομάδες ηλικιών 11-20, 21-30 και 31-40. Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στην ανοσία των ομάδων ηλικιών 21-30 και 31-40 έναντι των ιϊκών στελεχών ορότυπου 3. Συμπερασματικά η παρουσία μεταλλάξεων στις αντιγονικές θέσεις ανασυνδιασένων εμβολιακών στελεχών πολιοϊών δεν φαίνεται να επηρεάζει τις ανοσολογικές τους ιδιότητες γεγονός όμως που δεν αποκλείει την πιθανότητα εμφάνισης περιπτώσεων VAPP κατόπιν εισαγωγής παρόμοιων ιϊκών στελεχών σε πληθυσμούς με κενά στην ανοσολογική τους κάλυψη.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ:

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

2. ΟΙ ΠΟΛΙΟΪΟΙ

Ταξινόμηση των πολιοϊών

Δομή και αντιγονικότητα των ικών σωματιδίων

Οργάνωση του γονιδιώματος

3. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Πρόσδεση στον υποδοχέα CD155 και είσοδος του ιού στα κύτταρα του ξενιστή

Μετάφραση του ιικού RNA

Πρωτεολυτική διάσπαση της ιικής πολυπρωτεΐνης

Αντιγραφή γονιδιώματος

Καψιδίωση του RNA και απελευθέρωση των ώριμων ικών σωματιδίων

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

6. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των πολιοϊών

Ανίχνευση και ταυτοποίηση των πολιοϊών με μοριακές μεθόδους

8. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

OPV (Oral Poliovirus Vaccine)

IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine)

OPV και εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιοιomyελίτιδα

9. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Μεταλλάξεις

Γενετικός ανασυνδιασμός

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

3. ΕΥΡΕΣΗ ΟΡΟΤΥΠΟΥ

4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

5. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

8. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

9. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

10. ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΜΕ ΟΡΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

Η πολιομυελίτιδα περιγράφηκε για πρώτη φορά στα τέλη του 18^{ου} αιώνα, παρόλα αυτά ως ασθένεια ταλαιπωρούσε τους ανθρώπινους πληθυσμούς εδώ και πολλούς αιώνες .

Κατά τη διάρκεια της ανθρώπινης ιστορίας έχουν καταγραφεί διάφορες σποραδικές περιπτώσεις παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Ωστόσο η πρώτη καταγραφή πολιομυελίτιδας προήλθε από μια επικήδειο στήλη από το μέσο βασίλειο της Αιγύπτου η οποία χρονολογείται περίπου το 1300πΧ . Η στήλη αυτή αναπαριστά ένα ιερέα με παράλυση στο ένα του άκρο που αποτελεί χαρακτηριστική ένδειξη πολιομυελίτιδας.



Εικόνα 1.1: Επικήδειος στήλη που παρουσιάζει τον ιερέα Siptah με τυπική ένδειξη παραλυτικής πολιομυελίτιδας

Κατά το πέρασμα των αιώνων μέχρι και το τέλος του 18^{ου} αιώνα, σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, η ασθένεια παρουσίαζε ενδημικό χαρακτήρα (χαμηλό και συνεχές επίπεδο μόλυνσης που περιορίζεται σε συγκεκριμένες γεωγραφικές περιοχές). Το χαμηλό βιοτικό επίπεδο και οι κακές υποδομές υγιεινής είχαν σαν αποτέλεσμα την ελεύθερη κυκλοφορία του ιού. Τα παιδιά ερχόντουσαν σε επαφή με τον ιό σε μικρές ηλικίες και οι υποκλινικές εκδηλώσεις της νόσου συνέβαλαν στην ανοσοποίηση τους. Από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα η έντονη αστικοποίηση στην Ευρώπη στην Βόρεια Αμερική και στην Αυστραλία καθώς και η βελτίωση των συνθηκών διαβίωσης είχαν ως αποτέλεσμα την αλλαγή στο υπόβαθρο μετάδοσης της ασθένειας. Κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του εικοστού αιώνα η ασθένεια απέκτησε επιδημικό χαρακτήρα με υψηλά ποσοστά παιδικής παράλυσης. Τα υψηλά ποσοστά παιδικής παράλυσης οφείλονται στο γεγονός ότι τα παιδιά πλέον ερχόντουσαν για πρώτη φορά σε επαφή με τον ιό, σε μεγαλύτερες ηλικίες, χωρίς τις υποκλινικές εκδηλώσεις της νόσου και χωρίς την προστασία των μητρικών αντισωμάτων.

Το 1909 ο Simon Flexner και ο Paul A Lewis κατάφεραν να προκαλέσουν παράλυση σε πιθήκους με ιό προερχόμενο από μολυσμένες ρινικές εκκρίσεις. Το 1954 ο Jonas Salk εισήγαγε το πρώτο εμβόλιο (IPV :inactivated polio vaccine) κατά της πολιομυελίτιδας, τα οποίο παρασκεύασε από αδρανοποιημένους ιούς μέσω χημικής απενεργοποίησης με φορμαλδεΰδη.

Το 1961 ο Sabin παρήγαγε εμβόλιο από ζωντανά εξασθενημένα στελέχη το OPV(oral polio vaccine). Τόσο το IPV όσο και το OPV περιέχουν και τους τρεις ορότυπους των πολιοϊών. Η επιτυχής χορήγηση των εμβολίων (αρχικά με το IPV και μετά το 1963 με το OPV) έχει σχεδόν εξαλείψει την πολιομυελίτιδα από τις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες.

2 ΟΙ ΠΟΛΙΟΪΟΙ

2.1 Ταξινόμηση των πολιοϊών

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών (Enterovirus) το οποίο κατατάσσεται στην οικογένεια των picorna ιών. Η ονομασία picorna προέρχεται από τις λέξεις pico που σημαίνει μικρός και na που αναφέρεται στο γενετικό τους υλικό. Η οικογένεια των picorna ιών περιλαμβάνει συνολικά 9 γένη (πίνακας 2.2.1) .

Οικογένεια	Γένος
Picornaviridae	<i>Enterovirus</i>
	<i>Rhinovirus</i>
	<i>Hepatovirus</i>
	<i>Cardiovirus</i>
	<i>Aphthovirus</i>
	<i>Parechovirus</i>
	<i>Erbovirus</i>
	<i>Kobuvirus</i>
	<i>Teschovirus</i>

Πίνακας 2.1.1: ταξινόμηση των picorna ιών

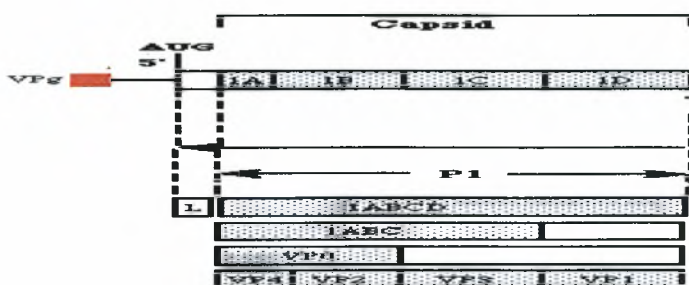
Αρχικά το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες i) στους πολιοϊούς (PV1-3),ii) στους coxsackie A ιούς (CAV),iii) στους coxsackie B ιούς (CBV) και iv) στους echo- ιούς (Melnick J.L.,1996). Στη συνέχεια επειδή ανακαλύφθηκαν και ταυτοποιήθηκαν νέα στελέχη , το γένος των εντεροϊών χωρίστηκε σε πέντε είδη. (King et al, 2000)(Πίνακας 2.1.2)

Species	Serotypes in the species
Poliovirus	Human poliovirus 1-3
Human enterovirus A	Human coxsackievirus A 2-8, 10, 12, 14, 16 ^a Human enterovirus 71
Human enterovirus B	Human coxsackievirus A 9 Human coxsackievirus B 1-6 Human echovirus 1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33 Human enterovirus 69
Human enterovirus C	Human coxsackievirus A 1, 11, 13, 15, 17-22, 24
Human enterovirus D	Human enterovirus 68, 70

Πίνακας 2.1.2: Πρόσφατο σχήμα ταξινόμησης των εντεροϊών (King et al. 2000).

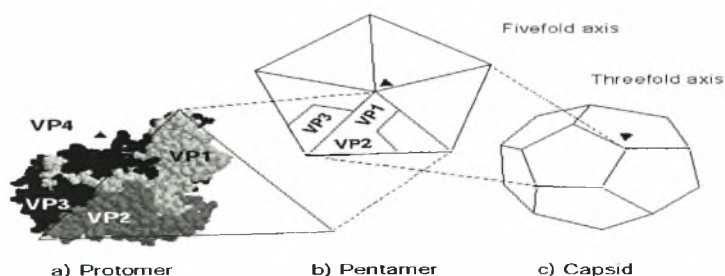
2.2 Δομή και αντιγονικότητα των ιικών σωματιδίων

Το ιικό σωματίδιο των πολιοϊών αποτελείται από ένα μη ελυτροφόρο πρωτεϊνικό καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας, το οποίο περικλείει ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας. Το καψίδιο τους αποτελείται από 60 αντίγραφα των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4 (Pfister et al., 1999) οι οποίες αποτελούν τα προϊόντα μιας πρόδρομης πολυπρωτεΐνης (P1). (Stanway G. 1990). (Εικόνα 2.2.1)



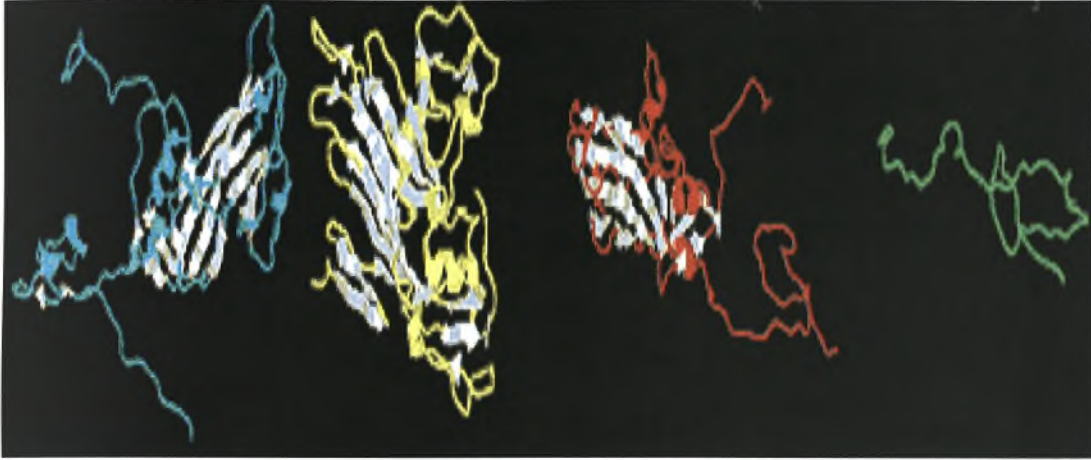
Εικόνα 2.2.1: Πρωτεόλυση της πρόδρομης πρωτεΐνης P1

Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 βρίσκονται στην επιφάνεια του καψιδίου ενώ η VP4 βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου. Κατά τη συναρμολόγηση του καψιδίου η P1 πρόδρομη καψιδική πρωτεΐνη διασπάται στα τρία πεπτίδια VP1, VP3 και VP0 (πρόδρομη των VP2 και VP4) τα οποία αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους, σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3, VP1). Τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και σχηματίζουν πενταμερή (VP0, VP3, VP1)₅. Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή ενώνονται για να σχηματίσουν το προκαψίδιο [(VP0, VP3, VP1)₅]₁₂. Καθώς το ιικό RNA ενσωματώνεται στο προκαψίδιο κατά το στάδιο της καψιδιοποίησης, πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης, κατά την οποία η VP0 διασπάται στις δομικές πρωτεΐνες VP2 και VP4. Το ώριμο καψίδιο εμφανίζει μεγάλη σταθερότητα και ανθεκτικότητα σε πρωτεολυτικά ένζυμα, σε χαμηλό pH και σε ισχυρά απορρυπαντικά όπως το SDS (Pfister et al 1999). Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας (2-3-5). Ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας βρίσκεται στο κέντρο των πενταμερών και περιβάλλεται από πέντε μόρια της VP1. Ο διμερής (2X) και ο τριμερής (3X) άξονας βρίσκονται μεταξύ των πενταμερών. Οι πρωτεΐνες VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον 3X άξονα.



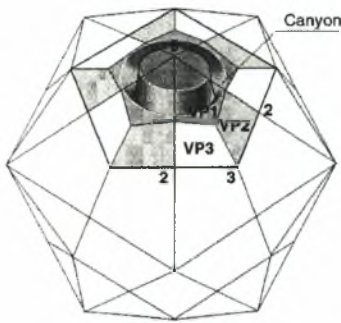
Εικόνα 2.2.2: (α) απεικόνιση του πρωτομερούς, με βέλος απεικονίζεται η VP4 η οποία βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. (β) απεικόνιση του πενταμερούς, το βέλος δείχνει τον 5X άξονα. (γ) απεικόνιση του ώριμου καψιδίου, το βέλος δείχνει τον 3X άξονα.

Οι 3 δομικές πρωτεΐνες (VP1, VP2 και VP3) αν και διαφέρουν στο μέγεθος και στην αμινοξική τους αλληλουχία, εμφανίζουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση. Αποτελούνται από ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι οχτώ κλώνων το οποίο πλαισιώνεται από δυο α-έλικες που συνδέονται με διαφορετικές θηλιές. (Εικόνα 2.2.3)



Εικόνα 2.2.3: απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών. Με γαλάζιο χρώμα απεικονίζεται η VP1, με κίτρινο η VP2, με κόκκινο η VP3 και με πράσινο η VP4. (A. Airaksinen 2000).

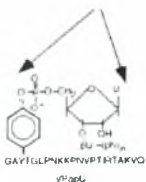
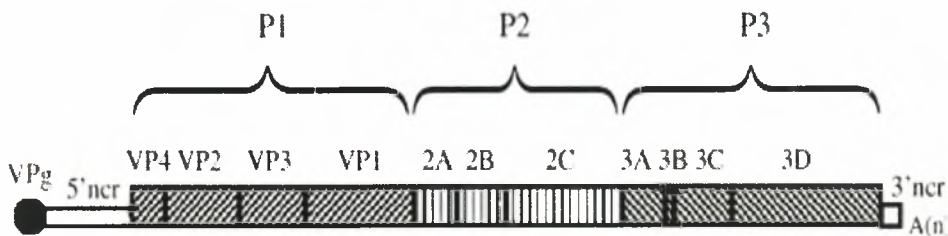
Τα καρβοξυτελικά άκρα των τριών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 και οι περισσότερες από τις θηλιές τους εκτίθενται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου και περιέχουν τις κύριες αντιγονικές θέσεις (N-Ags) του ιού. Υπάρχουν τέσσερις αντιγονικές θέσεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIII A και N-AgIII B. Η N-AgI είναι συνεχόμενη και αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1. Η N-AgII 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 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. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθεροποίηση του καψιδίου. Γύρω από τον (5x) άξονα συμμετρίας κοντά στα όρια σύνδεσης των πρωτεϊνών VP1 και VP3 εντοπίζεται μια βαθιά κοιλάτητα γνωστή ως αύλακα (canyon) η οποία αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του ιού με τον κυτταρικό υποδοχέα (hPVR). Εσωτερικά της αύλακας έχει βρεθεί μια υδρόφοβη εσοχή (hydrophobic pocket) η οποία περιέχει ένα μόριο σφιγγοσίνης (Εικόνα 2.2.4). Η σφιγγοσίνη πιθανόν ελέγχει τις δομικές μεταβολές που υφίσταται το καψίδιο κατά την προσκόλλησή του ιού στον κυτταρικό υποδοχέα.



Εικόνα 2.2.4: Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Γύρω από τον 5X άξονα εντοπίζεται η αύλακα (canyon) (Blondel et al.1998)

2.3 Οργάνωση και λειτουργία του γονιδιώματος

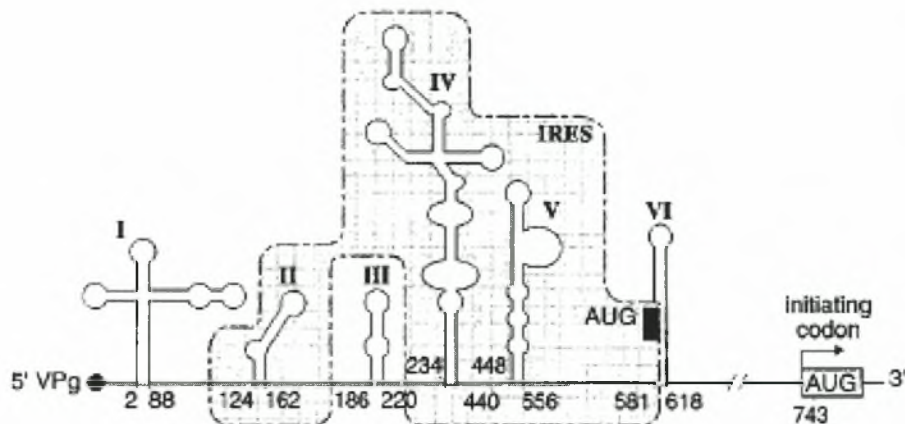
Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας με μέγεθος περίπου 7500 νουκλεοτιδίων. Και τα δυο άκρα του γενώματος είναι τροποποιημένα. Στο 5' άκρο είναι προσδεσμένη μια μικρή ική πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, η VPg, ενώ το 3' άκρο φέρει μια πολυαδενυλιωμένη ουρά, με μήκος περίπου 60 νουκλεοτιδίων. Η VPg συνδέεται ομοιοπολικά με το 5' άκρο του ικού RNA με το σχηματισμό φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του 5' άκρου του RNA και ενός καταλοίπου τυροσίνης της πρωτεΐνης VPg. Το αποτέλεσμα αυτής της σύνδεσης είναι η δημιουργία μιας δομής (VPg-Tyr-O⁴-pUUAAA...) Η VPg παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του γονιδιώματος χρησιμεύοντας ως εκκινητικό μόριο. (περισσότερες πληροφορίες παρατίθενται στην παράγραφο 3.4) Η πολυαδενυλιωμένη ουρά παίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές διεργασίες κατά τον κύκλο ζωής του ιού, όπως στην αντιγραφή, τη μετάφραση και στη σταθεροποίηση του ικού RNA. Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από τις εξής διακριτές περιοχές: (i) μια μεγάλη σε μέγεθος 5' μη κωδική περιοχή (5' NCR ή 5' UTR), (ii) ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) που κωδικοποιεί για μια πολυπρωτεΐνη και (iii) μια 3' μη κωδική περιοχή (3' NCR ή 3' UTR). (Wimmer et al.1999).



Εικόνα 2.3.1: Οργάνωση του ικού γενώματος (S.Mueller et al.2005)

Η 5' NCR είναι μια μεγάλη σε μέγεθος περιοχή 742 νουκλεοτιδίων και πλούσια σε δευτεροταγείς δομές. Τα πρώτα 100 νουκλεοτίδια σχηματίζουν τη δομή cloverleaf η οποία αποτελεί ένα cis-acting γενετικό στοιχείο, απαραίτητο για την έναρξη της

αντιγραφής του θετικού κλώνου . Στη συνέχεια ακολουθεί και ένα δεύτερο cis-acting στοιχείο, απαραίτητο για τη μετάφραση του ιικού γενώματος. Το στοιχείο αυτό είναι η δομή IRES(internal ribosomal entry site) με μέγεθος περίπου 400 νουκλεοτιδίων . Η αλληλουχία της 5' NTR περιοχής είναι σχετικά συντηρημένη στους πολιοϊούς. Εξαίρεση αποτελεί μια περιοχή 154 nt η οποία βρίσκεται στο τέλος της 5'NTR.(Wimmer et al.1999)



Εικόνα 2.3.2: απεικόνιση της δευτεροταγούς δομής της 5' NCR του στελέχους PV-1/Mahoney. Η δομή I αντιστοιχεί στη δομή cloverleaf, ενώ οι δομές II-IV αποτελούν το στοιχείο IRES. (B.Blondel et al.1998)

Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης κωδικοποιεί μια μεγάλη πρόδρομη πολυπρωτεΐνη μεγέθους 247kD , η οποία διασπάται πρωτεολυτικά σε τρία μικρότερα πεπτίδια τα P1, P2 και P3 τα οποία στη συνέχεια υφίστανται περαιτέρω πρωτεολυτική επεξεργασία προκειμένου να προκύψουν οι δομικές και οι λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού. (περισσότερες πληροφορίες στις παραγράφους 3.2-3.3), (Wimmer et al.1999).

Η πολύ(A) ουρά του γενώματος κωδικοποιείται από το ίδιο το γένωμα του ιού και δεν προστίθεται στο 3' άκρο του, όπως συμβαίνει με τα ευκαρυωτικά mRNAs . Το μήκος της πολύ(A) ουράς κυμαίνεται από 60-70 νουκλεοτίδια περίπου, τα οποία δημιουργούν μια δομή θηλιάς. Η θηλιά αυτή είναι πολύ σημαντική για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου του RNA(Herold J. and Andino R. 2001).

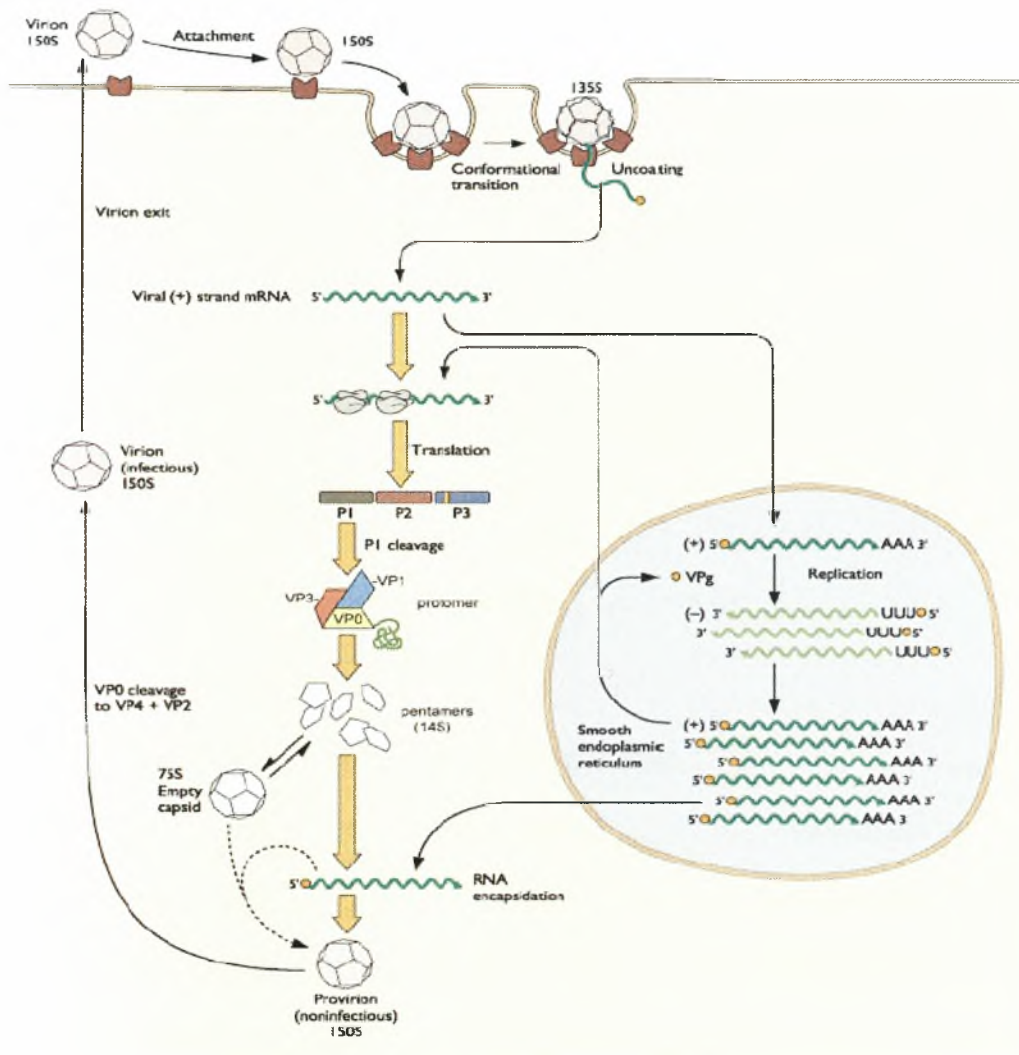
3.Ο ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο Κύκλος ζωής των πολιοϊών μπορεί να συνοψιστεί στα εξής στάδια:

1. Ο ιός προσδένεται στον κυτταρικό υποδοχέα CD155 και αποσταθεροποιείται.
2. Ακολουθεί είσοδος του ιικού γενώματος στο κύτταρο ξενιστή πιθανόν μέσω ενδοκύττωσης
3. Το ιικό RNA μεταφράζεται αμέσως σε μια πολυπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια υφίσταται πρωτεολυτική επεξεργασία από τις ιικές πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C^{pro} και 3CD^{pro} . Η έναρξη της μετάφρασης ελέγχεται από τα στοιχεία IRES.
4. Η παραγωγή της ιικής πρωτεΐνης 2BC οδηγεί στην εμφάνιση μεμβρανωδών κυστιδίων στα οποία λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του RNA. Επίσης η

πρωτεϊνοσύνθεση του κυττάρου ξενιστή αναστέλλεται από τη δράση της 2A^{pro} που επάγει τη διάσπαση του παράγοντα eIF-4G.

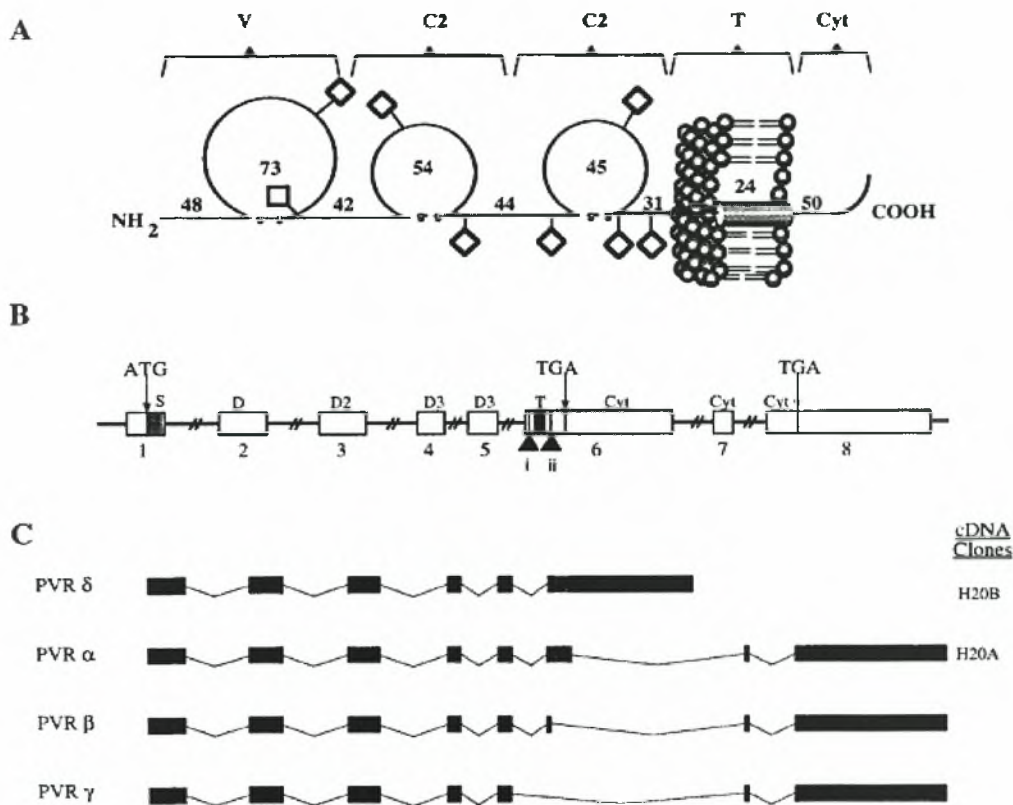
5. Η αντιγραφή του RNA ακολουθεί το μονοπάτι RNA (+) → RNA(-) → RNA (+). Η έναρξη της RNA σύνθεσης από την 3D^{pol} απαιτεί την VPg ιική πρωτεΐνη ως primer.
6. Τα μόρια RNA που συντίθενται μπορούν να χρησιμοποιηθούν (i) για την αντιγραφή και τη δημιουργία νέων μορίων RNA, (ii) για πρωτεϊνοσύνθεση και (iii) για την καψιδοποίηση και την παράγωγη νέων ιικών σωματιδίων.
7. Το τελευταίο στάδιο είναι η συναρμολόγηση των ώριμων ιικών σωματιδίων. (Pfister et al. 1999)



Εικόνα 3: Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών (Hogle 2002)

3.1 Πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα CD155 και είσοδος του ιού στα κύτταρα του ξενιστή.

Το πρωταρχικό στάδιο στον κύκλο ζωής του ιού είναι η πρόσδεση του στον κυτταρικό υποδοχέα CD155. Ο υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR) αποτελεί μέλος της υπερικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Ο CD155 είναι μια γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη 80KDa η οποία αποτελείται από τρεις εξωκυττάρειες περιοχές (D1-D2-D3), μια διαμεμβρανική περιοχή και μια κυτταροπλασματική περιοχή. Υπάρχουν συνολικά 4 διαφορετικές ισομορφές του υποδοχέα (α,β,γ,δ) οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του CD155. Το γονίδιο αυτό έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει οκτώ εξόνια. Οι ισομορφές α και δ είναι προσκολλημένες στις μεμβράνες και δρουν σαν υποδοχείς των πολιοϊών, ενώ οι β και γ είναι εκκρινόμενες. (Solecki et al.1998)



Εικόνα 3.3.1: Α) απεικόνιση του υποδοχέα CD155 και αντιστοίχιση των τμημάτων του με περιοχές ανοσοσφαιρίνης (D1-V,D2-C2,D3-C2). Β) Το γονίδιο του CD155 και οι εναλλακτικές μορφές μάτισματος.

Η περιοχή του καψιδίου που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση και την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα είναι γνωστή ως αύλακα ή canyon(όπως έχει ήδη αναφερθεί).Στη βάση κάθε αύλακας, στον πυρήνα του β βαρελιού της VP1 βρίσκεται προσδεδεμένο ένα μόριο σφιγγοσίνης, γνωστό και ως “rocket factor” το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην αποσταθεροποίηση του καψιδίου. Η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του καψιδίου οι οποίες είναι απαραίτητες για την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο. Τα ιικά σωματίδια που

προκύπτουν ονομάζονται Α σωμάτια και έχουν μικρότερο συντελεστή καθίζησης (135S) σε σχέση με τα άθικτα ιικά σωμάτια (160S). Κατά τον σχηματισμό των Α σωματιδίων η πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 κινούνται εξωτερικά του καψιδίου. Στη συνέχεια η VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 δημιουργούν μια ελικοειδή μορφή η οποία διευκολύνει την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου. Κατά την έξοδο του ιικού RNA το καψίδιο που απομένει έχει συντελεστή καθίζησης 80S (Simon K. Tsang 2001).

3.2 Μετάφραση του ιικού RNA

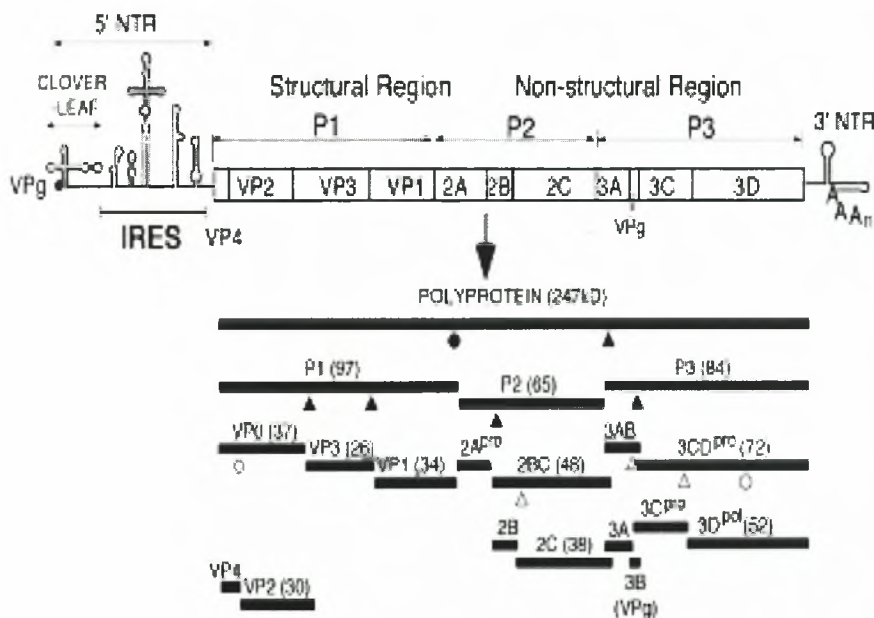
Καθώς το ιικό RNA εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα, η πρωτεΐνη VPg απομακρύνεται από το 5' άκρο από μια κυτταρική πρωτεάση και το RNA μεταφράζεται απευθείας από τα ριβοσώματα του κυττάρου. Σε αντίθεση με τα φυσιολογικά κυτταρικά mRNAs, η μετάφραση του ιικού RNA διευκολύνεται από μια εσωτερική περιοχή του ιικού γενόματος γνωστή ως IRES (internal ribosome entry site) (εικόνα 3.2.1). Κατά συνέπεια δεν απαιτείται η δομή καλύπτρας m⁷G που συναντάται στα ευκαρυωτικά mRNAs. Τα στοιχεία IRES αποτελούνται από υψηλά συντηρημένες δευτεροταγείς δομές RNA και περιέχουν μια χαρακτηριστική περιοχή ολιγοπυριμιδίνης η οποία ακολουθείται από ένα συντηρημένο σιωπηλό κωδικόνιο AUG. Το ενεργό κωδικόνιο έναρξης βρίσκεται περίπου 100nt καθοδικά των IRES (Wimmer et al. 1993). Κατά την έναρξη της μετάφρασης στους πολιοϊούς, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα κατευθύνεται στην περιοχή των IRES που περιέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για τη μετάφραση του ιικού RNA απαιτούνται σχεδόν όλοι οι ευκαρυωτικοί παράγοντες έναρξης της μετάφρασης (eIFs) εκτός από τον eIF4E ο οποίος προσδένεται στην καλύπτρα των ευκαρυωτικών mRNAs. Στην cap- εξαρτώμενη μετάφραση των κυτταρικών mRNA οι παράγοντες eIFG1, eIF4E και ο eIF4A συναρμολογούν το σύμπλοκο eIF4F το οποίο αλληλεπιδρά με τη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα 40S μέσω του eIF3 για να σχηματίσει το σύμπλοκο 43S. Στη συνέχεια το σύμπλοκο 43S προσδένεται στο 5' cap του mRNA και δημιουργείται το σύμπλοκο 48S το οποίο κινείται με κατεύθυνση 5→3 μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο. Κατά τη μετάφραση του ιικού RNA ο παράγοντας eIF4G αλληλεπιδρά απευθείας με το RNA και συνδέεται με τον eIF4A προάγοντας την δημιουργία του 48S συμπλόκου. Αφού συνδεθεί η μικρή υπομονάδα στο RNA κινείται με κατεύθυνση 5'→3' μέχρι να συναντήσει το εναρκτήριο κωδικόνιο (Deborah Prevot et al. 2003). Επιπρόσθετα με τους παράγοντες έναρξης απαιτείται και η πρόσδεση κάποιων κυτταρικών πρωτεϊνών (ITAFs) στα IRES οι οποίοι είτε ενισχύουν τη μετάφραση, είτε ρυθμίζουν την ισορροπία μεταξύ της μετάφρασης και της αντιγραφής του ιικού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί παράγοντες ITAFs ειδικοί για τα στοιχεία IRES, τέσσερις από τους οποίους είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με RNA:

PTB (polypyrimidine tract-binding protein), PCBP2 [poly(rC)-binding protein 2], αυτοαντιγόνο La και η Umr. Ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅ μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο. Το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης μεταφράζεται σε μια πολύπρωτεΐνη η οποία στη συνέχεια τεμαχίζεται από τις ιικές πρωτεάσες 2A^{pro}, 3C και 3CD, προκειμένου να δημιουργηθούν οι λειτουργικές ιικές πρωτεΐνες. (Kerstin Ochs et al. 2002, Oreda Boussadia et al. 2002).

3.3 Πρωτεολυτική διάσπαση της ιικής πολυπρωτεΐνης

Η ιική πολυπρωτεΐνη αποτελείται από τρεις περιοχές (P1,P2,P3). Η περιοχή P1 αντιστοιχεί στις δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου ενώ οι περιοχές P2 και P3 αντιστοιχούν στις μη δομικές πρωτεΐνες (Wimmer et al.1993) .

Αρχικά η πολυπρωτεΐνη διασπάται πρωτεολυτικά από την πρωτεάση 2A^{pro} η οποία πραγματοποιεί μια cis διάσπαση του δεσμού Tyr-Gly στο αμινοτελικό της άκρο και οδηγεί στην απελευθέρωση της P1. Στη συνέχεια απελευθερώνεται η P3 από το πρόδρομο πολυπεπίδιο P2-P3 μέσω cis διάσπασης από την πρωτεάση 3CD^{pro}. Έπειτα ακολουθεί μια αλληλουχία γεγονότων trans διάσπασης από την πρωτεάση 3CD^{pro} η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση των μη δομικών πρωτεϊνών 2A, 2BC, 3AB, 2B, 2C, 3A,3B(VPg), 3C^{pro}, 3D^{pol} και των καψιδικών πρωτεϊνών VP0, VP1 και VP3. Η τελευταία αντίδραση πρωτεόλυσης λαμβάνει χώρα κατά τη συναρμολότητα των ιικών σωματιδίων κατά την οποία η VP0 διασπάται πιθανότατα μέσω ενός αυτοκαταλυτικού μηχανισμού στις VP2 και VP4. Η αντίδραση αυτή αναφέρεται ως διάσπαση ωρίμανσης και είναι πολύ σημαντική για την παραγωγή μολυσματικών ιικών σωματιδίων. (Pfister et al.1999).

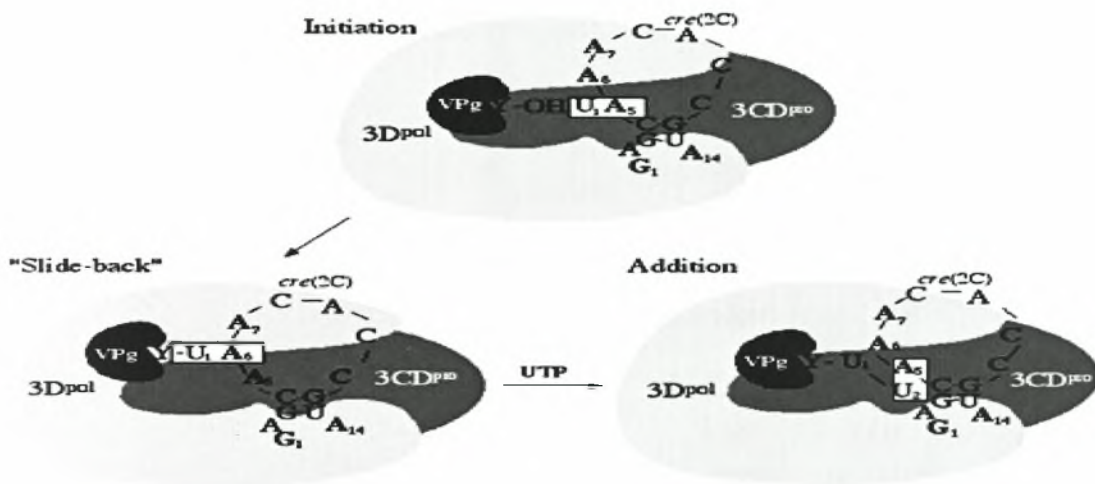


Εικόνα 3.2.1: Πρωτεολυτική επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης . τα σημεία που κόβει η 2A^{pro} συμβολίζονται με κύκλο, ενώ με τρίγωνο συμβολίζονται τα σημεία που κόβουν η 3C^{pro} και η 3CD^{pro}. Με ρόμβο συμβολίζεται η αντίδραση ωρίμανσης. (S.Mueller et al.2005)

3.4 Αντιγραφή του γονιδιώματος

Αμέσως μετά την μετάφραση του, το ιικό RNA χρησιμεύει ως μήτρα για την παραγωγή ενός συμπληρωματικού μορίου RNA αρνητικής πολικότητας το οποίο στη συνέχεια δρά ως εκμαγείο για τη σύνθεση νέων κλώνων θετικής πολικότητας (Kirkegaard et al 1999, D.J. Barton 2003). Η αντιγραφή του ιικού γενώματος λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο του ξενιστή πάνω σε μεμβρανικά κυστίδια των οποίων η δημιουργία επάγεται από ιικές πρωτεΐνες (2BC,3A). Στη διαδικασία της αντιγραφής συμμετέχουν όλες οι μη δομικές πρωτεΐνες του ιού και οι πρόδρομες μορφές τους (Phister et al. 1999) , μερικές πρωτεΐνες του ξενιστή καθώς και κάποια από τα στοιχεία του ιικού γενώματος , όπως η δομή “cloverleaf” και η

δομή CRE η οποία εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή. Η σύνθεση και του αρνητικού αλλά και του θετικού κλώνου καταλύεται από την ιική πολυμεράση $3D^{pol}$ η οποία δρα, χρησιμοποιώντας ως εκκινητή την πρωτεϊνη VPg. Η πρωτεϊνη VPg για να δράσει ως εκκινητής πρέπει πρώτα να ουριδιλιωθεί ($VPg\text{pU}\text{pU}_{OH}$). Η αντίδραση αυτή καταλύεται επίσης από την $3D^{pol}$ και απαιτεί την παρουσία της δομής CRE (Cis Response Element). Η δομή CRE όπως προαναφέρθηκε εντοπίζεται στην 2C κωδική περιοχή του γενώματος (P.F.Stadler et al) και δρα ως εκμαγείο για την ουριδιλίωση της VPg. Το στοιχείο CRE σχηματίζει μια θηλιά στην κορυφή της οποίας υπάρχει μια συντηρημένη αλληλουχία ${}^1GXXXAAAXXXXXXA{}^{14}$ (Lemon et al.2002,Rieder et al. 2002). Η A^5 χρησιμοποιείται για την προσθήκη και των δυο νουκλεοτιδίων ουρακίλης στο OH της τυροσίνης της VPg από την $3D^{pol}$. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται μέσω ενός Slide back μηχανισμού. (Wimmer et al 2003).

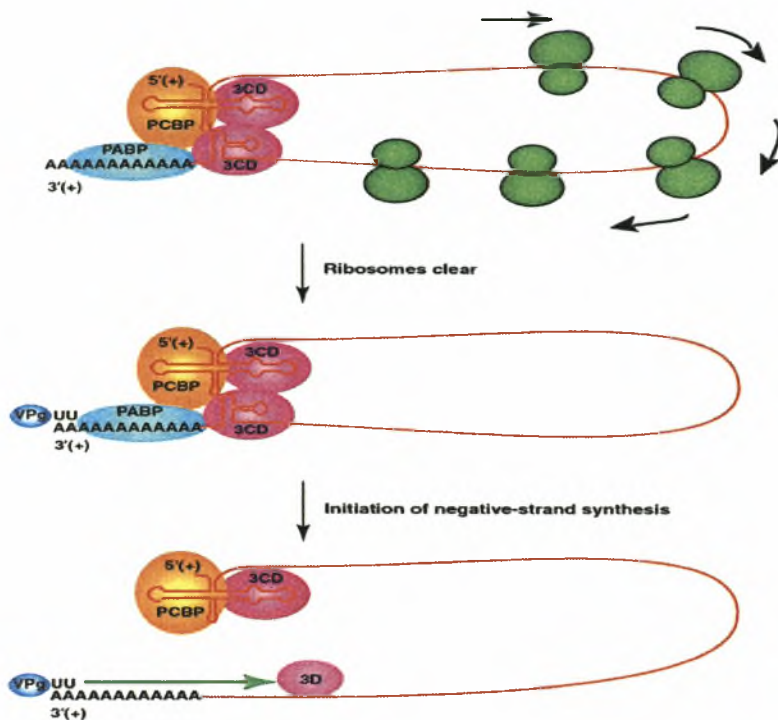


Εικόνα 3.4.1: Μοντέλο του 'slide back' μηχανισμού. Η $3CD^{pro}$ συνδέεται με το CRE (Wimmer, 1994; Cameron, 2002) και διεγείρει την πρόσδεση της $3D^{pol}$. Σ' αυτό το σύμπλοκο συνδέεται και η 3B (VPg). Αρχικά προσδένεται ένα μόριο ουρακίλης στο ελεύθερο υδροξύλιο του κατάλοιπου τυροσίνης (Y) της 3B, έχοντας ως πρότυπο το A-5. Το παραγόμενο $VPg\text{pU}$ σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με A-6 (slide back) και έτσι προστίθεται και το δεύτερο μόριο ουρακίλης έχοντας πάλι ως πρότυπο το A-5. (εικόνα από A.V. Paul, 2002)

Η σύνθεση του αρνητικού κλώνου ξεκινά με την κυκλοποίηση του γενώματος στην οποία συμμετέχουν οι πρωτεΐνες 3CD, PCBB και οι δομές 5'cloverleaf και 3'UTR του ιικού γενώματος.

Η κυκλοποίηση του μορίου οδηγεί στην απομάκρυνση των ριβοσωμάτων και συνεπώς στη μετάπτωση από την μετάφραση στην αντιγραφή (Andino et al 1993).

Στη συνέχεια η VPg προσδένεται στο 3'άκρο με τη βοήθεια της PABP και χρησιμεύει ως εκκινητικό μόριο για τη πολυμεράση $3D^{pol}$. Με την έναρξη της δράσης της πολυμεράσης απομακρύνονται οι υπόλοιποι παράγοντες από το 3'άκρο, προκειμένου να είναι συνεχής η σύνθεση και επίσης να είναι εφικτή η ουριδιλίωση της VPg (Barton 2003).



Εικόνα 3.4.2: Μοντέλο σύνθεσης του μορίου RNA αρνητικής πολικότητας. Αρχικά προσδένονται όλοι οι απαραίτητοι παράγοντες στο cloverleaf. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στη διακοπή της μετάφρασης. Μετά προσδένεται η VPg και ξεκινάει η σύνθεση του αρνητικού κλώνου. (D.J. Barton et al, 2001)

Όταν ολοκληρωθεί η σύνθεση του αρνητικού κλώνου το μόριο αρνητικής πολικότητας δρά ως εκμαγείο για τη σύνθεση των νέων κλώνων RNA θετικής πολικότητας. Έχει βρεθεί ότι παράγονται 20 με 50 αντίγραφα θετικής πολικότητας ανά ένα μόριο αρνητικής πολικότητας. (μοντέλο ασύμετρης αντιγραφής) (Barton 2003)

3.5 Καψιδίωση του RNA και απελευθέρωση των ιικών σωματιδίων.

Η καψιδίωση του RNA και η αντιγραφή φαίνονται να είναι συζευγμένες διότι και οι δυο διεργασίες επιτελούνται πάνω στα ίδια επαγόμενα από τον ιό μεμβρανικά κυστίδια (Ansardi et al.1996). Αρχικά το μυριστιλιωμένο P1 πολυπεπτίδιο τεμαχίζεται από την πρωτεάση 3CD^{P10} στις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3 οι οποίες συσσωματώνονται δημιουργώντας ένα πρωτομερές. Στη συνέχεια πέντε πρωτομερή ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν ένα πενταμερές. Τέλος 12 πενταμερή ενώνονται μεταξύ τους και δημιουργούν το προκαψίδιο. Έχει δειχθεί ότι τα πενταμερή μπορούν να προσδέσουν πάνω τους μόρια RNA (Verliden et al.2000) και έτσι πιστεύεται ότι το ιικό RNA εσωκλείεται από 12 πενταμερή. Στο τελευταίο στάδιο της καψιδίωσης πραγματοποιείται η αντίδραση ωρίμανσης κατά την οποία η πρωτεΐνη VP0 διασπάται πρωτεολυτικά στις πρωτεΐνες VP2 και VP4 (Wimmer et al.1999).

4. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

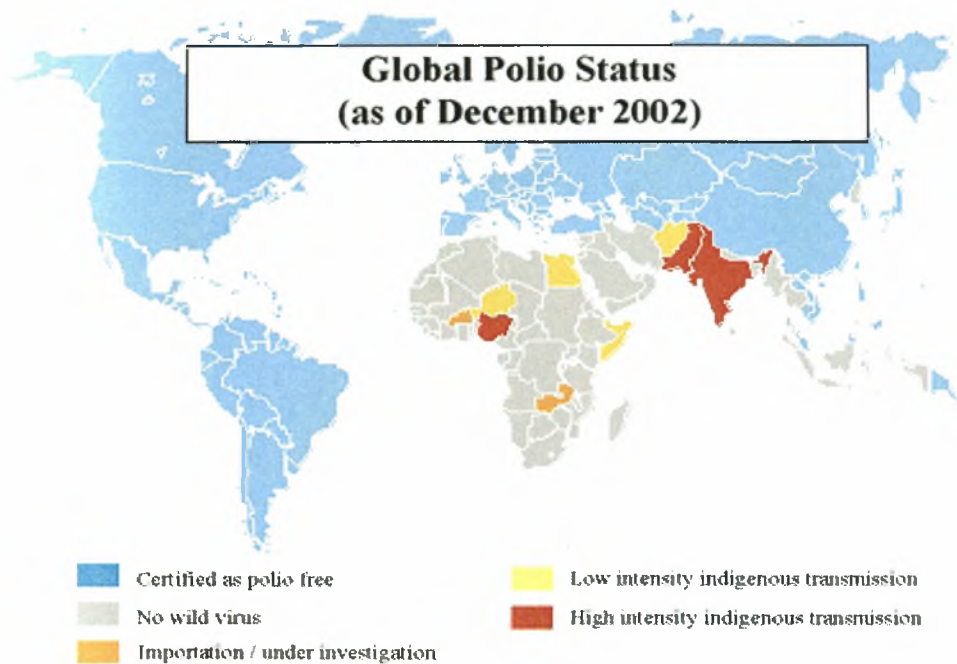
Οι ιοί της πολιομυελίτιδας όπως και οι υπόλοιποι εντεροϊοί, είναι ανθεκτικοί σε περιβαλλοντικές συνθήκες και στα υγρά του γαστρεντερικού σωλήνα, γεγονός που διευκολύνει τη μετάδοση με την εντεροστοματική οδό. Ο ιός βρίσκεται στο φάρυγγα και στον εντερικό σωλήνα και αποβάλλεται με τα κόπρανα πριν ακόμα εμφανιστούν τα συμπτώματα. Εξαφανίζεται γρήγορα από το φάρυγγα, αλλά η αποβολή του ιού από τα κόπρανα μπορεί να συνεχιστεί ακόμα και ένα μήνα μετά την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η μόλυνση με τον ιό γίνεται από την επαφή με πάσχοντες ή με τα άτομα που αποβάλλουν τον ιό με τα κόπρανα τους. Οι χαμηλές συνθήκες υγιεινής και η διαβίωση σε περιοχές με συγκεντρωμένο πληθυσμό βοηθούν στη μετάδοση του ιού. Μόλυνση των παροχών νερού από τους υπονόμους μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα επιδημίες. Η νόσος είναι πιο συχνή κατά τους θερινούς μήνες σε εύκρατες χώρες. Σε χώρες με χαμηλό υγειονομικό επίπεδο, (όπως τροπικές) η μόλυνση του πληθυσμού με τον ιό της πολιομυελίτιδας γίνεται συνήθως στην παιδική ηλικία λόγω του υψηλού επιπολασμού του ιού.

Η επιτυχής χορήγηση του αντιπολιομυελιτικού εμβολίου μετέβαλε την επιδημιολογία της νόσου σε πολλές χώρες. Στις χώρες που έγινε συστηματική χρήση του εμβολίου η νόσος έχει σχεδόν εξαλειφθεί. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έθεσε από το 1988 ως στόχο την εκρίζωση της νόσου από όλες τις περιοχές του κόσμου που κυκλοφορούσαν λοιμογόνα στελέχη μέχρι το έτος 2000 (WHO, 2004). Με το τέλος του 2002 (Εικόνα 6.1), ο αριθμός των περιστατικών αγρίου τύπου πολιοϊών από 350000 που ήταν μειώθηκε σε λιγότερο από 500 και ο αριθμός των ενδημικών χωρών από 125 σε 7 (Wood και Thorley, 2003; WHO, 2004). Την ίδια περίοδο έχουμε τη διακοπή της μετάδοσης της ασθένειας σε Ευρώπη, Αμερική και σε περιοχές του Δυτικού Ειρηνικού Ωκεανού και 180 χώρες ανακηρύσσονται ως ελεύθερες από πολιοϊούς (polio-free).

AN INCREDIBLE ACHIEVEMENT FOR CHILDREN
MAP OF POLIO ENDEMIC COUNTRIES IN 1988.



Η κατάσταση που επικρατούσε μέχρι το 1988



Στην εικόνα αυτή φαίνεται ποιες χώρες είναι πιστοποιημένες πλέον ως απελευθερωμένες από την ασθένεια, καθώς και ποιες χώρες αντιμετωπίζουν ακόμα πρόβλημα σύμφωνα με τα δεδομένα του 2002.

Στη χώρα μας το 1962 άρχισε η χορήγηση του εμβολίου salk (IPV), το οποίο το 1964 αντικαταστάθηκε από το ζωντανό εμβόλιο Sabin (OPV). Τα αποτελέσματα ήταν θεαματικά. Η νοσηρότητα από πολιομυελίτιδα έπεσε κατακόρυφα. Ο μέσος ετήσιος αριθμός κρουσμάτων από 367 για την πενταετία 1951-55 έπεσε στα δύο κρούσματα για την πενταετία 1975-80. Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 σημειώθηκαν 2 επιβεβαιωμένα κρούσματα της νόσου και στη συνέχεια για μεγάλο χρονικό διάστημα στη χώρα μας είχαμε ελάχιστες περιπτώσεις νόσου που οφείλονταν στον ιό του εμβολίου. Το δεύτερο εξάμηνο του 1996 στην Ελλάδα σημειώθηκαν 5 περιπτώσεις παραλυτικής πολιομυελίτιδας σε παιδιά που δεν είχαν εμβολιαστεί. Το ίδιο χρονικό διάστημα στη γειτονική Αλβανία ήταν σε εξέλιξη επιδημία πολιομυελίτιδας. Μελέτη των απομονωθέντων στελεχών από τις περιπτώσεις πολιομυελίτιδας που σημειώθηκαν στη χώρα μας το 1996 έδειξε ότι επρόκειτο για στελέχη παρόμοια με αυτά της Αλβανίας. Τα στελέχη αυτά πιθανόν εισήχθησαν στη χώρα μας και μόλυναν ανεμβολίαστα παιδιά (F.Frantzidou et al.2005).

5. ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ

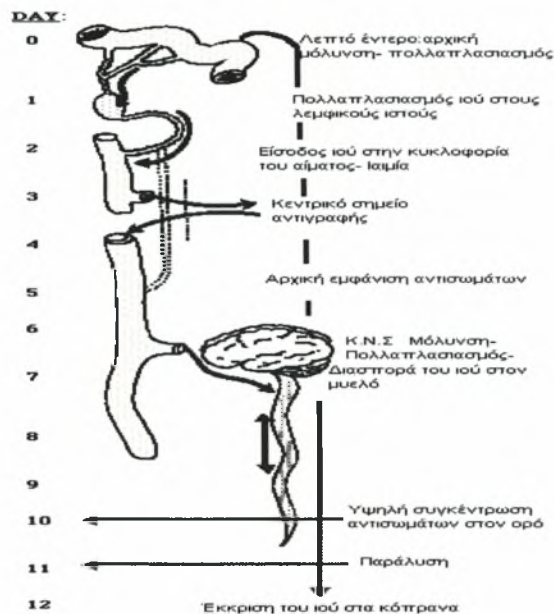
(ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΚΑΡΤΑΛΗ ΣΟΦΙΑ & ΛΕΓΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ & ΜΑΝΙΑΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ, 2005)

Σύμφωνα με το μοντέλο του Sabin:

Πύλη εισόδου του ιού της πολιομυελίτιδας είναι ο εντερικός σωλήνας δια μέσου του στόματος. Ο ιός πολλαπλασιάζεται στο λεμφικό ιστό των αμυγδαλών, του φάρυγγα και κυρίως του λεπτού εντέρου (πλάκες του Peyer).

Με τα λεμφικά αγγεία εισέρχεται στα μεσεντέρια λεμφογάγγλια και από αυτά στο αίμα. Η πρωτοπαθής καιμία διασπείρει τον ιό στους ιστούς διαφόρων οργάνων-στόχων, όπου αυτός πολλαπλασιάζεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση συμπτωμάτων και μιας δευτεροπαθούς καιμίας. Η καιμία συμπίπτει με το τέλος του σταδίου επώασης που μπορεί να κυμαίνεται από 4-35 ημέρες. Σε μια μικρή αναλογία ο ιός μπορεί να

εγκατασταθεί στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) προκαλώντας παραλυτική πολιομυελίτιδα. Ο πολιοϊός έχει περιορισμένο τροπισμό και αναγνωρίζει υποδοχείς στα κύτταρα των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού, ραχιαία ριζιτικά γάγγλια και κινητικούς πυρήνες εγκεφαλικών νεύρων. Ο ιός αναπτύσσεται γρήγορα και προκαλεί άμεση καταστροφή των κυττάρων-στόχων.



Εικόνα 5: μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών

6. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

(ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΚΑΡΤΑΛΗ ΣΟΦΙΑ & ΛΕΓΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ & ΜΑΝΙΑΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ ΙΟΑΝΝΗΣ, 2005)

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η παράλυση είναι μια σπάνια επιπλοκή μίας κατά τα άλλα ήπιας λοίμωξης. Τουλάχιστον το 90% των λοιμώξεων με πολιοϊό είναι ασυμπτωματικές και η λοίμωξη περιορίζεται στο στοματοφάρυγγα και στο έντερο. Σε ένα ποσοστό 5% η νόσος εμφανίζεται ως ήπια μη ειδική νόσος, που χαρακτηρίζεται από πυρετό, αδιαθεσία, πονοκέφαλο και εμέτους και ονομάζεται «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα (abortive poliomyelitis). Οι κλινικές εκδηλώσεις αυτού του συνδρόμου επικεντρώνονται κυρίως στο άνω αναπνευστικό σύστημα (με φαρυγγίτιδα και πυρετό) και στο γαστρεντερικό σύστημα (με ναυτία, διάρροια, πόνους στο υπογάστριο και εμέτους). Δηλαδή με εκδηλώσεις όμοιες με αυτές της απλής γρίπης (CDC, 2002). Περίπου το 10% των ασθενών με «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα αναπτύσσουν ασηπτική μηνιγγίτιδα (aseptic meningitis) ή αλλιώς μη παραλυτική πολιομυελίτιδα. Σ' αυτή την περίπτωση ο ιός φτάνει στο ΚΝΣ και στις μήνιγγες. Τα συμπτώματα για αυτό το σύνδρομο διαρκούν μεταξύ 2 και 10 ημερών και διακρίνονται από ακαμψία του λαιμού, της πλάτης και των κάτω άκρων. Ακολουθείται πλήρης ανάκαμψη του οργανισμού (Rotbart, 1997; CDC, 2002). Η παραλυτική πολιομυελίτιδα συμβαίνει σε ποσοστό μικρότερο από 2% των περιπτώσεων λοίμωξης από πολιοϊούς και εμφανίζεται 3-4 ημέρες μετά την ήπια νόσο. Σε αυτή την περίπτωση ο ιός εισέρχεται από το αίμα στα κύτταρα των πρόσθιων κεράτων του νωτιαίου μυελού και σε κινητικά κέντρα στο φλοιό του εγκεφάλου. Η σοβαρότητα της παράλυσης καθορίζεται από την έκταση της λοίμωξης

των νευρώνων και των προσβληθέντων νευρών. Η παραλυτική πολιομυελίτιδα διακρίνεται σε τρεις τύπους τη νωτιαία παράλυση (spinal paralysis), η οποία χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη παράλυση των κάτω άκρων, τη βολβοειδή ή κρανιακή πολιομυελίτιδα (bulbar), όπου έχουν μολυνθεί νευρώνες του ΚΝΣ, και χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες στην αναπνοή, στη διάρθρωση της ομιλίας, στη κίνηση του οφθαλμού, καθώς και στην κίνηση διαφόρων μυϊκών ομάδων και από τον συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων τύπων η οποία ονομάζεται (bulbospinal paralysis) και συγκεκριμένα στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά την χρονική περίοδο 1969 – 1979 αποτελούσε το 19% των περιπτώσεων παραλυτικής ασθένειας.

Τέλος, ο ιός αποβάλλεται με τα κόπρανα και πριν από την εμφάνιση των συμπτωμάτων. Η αποβολή του ιού από τα κόπρανα μπορεί να συνεχιστεί μέχρι και ένα μήνα από την εμφάνιση των συμπτωμάτων.

7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Η εργαστηριακή διάγνωση και η ταυτοποίηση των πολιοϊών μπορεί να γίνει είτε με τη χρήση των παραδοσιακών μεθόδων (απομόνωση του ιού, οροταυτοποίηση, ανίχνευση αντισωμάτων) είτε με τη χρήση μοριακών τεχνικών (Peter Muir et al.1998 , Nikolaos Siafakas et al. 2001) .

7.1: Παραδοσιακές μέθοδοι για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των πολιοϊών

Απομόνωση του ιού

Η απομόνωση πολιοϊών από κλινικά δείγματα παρέχει μια ισχυρή ένδειξη μόλυνσης από πολιοϊό. Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των πολιοϊών λαμβάνονται κυρίως από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ENY), από φαρυγγικά επιχρίσματα και από κόπρανα. Η απομόνωση του ιού από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη γιατί αποτελεί ένδειξη συστημικής μόλυνσης. Ωστόσο τα πιο ευαίσθητα και ευρέως χρησιμοποιούμενα δείγματα για την απομόνωση των πολιοϊών και γενικότερα των εντεροϊών προέρχονται από κόπρανα. Για την απομόνωση των πολιοϊών χρησιμοποιούνται διάφορες κυτταρικές σειρές όπως : η κυτταρική σειρά L20B που προέρχεται από γενετικά τροποποιημένα ποντίκια τα οποία εκφράζουν τον ανθρώπινο υποδοχέα PVR, (WHO 2004), η κυτταρική σειρά RD (κύτταρα του ανθρώπινου ραβδομυοσάρκωματος) και η κυτταρική σειρά Hep-2 (κύτταρα του επιδερμικού καρκινώματος). Η απομόνωση επιτυγχάνεται μέσω της παρατήρησης κυτταροπαθογόνου δράσεως (CPE).

Οροταυτοποίηση

Μετά την απομόνωση των πολιοϊών ακολουθεί οροτυπική ταυτοποίηση η οποία πραγματοποιείται μέσω εξουδετέρωσης με ειδικό αντιορό για τον κάθε ορότυπο. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ένα τεστ εξουδετέρωσης το οποίο περιέχει συνδιασμούς εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντισωμάτων για την ταυτοποίηση 42 οροτύπων εντεροϊών. Αφού διαβαστεί το πρότυπο εξουδετέρωσης τα αποτελέσματα αξιολογούνται με τη χρήση ειδικών πινάκων. Τέτοια τεστ οροεξουδετέρωσης έχουν δημιουργηθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος (RIVM) στην Ολλανδία.

Ανίχνευση αντισωμάτων

Μια ένδειξη πρόσφατης μόλυνσης παρέχεται από την ανίχνευση ειδικών για πολιοϊούς IgM αντισωμάτων με τη μέθοδο ELISA. Τα IgM αντισώματα παράγονται κατά την πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού.

7.2: Ανίχνευση και ταυτοποίηση των πολιοϊών με μοριακές μεθόδους

Η RT-PCR επιτρέπει την ανίχνευση του ιϊκού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων που στοχεύουν σε συντηρημένες περιοχές του γενόματος. Η μέθοδος αυτή αν και είναι πολύ γρήγορη και ευαίσθητη έχει ένα μειονέκτημα, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την εύρεση του οροτύπου. Για την εύρεση του οροτύπου απαιτείται αλληλούχιση των PCR προϊόντων και σύγκριση της αλληλουχίας τους με ήδη γνωστές αλληλουχίες, ή ανάλυση RFLP των προϊόντων της PCR.

8. ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Υπάρχουν δυο διαθέσιμα εμβόλια το IPV που ανακαλύφθηκε από τον Jonas Salk το 1955 και το OPV που ανακαλύφθηκε το 1963 από τον Albert Sabin.

8.1. IPV(Inactivated Poliovirus Vaccine)

Το εμβόλιο αυτό περιέχει απενεργοποιημένα στελέχη και των τριών οροτύπων των πολιοϊών. Και προκύπτει από την αδρανοποίηση άγριων παθογόνων στελεχών κατόπιν επεξεργασίας με φορμαλδεΰδη. Στο εμβόλιο εμπεριέχονται επίσης και αντιβιοτικά (νεομυκίνη, στρεπτομυκίνη, πολυμυξίνη Β). Το IPV χορηγείται με ενδομυϊκή ένεση, θεωρείται ασφαλές ως εμβόλιο και επάγει την παραγωγή αντισωμάτων στον ορό του αίματος. Ωστόσο δεν μπορεί να εμποδίσει την αντιγραφή του ιού στην περιοχή του εντέρου. Κατά συνέπεια δεν εμποδίζει τη μετάδοση του ιού μέσω των κοπράνων. (Blondel et al.1998).

OPV(Oral Poliovirus Vaccine)

Το OPV περιέχει εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών και των τριών οροτύπων σε αναλογία 10:1:3 (S1:S2:S3). Τα στελέχη αυτά προέκυψαν από επαναλαμβανόμενες καλλιέργειες πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων. Το εμβολιακά στελέχη Sabin 1, Sabin 2 και Sabin 3 έχουν προκύψει από τα νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41, P2/P712/56 και P3/Leon/37 αντίστοιχα. Η εξασθένηση αυτών των στελεχών οφείλεται στη συσσώρευση μεταλλάξεων. Συγκρίνοντας την αλληλουχία των προτύπων εμβολιακών στελεχών με την αλληλουχία του αντίστοιχου πατρικού στελέχους ή με νευρομολυσματικά στελέχη που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιοιμυελίτιδας (VAPP) μπορεί να εξηγηθεί η μοριακή βάση της εξασθένησης ή της μεταστροφής των εμβολιακών στελεχών. Οι μεταλλάξεις εκείνες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξασθένηση ή στη μεταστροφή παρουσιάζονται στην εικόνα 8.2.1. Το OPV χορηγείται από το στόμα και παρέχει ανοσία μεγάλης χρονικής διάρκειας, προκαλώντας ενεργή μόλυνση. Επίσης τα στελέχη Sabin εξαπλώνονται μέσα στον πληθυσμό διεγείροντας την ανοσιακή

των εμβολιακών στελεχών σε νευροτοξικά, ή μέσω γενετικού ανασυνδιασμού. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε νευροτοξικά εντοπίζονται κυρίως στις περιοχές 5'UTR και στη VP1 και για τους τρεις οροτύπους. (Georgescu et al.1997, Martin and Minor 2002). Τα περισσότερα στελέχη που έχουν απομονωθεί από περιπτώσεις VAPP προέρχονται από τα στελέχη PV-2/Sabin και PV-3/Sabin . Προφανώς αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι για την εξασθένηση των στελεχών PV-1/Sabin απαιτείται πολύ μεγαλύτερος αριθμός μεταλλάξεων συγκριτικά με τα άλλα δυο στελέχη. Ο ανασυνδιασμός μπορεί να συμβεί i) μεταξύ εμβολιακών στελεχών , ii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών και πολιοϊών αγρίου τύπου και iii) μεταξύ εμβολιακών στελεχών και άλλων εντεροϊών και έχει προταθεί ότι προσδίδει πλεονεκτήματα στον πολλαπλασιασμό των στελεχών. (Friedrich 2000). Ο ανασυνδιασμός πραγματοποιείται κυρίως στις κωδικές περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών και όχι στην περιοχή των δομικών πρωτεϊνών (Guillot et al 2000) εκτός από το τέλος της P1 στην οποία έχουν παρατηρηθεί ανασυνδιασμοί (Blomqvist et al.2003, Cherkasova et al 2002, Martin et al 2002).

9. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΕΞΕΛΙΞΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Η μεγάλη γενετική ποικιλομορφία των πολιοϊών οφείλεται στις μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της αντιγραφής και στον γενετικό ανασυνδιασμό.

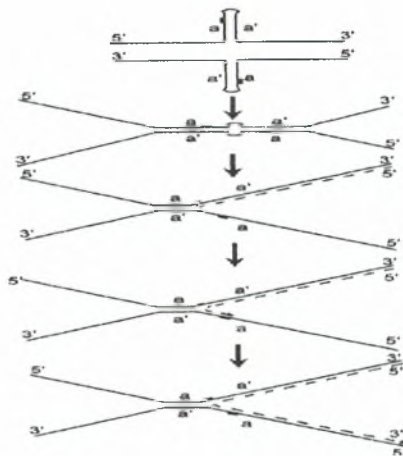
9.1. Μεταλλάξεις

Οι πολιοϊοί εμφανίζουν υψηλό αριθμό συσσώρευσης μεταλλάξεων (6.3×10^{-4} μεταλλάξεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής) (Wimmer et al. 1993) Το γεγονός αυτό οφείλεται σε δυο παραμέτρους (i) η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση 3D^{pol} είναι επιρρεπής σε λάθη και ενσωματώνει 10^{-4} έως 10^{-5} νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις ανά βάση ανά κύκλο αντιγραφής και (ii) στην απουσία μηχανισμών επιδιόρθωσης. Αυτό έχει ως συνέπεια ότι οι πολιοϊοί υπάρχουν ως πληθυσμοί πολλών διαφορετικών γενοτύπων (quasi-species). Οι περισσότερες μεταλλάξεις εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 (οι οποίες βρίσκονται στο εξωτερικό του καψιδίου και δέχονται αντιγονική πίεση) καθώς και στην 5'UTR (με εξαίρεση τις cis δραστικές περιοχές 5'cloverleaf και IRES . Κάποιες από αυτές τις μεταλλάξεις θεωρούνται υπεύθυνες για τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε νευρομολυσματικά (Georgescu et al 1997, Friedrich 2000, Martin and Minor 2002). Από τις δομικές πρωτεΐνες η VP1 συγκεντρώνει τις περισσότερες μεταλλάξεις πιθανόν γιατί συμμετέχει στη δημιουργία των περισσότερων αντιγονικών θέσεων. Όσον αφορά στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται στις δομικές πρωτεΐνες υπάρχουν περιορισμοί στις περιοχές που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα. Βέβαια οι περιοχές αυτές δεν βρίσκονται εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και δεν δέχονται αντιγονική πίεση.

9.2.Γενετικός ανασυνδιασμός

Ο γενετικός ανασυνδιασμός των πολιοϊών λαμβάνει χώρα σε κύτταρα που έχουν μολυνθεί ταυτόχρονα με διάφορα ιικά στελέχη. Τα στελέχη αυτά μπορεί να ανήκουν στον ίδιο ορότυπο οπότε αναφερόμαστε σε ενδότυπο ανασυνδιασμό ή σε διαφορετικό ορότυπο οπότε αναφερόμαστε σε διάτυπο ανασυνδιασμό. Τα περισσότερα ανασυνδιασμένα στελέχη πολιοϊών που έχουν βρεθεί έχουν προέλθει από γενετικό

ανασυνδιασμό μεταξύ εμβολιακών στελεχών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το OPV περιέχει και τα 3 Sabin στελέχη τα οποία έχουν την ευκαιρία να ανασυνδιαστούν στον ανθρώπινο οργανισμό. Ανασυνδιασμένα Sabin στελέχη έχουν βρεθεί σε υγιείς εμβολιασμένους ανθρώπους (Blomqvist et al.2003) αλλά και σε ασθενείς με VAPP (εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα) (Guillot et al.2000). Έχουν προταθεί 2 μηχανισμοί γενετικού ανασυνδιασμού : i) ο αντιγραφικός μηχανισμός και ii) ο μηχανισμός σπασίματος και επανένωσης . Ο αντιγραφικός μηχανισμός αναφέρεται και ως μηχανισμός αλλαγής μήτρας. Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό η σύνθεση του συμπληρωματικού κλώνου ξεκινά πάνω σ'ένα κλώνο , σταματά και συνεχίζει ξανά σ'ένα άλλο κλώνο. Αν η μετάβαση από τον ένα κλώνο στον άλλο είναι ακριβής τότε ο ανασυνδιασμός είναι ομόλογος αν όμως δεν είναι ακριβής ο ανασυνδιασμός είναι μη ομόλογος και έχει αντίκτυπο στη βιωσιμότητα των νέων στελεχών. (Kirkegaard K. And Baltimore D. 1986). Μηχανισμός σπασίματος και επανένωσης: τα ανασυνδιασμένα γενώματα προέρχονται από τη σύνδεση μορίων RNA που έχουν προέλθει από τη διάσπαση και ένωση διαφορετικών πατρικών μορίων RNA.



Εικόνα 9.2.1: Μηχανισμός αλλαγής μήτρας για τον ανασυνδιασμό μεταξύ RNA γενωμάτων

Σκοπός της εργασίας :

Σκοπός της εργασίας ήταν η μελέτη της αντιγονικής εξέλιξης εμβολιακών στελεχών πολιοϊών και ο προσδιορισμός των ανοσολογικών τους ιδιοτήτων

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1.ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής δείγματα:

ΔΕΙΓΜΑ	ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ 5'-UTR	Recom.Type& junction	Προέλευση δείγματος
I34 (V1)	P2	S2	S2/S1/S2/S1 4984-4994(number S2), 5999-6005(number S1), 6388-6389(number S2)	VAPP
580 (V2)	P2	S2	S2/S1 5314-5318 (number S2)	
730 (V3)	P2	S2	S2/S1 6337-6362 (number S2)	
ID (V4)_	P2	S2	S2/S1 5521-5526 (number S2)	VAPP
IF (V5)	P2	S2	S2/S1 6247-6281 (number S2)	Healthy vaccinee
591 (V6)	P3	S3	S3/S2/S3 4643-4656(number S3), 6535-6563(number S2)	VAPP
590 (V7)	P3	S3	S3/S2/S3 4643-4656(number S3), 6598-6605(number S2)	Healthy vaccinee
738 (V8)	P3	S3	S3/S2/S1 5804-5814 (number S3), 6901-6909 (number S2)	
584 (V9)	P3	S3	S3/S2/S1 4449-4464 (number S3), 7150-7172 (number S2)	
581 (V10)	P3	S3	S3/S2/S3 4643-4656 (number S3), 6598-6605(number S2)	Healthy vaccinee
IK (V11)	P3	S3	S3/S2 3275-3285 (number S3)	Ουδετεροπενία
744 (V12)	P3	S3	S3/S2 4892-4914 (number S3)	
829 (V13)	P3	S3	S3/S1 4880-4887 (number S3)	
7 (V15)	P1(VDPV)	S1	VDPV (S1/HEV-C) 2A	Περιβάλλον
Sabin1	P1	S1		
Sabin2	P2	S2		
Sabin3	P3	S3		

Πίνακας 1.1

Ο ορότυπος των δειγμάτων έγινε γνωστός με τη διαδικασία της οροεξουδετέρωσης (περισσότερες πληροφορίες αναφέρονται παρακάτω). Ο τύπος του ανασυνδιασμού έγινε γνωστός έπειτα από αλληλούχηση των δειγμάτων η οποία πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen. .

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν σειριακές αραιώσεις των δειγμάτων οι οποίες κυμαίνονται από 10^{-1} έως 10^{-10} . Οι σειριακές αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε erppendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D. Στο πρώτο erppendorf τοποθετήθηκαν 180μl MEM-D και 20μl από το δείγμα ,στο δεύτερο erppendorf τοποθετήθηκαν 180μl MEM-D ΚΑΙ 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erppendorf κ.ο.κ. Το περιεχόμενο των erppendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης οι οποίες περιείχαν κύτταρα Her2 με θρεπτικό υλικό MEM-D. Η κάθε αραιώση ενοφθαλμίστηκε εις διπλούν προκειμένου να είναι πιο αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Οι πλάκες στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση του χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE:cytopathic effect). Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας με τη μεγαλύτερη αραιώση στην οποία εμφανίστηκε CPE ενοφθαλμίστηκε σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειών που περιείχαν κύτταρα Her2 και θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% ορό. Οι φιάλες επωάστηκαν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE. Μετά την παρατήρηση CPE, οι φιάλες κυτταροκαλλιέργειών διατηρήθηκαν στους -20°C .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
B	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
C	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
D	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
E	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
F	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
G	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M
H	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	M	M

Εικόνα 2.1 : πλάκα μικροτιτλοποίησης . Η κάθε πλάκα χρησιμοποιείται για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων. Στις οριζόντιες σειρές A και B τοποθετείται το πρώτο δείγμα. Στις σειρές C και D το δεύτερο κ.ο.κ. Στις 2 τελευταίες κάθετες σειρές (11 και 12) τοποθετούνται οι μάρτυρες (κύτταρα Her2 και θρεπτικό υλικό MEM-D) Οι αριθμοί υποδηλώνουν τις σειριακές αραιώσεις των δειγμάτων.

3. ΕΥΡΕΣΗ ΟΡΟΤΥΠΟΥ

Η εύρεση του οροτύπου πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία της οροεξουδετέρωσης. Συγκεκριμένα για την ταυτοποίηση του οροτύπου χρησιμοποιήθηκε ορός ειδικών πολυκλωνικών αντισωμάτων κουνελιού έναντι των οροτύπων P1, P2, P3. (National Institute for Public Health and the Environment, RIVM, the Netherlands) Αρχικά έγινε η προετοιμασία των ορών: Κάθε vial του RIVM poliovirus typing antiserum περιέχει 0,5 ml αντιορό κουνελιού ειδικό για έναν από τους τρεις οροτύπους (P1,P2,P3). Το περιεχόμενο κάθε vial πρέπει να αραιωθεί σε 63,5ml θρεπτικού υλικού (MEM-D) ώστε να έχουμε 64ml αντιορού με συγκέντρωση 1:128. Στη συνέχεια δημιουργήθηκε ένα μίγμα που περιέχει αντισώματα και για τους τρεις οροτύπους και το οποίο περιείχε 10ml από κάθε αραιωμένο αντιορό.(pool polio). Έπειτα ακολούθησε η διαδικασία της οροεξουδετέρωσης η οποία πραγματοποιήθηκε σε πλάκα μικροτιλοποίησης. Σε κάθε πλάκα τοποθετήθηκαν 4 δείγματα και χρησιμοποιήθηκαν οι οριζόντιες σειρές C –F. Αρχικά τοποθετήθηκαν 100μl θρεπτικού υλικού MEM-D στις κάθετες σειρές 10 και 11, που αντιστοιχούν στα virus control και cell control αντίστοιχα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν 100μl από τους αντιορούς στις κάθετες σειρές από την θέση 2 έως και την θέση 9. Συγκεκριμένα στα πηγαδάκια που αντιστοιχούν στις κάθετες σειρές 2 και 3 τοποθετήθηκε το μίγμα των αντιορών (pool polio) που περιέχει αντισώματα έναντι και των τριών οροτύπων P1,P2,P3. Στις κάθετες σειρές 4 και 5 τοποθετήθηκε ο αντιορός που περιέχει αντισώματα έναντι του οροτύπου P1, στις θέσεις 6 και 7 ο αντιορός που περιέχει αντισώματα έναντι του οροτύπου P2 και στις θέσεις 8 και 9 τοποθετήθηκε ο αντιορός έναντι του οροτύπου P3. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα δείγματα των ιών (100μl – 100TCID₅₀) . Κάθε οριζόντια σειρά αντιστοιχεί σε ένα δείγμα (σειρές C έως F). Έπειτα ακολούθησε επώαση για 1 ώρα στους 37⁰C με σκοπό την αλληλεπίδραση του ιού με τα εξουδετερωτικά αντισώματα. Μετά την επώαση προστέθηκαν 100μl κύτταρα Hep2 με θρεπτικό μέσο MEM-D. Ακολούθησε επώαση στους 37⁰C μέχρι την εμφάνιση CPE. Αν για παράδειγμα το δείγμα 1 (Δ1) αντιστοιχεί στον ορότυπο P1 δεν περιμένουμε να εμφανίσει CPE στις θέσεις που αντιστοιχούν στο pool polio (C2,C3) και στις θέσεις C4,C5 που αντιστοιχούν στον αντιορό έναντι του οροτύπου P1. Για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων λάβαμε υπόψη την κατάσταση των μαρτύρων cell control(100μl MEM-D και 100μl κύτταρα Hep2) και των virus control(100μl MEM-D,100 TCID₅₀ και 100μl κύτταρα Hep2)

	← pool polio →			← P1 →		← P2 →		← P3 →		V.C.	C.C.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
Δ1 C												
Δ2 D												
Δ3 E												
Δ4 F												
G												
H												

Εικόνα 3.1 : πλάκα οροεξουδετέρωσης. Κάθε πλάκα χρησιμοποιείται για τον ενοφθαλμισμό τεσσάρων δειγμάτων. (Δ1-Δ4) στο σχήμα διακρίνονται οι θέσεις (κάθετες σειρές) που αντιστοιχούν σε κάθε αντιορό (pool polio, P1,P2,P3) καθώς και οι θέσεις που αντιστοιχούν στα control (virus και cell controls).

4. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του RNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Casas (Casas et al. 1995). Σε eppendorf των 2ml τοποθετήθηκαν 600μl Lysis Buffer (4M GuSCN, 0,5% N-laurosyl sacrosine, 1mM dithiothreitol και 25mM sodium citrate), 10μl γλυκογόνου (4×10^3 μg/ml)(-20°C) και 200μl δείγματος από τη καλλιέργεια. Ακολούθησε vortex του μίγματος και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 800μl ισοπροπανόλης (-20°C) ,ακολούθησε vortex και επώαση για 20 λεπτά στον πάγο. Έπειτα ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 1ml αιθανόλης 70%. Ακολούθησε και δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 200μl ddH₂O. Τα eppendorf φυλάχθηκαν στους -20°C.

5. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Το εκχύλισμα του RNA υποβάλλεται σε αντίστροφη μεταγραφή για την παραγωγή cDNA. Η αντίδραση αυτή στηρίζεται στην ικανότητα της αντίστροφης μεταγραφάσης να συνθέτει DNA από RNA-μήτρα. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για να ακολουθήσει η PCR.

Αρχικά προετοιμάζουμε ένα μίγμα το οποίο περιέχει τυχαίους εκκινητές random primers d(N9) (Takara), (50nmol/μl), (1μl/tube), 10mM dNTPs (1μl/tube) και ddH₂O (5μl/tube). Τα συγκεκριμένα εκκινητικά μόρια έχουν μήκος 6 νουκλεοτιδίων τυχαίας αλληλουχίας ,ώστε να μπορούν να προσδεθούν σε όλο το γένωμα του ιού. Στη συνέχεια σε eppendorf των 500μl προστέθηκαν 7μl/tube από το παραπάνω μίγμα και 5μl RNA από την εκχύλιση. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 65°C για 5 λεπτά. Σκοπός της επώασης είναι η αποδιάταξη των μορίων RNA για να μπορέσουν να υβριδιστούν με τα random primers (τυχαίοι εκκινητές). Μετά την επώαση τα eppendorf τοποθετούνται στον πάγο προκειμένου να επαναδιαταχθούν τα υβριδισμένα μόρια RNA και προετοιμάζεται ένα δεύτερο μίγμα το οποίο περιέχει 5X first stand buffer (4μl/tube), 0,1M DTT(2μl/tube) και RNase out (40units/μl),(0,5μl/tube). Στη συνέχεια προστέθηκαν 7μl από το δεύτερο μίγμα σε κάθε eppendorf και ακολούθησε ξανά φυγοκέντρηση και επώαση των eppendorf στους 37°C για 2 λεπτά. Τέλος σε κάθε eppendorf προστέθηκε 0,5μl MMLV-RT (200units/μl) (Invitrogen) και ακολούθησε επώαση για 10 λεπτά στους 25°C ,για 50 λεπτά στους 37°C και 15 λεπτά στους 70°C.

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μιας συγκεκριμένης περιοχής του γενώματος με τη χρήση κατάλληλων εκκινητικών μορίων (primers). Για την ενίσχυση της VP1 περιοχής χρησιμοποιήθηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για την αποτελεσματική αλληλούχιση ολόκληρης της περιοχής (επειδή η αλληλουχία της VP1 ήταν αρκετά μεγάλη κρίθηκε απαραίτητο να εξεταστεί ξεχωριστά σε δυο τμήματα). Για την ενίσχυση του πρώτου μισού της VP1 χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών UG1/222 ενώ για την ενίσχυση του δεύτερου μισού τμήματος της VP1 χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (S₁37/S₁688, S₂30/S₂688, S₃26/S₃651) ειδικά για κάθε ένα από τα τρία στελέχη Sabin (S₁,S₂,S₃).

Εμβολιακό στέλεχος	Μήκος PCR προϊόντος σε bp	Primer sense 5'→3'	Primer antisense 3'→5'
S1	568	UG1:2402-TTTGTGTCAGCGTGTAAATG-2421	222:2951-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2969
S2	568	UG1:2404-TTTGTGTCAGCGTGTAAATG-2423	222:2953-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2971
S3	568	UG1:2399-TTTGTGTCAGCGTGTAAATG-2418	222:2948-TACAWRYAIGGIGGCCIC-2966
S1	652	S ₁ 37:2837-AGGAAATTGGAGTTCCTCACC-2857	S ₁ 688:3468-TTTTGCCTCACTTGCAGTACA-3488
S2	659	S ₂ 30:2830-CAACTGAGACGCAAACTGGA-2849	S ₂ 688:3469-TTACGGCACTCACAGTACAC-3488
S3	626	S ₃ 26:2826-GCCGTAAGTTGGAGTTTTTCAC-2847	S ₃ 651:3430-GATGGTAGAGCGGTGATTCTC-3451

Πίνακας 6.1: Στις τρεις πρώτες οριζόντιες σειρές παρατίθενται πληροφορίες για το ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του πρώτου μισού τμήματος της VP1 περιοχής, ενώ στις επόμενες σειρές παρατίθενται πληροφορίες για τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του δεύτερου μισού της VP1. Η τρίτη και η τέταρτη στήλη αναφέρονται στις θέσεις στις οποίες υβριδίζονται οι εκκινητές.

Σε κάθε μικροσωληνάριο (των 200μl) προστέθηκαν 47μl. Στον όγκο αυτό περιέχονται : 5μl διαλύματος dNTPs 10mM (τελική συγκέντρωση 1mM), 2μl διαλύματος MgCl₂ 50mM (τελική συγκέντρωση 2mM), 5μl ρυθμιστικού διαλύματος (Taq Buffer 10x), 2μl εκκινητών (1μl από τον sense και 1μl από τον antisense σε συγκέντρωση 50pmol/μl), 2 Units ενζύμου Taq πολυμεράσης (Biotaq) και ddH₂O μέχρι τελικού όγκου 47 μl. Τέλος σε κάθε μικροσωληνάριο προστέθηκαν 3μl cDNA από το αντίστοιχο δείγμα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

1 κύκλος	5 λεπτά στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
40 κύκλους για UG1/222, 35 κύκλους για S ₁ 37/S ₁ 688, S ₂ 30/S ₂ 688, S ₃ 26/S ₃ 651)	-20 δευτερόλεπτα στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA. -20 δευτερόλεπτα στους 45 °C για τον υβριδισμό των primers στους κλώνους του cDNA (45 °C για UG1/222, 55 °C για S ₁ 37/S ₁ 688, S ₂ 30/S ₂ 688, S ₃ 26/S ₃ 651 -20 δευτερόλεπτα στους 74 °C για την επιμήκυνση των κλώνων από την Taq πολυμεράση
1 κύκλος	15 λεπτά στους 78 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης (INVITROGEN AGAROSE) συγκέντρωσης 2% [1,2gr/αγαρόζης /60ml TBE (Tris Boric EDTA)]. Επίσης προστέθηκαν στο gel 85μl βρωμιούχου αιθιδίου (1μg/μl). Στα πηγαδάκια του πηκτώματος φορτώθηκαν 10μl από κάθε προϊόν της PCR(στο οποίο προστέθηκε κατάλληλη χρωστική). Στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος τοποθετήθηκαν 5μl από το μάρτυρα μοριακού βάρους (ΦΧ174). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στα 200V.

8. ΕΥΡΕΣΗ ΤΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR

Η αλληλούχιση των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε από την εταιρία Macrogen στην Κορέα.

9. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ ΜΕ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχισης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής προγράμματα : **clustalw**, **Gene Runner V.3.05** και **το Rasmol V.2.7.1.1**

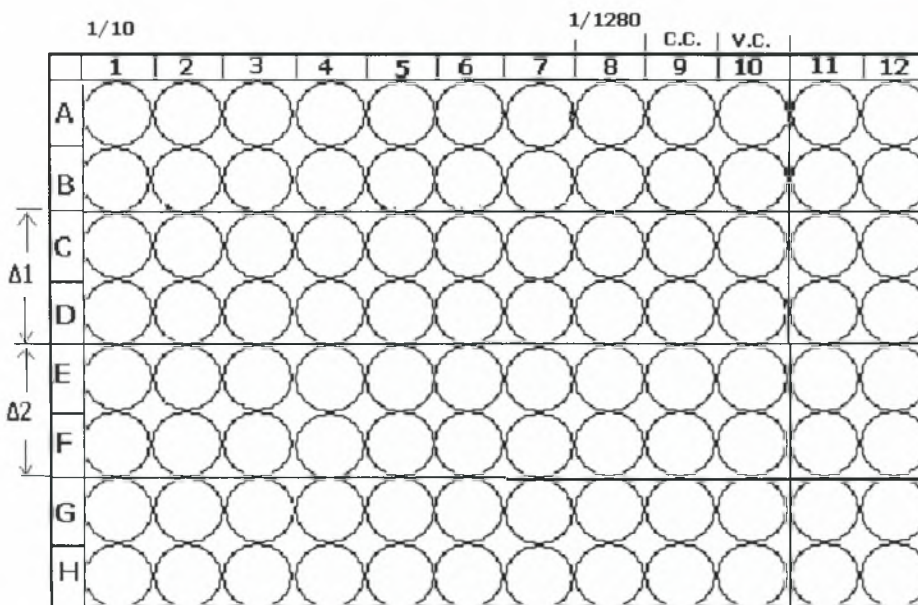
Το **clustalw** επιτρέπει τη στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και κατά συνέπεια και την εύρεση ομοιοτήτων ή διαφορών. Αρχικά πραγματοποιήθηκε στοίχιση του πρώτου και του δεύτερου μισού της VP1 ξεχωριστά με ολόκληρη την αλληλουχία της VP1 του πρότυπου στελέχους. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε συρραφή του πρώτου και του δεύτερου μισού της VP1 με τη βοήθεια του προγράμματος Gene Runner V.3.05 (πληροφορίες για το πρόγραμμα βλ παρακάτω). Έπειτα ολόκληρη πλέον η VP1 αλληλουχία του κάθε δείγματος στοιχίστηκε με την αλληλουχία VP1 του αντίστοιχου πρότυπου στελέχους και εντοπίστηκαν οι νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των δυο αλληλουχιών. Τέλος με το clustalw πραγματοποιήθηκε και η στοίχιση των αμινοξικών αλληλουχιών των περιοχών VP1 των δειγμάτων με τις αλληλουχίες της VP1 περιοχής των αντίστοιχων κατατεθειμένων πρότυπων στελεχών με σκοπό των εντοπισμό αμινοξικών αλλαγών.

Gene Runner: Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τη μετάφραση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των VP1 περιοχών των δειγμάτων σε έξι πιθανά πλαίσια ανάγνωσης. Από αυτά τα πλαίσια ανάγνωσης επιλέχτηκε εκείνο που δεν περιείχε κωδικόνιο λήξης. Επίσης με το πρόγραμμα αυτό πραγματοποιήθηκε η συρραφή των δυο τμημάτων της VP1 για κάθε δείγμα.

Rasmol V.2.7.1.1: με τη χρήση αυτού του προγράμματος πραγματοποιήθηκε η τρισδιάστατη απεικόνιση της VP1 και των αμινοξικών αλλαγών. Για την απεικόνιση της δομής της VP1 των Sabin1 στελεχών χρησιμοποιήθηκε η κατατεθειμένη pdb δομή 1ASJ.pdb(πολιοϊός αγρίου τύπου 1) ομοίως και για τα Sabin2 στελέχη. Για τα sabin 3 στελέχη χρησιμοποιήθηκε η κατατεθειμένη pdb δομή : 1VBE.

10. ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΜΕ ΟΡΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 11 δείγματα ορών ηλικίας 1-10 ετών , 15 δείγματα ηλικίας 11-20 ετών , 21 δείγματα ηλικίας 21-30 ετών και 24 δείγματα ηλικίας 31-40 ετών. Οι οροί από κάθε ένα από τα παραπάνω ηλικιακά group αναμίχθηκαν μεταξύ τους και έτσι δημιουργήθηκαν 4 pool ορών όπου το καθένα αναλογεί στο αντίστοιχο group. Το περιεχόμενο που χρησιμοποιήθηκε από κάθε pool αραιώθηκε 1/10 σε υλικό MEM-D και επώαστηκε στους 56⁰C για 50 λεπτά με σκοπό την αδρανοποίηση του συμπληρώματος. Σε μικροπλάκα τιτλοποίησης τοποθετήθηκαν εις διπλούν στη θέση 1 200μl του αραιωμένου (1/10) και αδρανοποιημένου ορού και στις θέσεις 2 μέχρι και 7 τοποθετήθηκαν 100μl υλικό κυτταροκαλλιέργειας MEM-D. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν από τη θέση 1 100μl στη θέση 2 και κατόπιν αναμιγνύοντας διαδοχικά μέχρι τη θέση 8. Με αυτόν τον τρόπο επιτεύχθηκε αραιώση του ορού από 1/10 (θέση 1) μέχρι 1/1280 στη θέση 8. Στη θέση 9 τοποθετήθηκαν 100μl υλικό MEM-D και 100μl αραιωμένου ορού και στη θέση 10 100μl υλικό MEM-D. Έπειτα προστέθηκαν σε όλες τις θέσεις 100 TCID₅₀/ 100μl από το αντίστοιχο δείγμα εκτός της θέσεως 9 που αποτελεί το cell control. Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση στους 37⁰C για 1 ώρα υπό αργή ανάδευση. Μετά την επώαση προστέθηκαν σε όλα τα πηγαδάκια τα κύτταρα σε συγκέντρωση περίπου 10.000/well ανά 100μl και οι πλάκες τοποθετήθηκαν ξανά για επώαση στους 37⁰C . Οι πλάκες παρακολουθήθηκαν καθημερινά και καταγράφονταν τα αποτελέσματα μέχρι και δυο μέρες μετά την εμφάνιση πλήρους καταστροφής στο virus control, ελέγχοντας παράλληλα και την κατάσταση των μαρτύρων (cell control, virus control θέσεις 9 και 10 αντίστοιχα) .



Εικόνα 10: Πλάκα οροεξουδετέρωσης , σε κάθε πλάκα εξετάζονται δυο δείγματα (Δ1,Δ2) τα οποία καταλαμβάνουν το καθένα από 2 οριζόντιες σειρές (C&D,E&F αντίστοιχα). Το pool των ορών με συγκέντρωση 1/10 που αντιστοιχεί στη θέση 1 υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις μέχρι την αραιώση 1/1280 που αντιστοιχεί στη θέση 8. Στις θέσεις 9 και 10 βρίσκονται οι μάρτυρες :cell control(c.c) και virus control (v.c) αντίστοιχα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΟΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ:

ΔΕΙΓΜΑ	POLIO POOL	P1	P2	P3	ΟΡΟΤΥΠΟΣ
591(V6)	Π	K	K	Π	P3
590(V7)	Π	K	K	Π	P3
134(V1)	Π	K	Π	K	P2
738(V8)	Π	K	K	Π	P3
742(V14)	Π	Π	K	K	P1
584(V9)	Π	K	K	Π	P3
581(V10)	Π	K	K	Π	P3
IK(V11)	Π	K	K	Π	P3
7(V15)	Π	Π	K	K	P3
580(V2)	Π	K	Π	K	P2
730(V3)	Π	K	Π	K	P2
ID(V4)	Π	K	Π	K	P2
IF(V5)	Π	K	Π	K	P2
744 (V12)	Π	K	K	Π	P3
8029 (V13)	Π	K	K	Π	P3
S1	Π	Π	K	K	P1
S2	Π	K	Π	K	P2
S3	Π	K	K	Π	P3

Το Π δηλώνει προστασία , ενώ το K δηλώνει καταστροφή των κυττάρων. Προστασία των κυττάρων από καταστροφή (CPE) έχουμε στις περιπτώσεις που ο ιός εξουδετερώνεται από ειδικά αντισώματα που αναγνωρίζουν τον ορότυπο του.

2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ:

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων στοιχήθηκαν με τις αλληλουχίες των αντίστοιχων κατατεθειμένων πρότυπων στελεχών με τη χρήση του προγράμματος clustalw με σκοπό την εύρεση νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων.

Παρακάτω παρατίθεται ένα παράδειγμα στοιχίσης της αλληλουχίας της VP1 του δείγματος 7 με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin1.

```

7VP1      GGGTTAGGTCAGATGCTTGAAGCATGATTGACAACACAGTCCGTGAAACGGTGGGGGC 59
VP1S1     GGGTTAGGTCAGATGCTTGAAGCATGATTGACAACACAGTCCGTGAAACGGTGGGGGC 59
*****

7VP1      GGCGACGTCTAGAGACGCTCTCCCAAACTGAAGCCAGTGGACCAGCAGCACTCCAAGGA 120
VP1S1     GGCAACGTCTAGAGACGCTCTCCCAAACTGAAGCCAGTGGACCAGCAGCACTCCAAGGA 119
*** *****

7VP1      AATTCGGCACTCACCAGCGTGGAGACTGGGGCCACAAATCCACTAATCCCTTCTGATAC 180
VP1S1     AATTCGGCACTCACCAGCGTGGAAACTGGGGCCACAAATCCACTAGTCCCTTCTGATAC 179
*****

7VP1      AGTGCAAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTT 240
VP1S1     AGTGCAAACCAGACATGTTGTACAACATAGGTCAAGGTCAGAGTCTAGCATAGAGTCTTT 239
*****

7VP1      CTTCGCGCGGGTGCATGCGTGGCCATTATGACCGTGGATAAECTCAGCCTCCACCGAGAA 300
VP1S1     CTTCGCGCGGGTGCATGCGTGGCCATTATAACCGTGGATAAECTCAGCCTCCACCAAGAA 299
*****

7VP1      CAAGGATAAGTTATTGTCAGTGTGAAGATCAGTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAG 360

```

```

VP1S1      TAAGGATAAGCTATTTACAGTGTGGAAGATCACTTATAAAGATACTGTCCAGTTACGGAG 359
          *****
7VP1      GAAATTTGGAGTTCCTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAATTTACCTTTGTGGTTACTGC 420
VP1S1     GAAATTTGGAGTTCCTCACCTATTCTAGATTTGATATGGAATTTACCTTTGTGGTTACTGC 419
          *****
7VP1      AAATTTTACTGAGACTAACAAATGGGCATGCCTTAAATCAAGTGTACCAAATATGTACGT 480
VP1S1     AAATTTTACTGAGACTAACAAATGGGCATGCCTTAAATCAAGTGTACCAAATATGTACGT 479
          *****
7VP1      ACCACCAGGCCTCCAGTGCCTGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAA 540
VP1S1     ACCACCAGGCCTCCAGTGCCTGAGAAATGGGACGACTACACATGGCAAACCTCATCAA 539
          *****
7VP1      TCCATCAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCCGGATCTCGGTGCCATATGTTGG 600
VP1S1     TCCATCAATCTTTTACACCTACGGAACAGCTCCAGCCCGGATCTCGGTACCCTATGTTGG 599
          *****
7VP1      TATTTTGAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCACTGAAAGACCA 660
VP1S1     TATTTTGAACGCCTATTACACTTTTACGACGGTTTTTCCAAAGTACCACTGAAAGACCA 659
          *****
7VP1      GTCGGCAGCACTAGGTGATTCCTCTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACATCGGTATTTT 720
VP1S1     GTCGGCAGCACTAGGTGACTCCCTCTATGGTGCAGCATCTCTAAATGACTTCGGTATTTT 719
          *****
7VP1      GGCTGTAGAGTAGTCAATGATCACAAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGT 780
VP1S1     GGCTGTAGAGTAGTCAATGATCACAAACCCGACCAAGGTCACCTCCAAAATCAGAGTGT 779
          *****
7VP1      TCTAAACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGCTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTA 840
VP1S1     TCTAAACCCAAACACATCAGAGTCTGGTGCCCGCTCCACCGAGGGCAGTGGCGTACTA 839
          *****
7VP1      CGGCCCTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACACTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGAC 900
VP1S1     CGGCCCTGGAGTGGATTACAAGGATGGTACACTTACACCCCTCTCCACCAAGGATCTGAC 899
          *****
7VP1      CACATAT 907
VP1S1     CACATAT 906
          *****

```

Τα αστεράκια που βρίσκονται κάτω από τα στοιχισμένα νουκλεοτίδια δηλώνουν ομοιότητα, ενώ τα κενά δηλώνουν σημειακές μεταλλάξεις .

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας των δειγμάτων(η εύρεση της οποίας πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Gene Runner) με την αλληλουχία των αντίστοιχων πρότυπων στελεχών με τη χρήση του προγράμματος clustalw. Παρακάτω παρατίθεται η στοίχιση της αμινοξικής αλληλουχίας του δείγματος 7 με την αλληλουχία του πρότυπου στελέχους Sabin1.

```

7VP1      GLGQMLSEMDNTVRETVGAATSRDALPNTEASGPAHSKEIPALTAVETGATNPLIPSDT 60
VP1_S1    GLGQMLSEMDNTVRETVGAATSRDALPNTEASGPAHSKEIPALTAVETGATNPLVPSDT 60
          *****
7VP1      VQTRHVVQHRSRSESSIESFFARGACVAIMTVDNSASTENKDKLFAVWKITYKDTVQLRR 120
VP1_S1    VQTRHVVQHRSRSESSIESFFARGACVAIITVDNSASTKNKDKLFTVWKITYKDTVQLRR 120
          *****
7VP1      KLEFFTYSRFDMEFFTVVTANFTETNNGHALNQVYQIMYVPPGAPVPEKWDYDTWTSSN 180
VP1_S1    KLEFFTYSRFDMEFFTVVTANFTETNNGHALNQVYQIMYVPPGAPVPEKWDYDTWTSSN 180
          *****
7VP1      PSIFYTYGTAPARISVPYVGISNAYSHFYDGFVSKVPLKQSAALGDSLYGAASLNDIGIL 240
VP1_S1    PSIFYTYGTAPARISVPYVGISNAYSHFYDGFVSKVPLKQSAALGDSLYGAASLNDIFGIL 240
          *****
7VP1      AVRVDNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPPRAVAYYGPVDYKDGTLTPLSTKDLT 300
VP1_S1    AVRVDNDHNPTKVTSKIRVYLKPKHIRVWCPRPPRAVAYYGPVDYKDGTLTPLSTKDLT 300
          *****
7VP1      TY 302
VP1_S1    TY 302
          **

```

Τα αστεράκια δηλώνουν ομοιότητα. Τα κενά δηλώνουν αμινοξική αλλαγή, ο συμβολισμός : δηλώνει αντικατάσταση αμινοξέος με παρόμοιες ιδιότητες .

Η ίδια διαδικασία νουκλεοτιδικής και αμινοξικής στοίχισης πραγματοποιήθηκε για όλα τα δείγματα και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 2.1 που ακολουθεί:

ΔΕΙΓΜΑ	ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΟΥ	ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΑΓΗ
I34 (V1)	A 2908 G	Ile 143 Val
	T 3330 C	όχι
580 (V2)	T2909A	Ile 143 Asn
	C3252T	όχι
730 (V3)	A2859G	όχι
	T2888G	Phe136 Cys
	T2909C	Ile 143 Thr
ID (V4)	όχι	όχι
IF (V5)	όχι	όχι
591 (V6)	C2493T	Thr 6 Ile
	T2596C	όχι
590 (V7)	C2493T	Thr 6 Ile
738 (V8)	C2493T	Thr 6 Ile
	C2947T	όχι
	A3229G	όχι
584 (V9)	C2493T	Thr 6 Ile
581 (V10)	C2493T	Thr 6 Ile
IK (V11)	C2493T	Thr 6 Ile
	A2593G	όχι
	G2770T	όχι
	A2977G	όχι
	A3073G	όχι
	A3118G	όχι
	A3265G	όχι
T3274A	όχι	
744 (V12)	C2493T	Thr 6 Ile
	A2608G	όχι
	A3259G	όχι
8029 (V13)	C2493T	Thr 6 Ile
	A3248G	Ile 258 Val
	A3352G	όχι
7 (V15)	A2542G	όχι
	A2617G	όχι
	A2623G	όχι
	G2645A	Val 56 Ile
	A2749G	Ile 90 Met
	T2767C	όχι
	A2774G	Lys 99 Glu
	T2779C	όχι
	C2789T	όχι
	A2795G	Thr 106 Ala
	C2905T	όχι
	A3067G	όχι
	G3070A	όχι
	G3133A	όχι
	C3157T	όχι
	T3188A	Phe 237 Ile
G3349A	όχι	

Πίνακας 2.1: παρουσίαση των νουκλεοτιδικών μεταλλάξεων και των επιπτώσεων τους (αν οδηγούν ή όχι σε αλλαγή αμινοξέος). Στη στήλη με τις νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις, οι αριθμοί δηλώνουν τη θέση της μετάλλαξης, το γράμμα που βρίσκεται πριν τον αριθμό δηλώνει το νουκλεοτίδιο του πρότυπου στελέχους, ενώ το γράμμα που βρίσκεται μετά αντιστοιχεί στο μεταλλαγμένο νουκλεοτίδιο του εξεταζόμενου στελέχους. Ομοίως και για τις αμινοξικές αλλαγές.

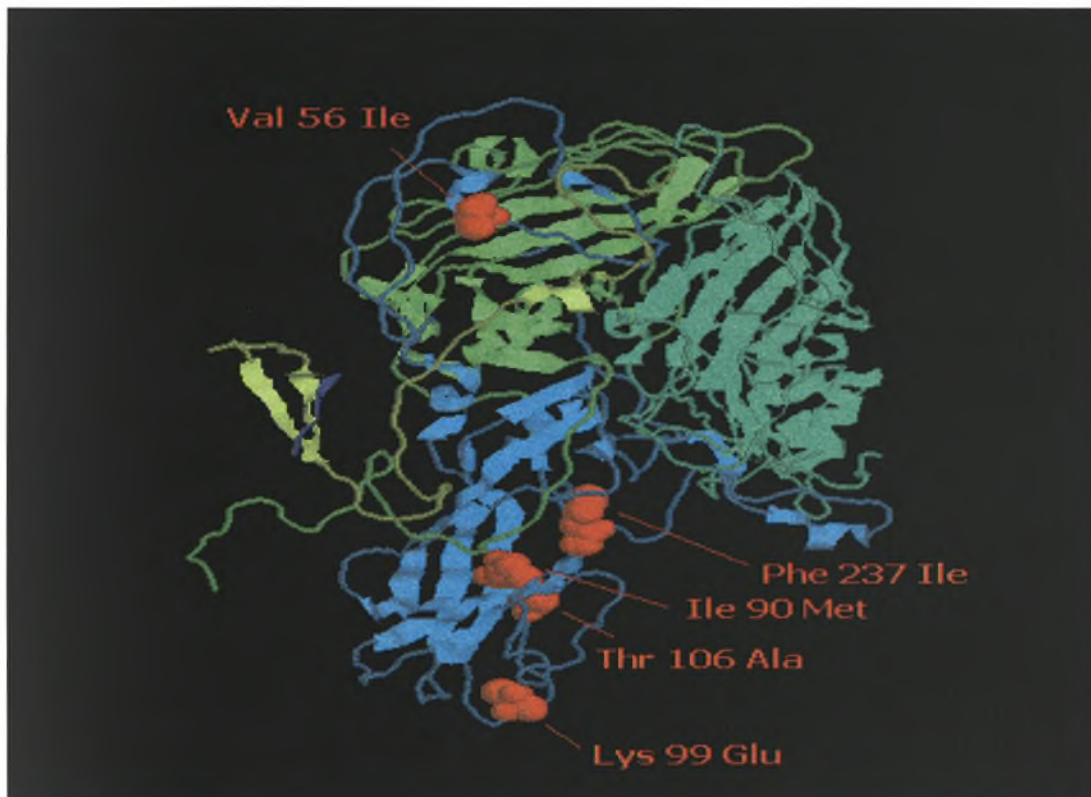
Υπολογισμός του ποσοστού απόκλισης της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της VP1 περιοχής των δειγμάτων από την VP1 των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin

Το ποσοστό απόκλισης υπολογίζεται διαιρώντας τον αριθμό των μεταλλάξεων που εντοπίζονται στη VP1 περιοχή κάθε δείγματος με το μήκος της VP1 του αντίστοιχου πρότυπου εμβολιακού στελέχους. Ανάλογα με το ποσοστό απόκλισης τα στελέχη των πολιοϊών μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες : (ι) OPV-like viruses όπου εμφανίζουν ομοιότητα >99% με την αλληλουχία της VP1 των πρότυπων εμβολιακών στελεχών και (ιι) σε Vaccine-derived poliovirus (VDPV) όπου το ποσοστό ομολογίας είναι μικρότερο από 99%.

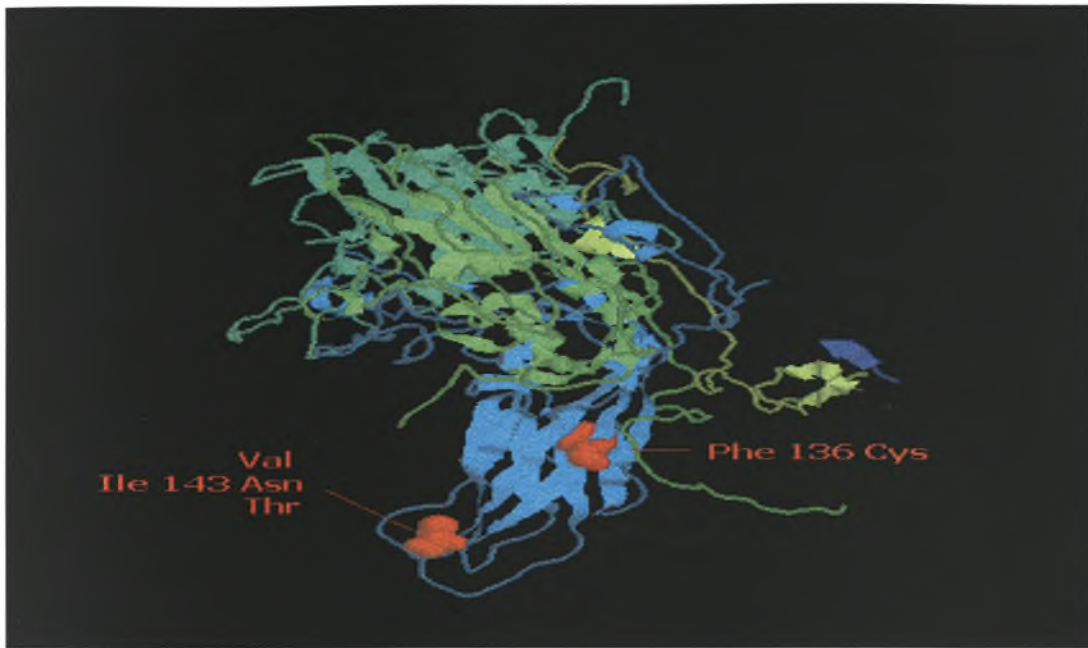
Εμβολιακό στέλεχος	Δείγμα	Ποσοστό απόκλισης
S1 (906 bp)	7 (V15)	1,87%
S2 (903bp)	I34 (V1)	0,22%
	580(V2)	0,22%
	730(V3)	0,33%
	ID(V4)	0%
	IF(V5)	0%
S3 (900bp)	591(V6)	0,22%
	590(V7)	0,11%
	738(V8)	0,33%
	584(V9)	0,11%
	581(V10)	0,11%
	IK(V11)	0,88%
	744(V12)	0,33%
	8029(V13)	0,33%

3.ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΑΓΩΝ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΗΣ VP1 ΜΕ ΤΗ ΒΟΗΘΕΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ Rasmol V.2.7.1.1

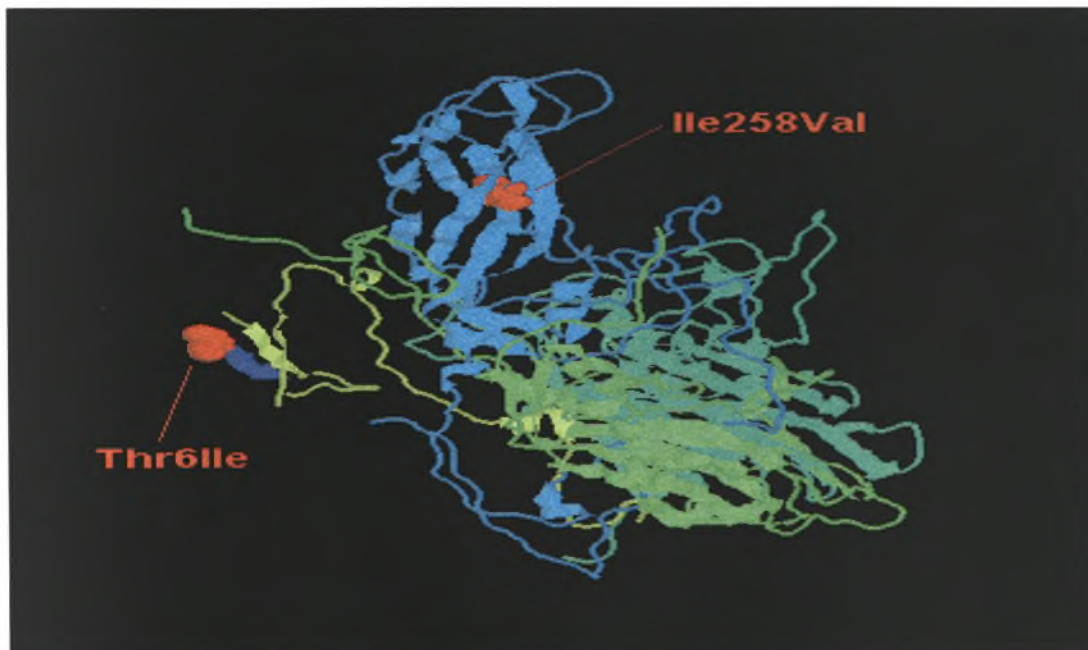
Οι μεταλλάξεις πάνω στη VP1 (μπλε χρώμα) απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα και με χωροπληρωτικό μοντέλο, καθιστώντας πιο εύκολη τη διάκριση τους από το υπόλοιπο μόριο το οποίο αναπαρίσταται στη μορφή chain.



Εικόνα 3.1: απεικόνιση των μεταλλάξεων (απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα) της VP1(μπλέ) των Sabin 1 στελεχών στην τριδιάστατη δομή του πρωτομερούς του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb.



Εικόνα 3.2: απεικόνιση των μεταλλάξεων της VP1 των Sabin 2 στελεχών στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb



Εικόνα 3.3: απεικόνιση των μεταλλάξεων της VP1 των Sabin 3 στελεχών στην τρισδιάστατη δομή 1VBE.pdb

Στα στελέχη Sabin1 και Sabin2 οι αμινοξικές αλλαγές απεικονίστηκαν στην τρισδιάστατη δομή του στελέχους Mahoney (πολιοϊός 1 αγρίου τύπου) 1ASJ.pdb λόγω της έλλειψης της κρυσταλλικής δομής των Sabin1 και Sabin 2 στελεχών.

Στη συνέχεια συγκρίνοντας τις εικόνες 3.1, 3.2 και 3.3 με εικόνες που απεικονίζουν τη δομή του πενταμερούς και ολόκληρου του καψιδίου, οι αμινοξικές αλλαγές μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες: 1) στις αλλαγές που εντοπίζονται στην εξωτερική πλευρά του καψιδίου και 2) σε αυτές που εντοπίζονται στο εσωτερική.

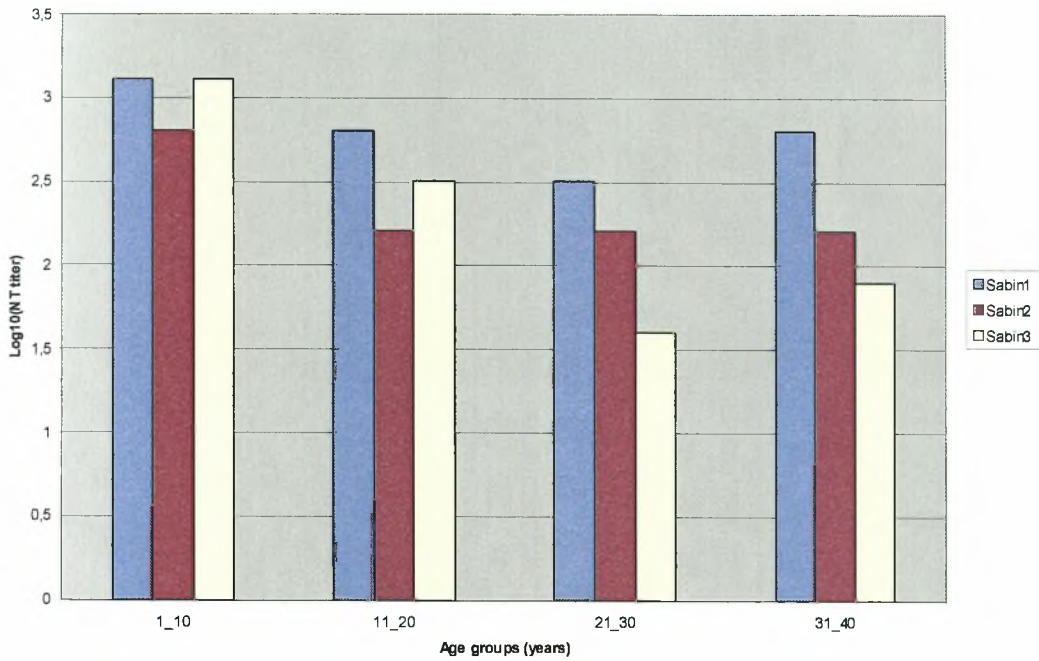
Στα Sabin1 στελέχη οι μεταλλάξεις Ile90Met, Lys99Glu, Thr106Ala και Phe237 Ile εντοπίζονται στη εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου, ενώ η μετάλλαξη Val 56 Ile στο εσωτερικό. Στα Sabin2 στελέχη η μετάλλαξη Phe 136 Cys εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου ενώ η μετάλλαξη του καταλοίπου Ile 143 σε Val,Asn ή Thr εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια. Στα Sabin3 η μετάλλαξη Thr 6 Ile εντοπίζεται στην εσωτερική πλευρά. Ενώ η μετάλλαξη Ile 258 Val βρίσκεται μερικώς εκτεθειμένη στην επιφάνεια του καψιδίου.

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗΣ :

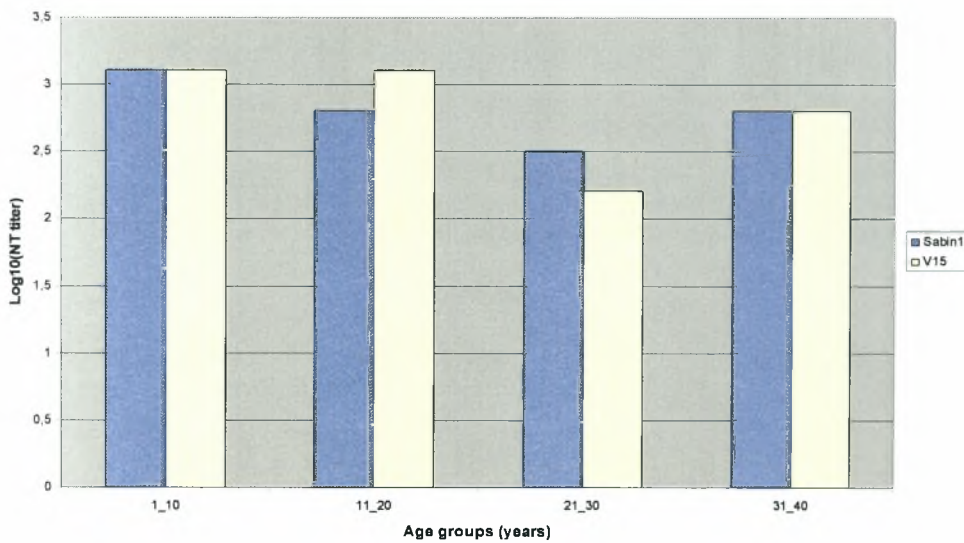
ΔΕΙΓΜΑ	ΟΜΑΔΕΣ ΗΛΙΚΙΩΝ (POOL)				ΤΥΠΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ
	1-10	11-20	21-30	31-40	
591(v6)	1/1280	1/160	1/160	1/160	S3/S2/S3
590(v7)	1/1280	1/160	1/40	1/40	S3/S2/S3
I34(v1)	1/640	1/320	1/80	1/160	S2/S1/S2/S1
738 (v8)	1/640	1/80	1/40	1/40	S3/S2/S1
584(v9)	1/1280	1/160	1/40	1/160	S3/S2/S1
581(v10)	1/640	1/160	1/40	1/80	S3/S2/S3
IK(v11)	1/640	1/160	1/20	1/40	S3/S2
7(v15)	1/1280	1/1280	1/160	1/640	VDPV
580(v2)	1/1280	1/640	1/80	1/80	S2/S1
730(v3)	1/1280	1/640	1/160	1/160	S2/S1
ID(v4)	1/1280	1/320	1/160	1/160	S2/S1
IF(v5)	1/1280	1/320	1/160	1/160	S2/S1
744(v12)	1/1280	1/320	1/40	1/80	S3/S2
8029(v13)	1/1280	1/160	1/40	1/40	S3/S1
S1	1/1280	1/640	1/320	1/640	
S2	1/640	1/160	1/160	1/160	
S3	1/1280	1/320	1/40	1/80	

Στον παραπάνω πίνακα αναφέρεται η μεγαλύτερη αραιώση του pool για κάθε ηλικιακό group στην οποία παρατηρείται προστασία των κυττάρων από τον ιό.

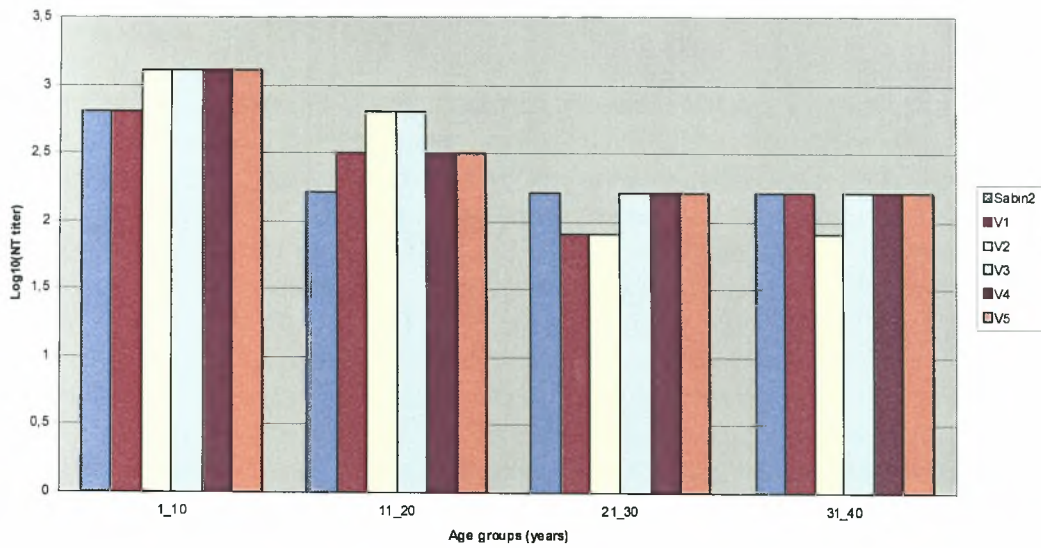
Στα διαγράμματα που ακολουθούν απεικονίζεται η λογαριθμική συγκέντρωση των αντισωμάτων σε συνάρτηση με το ηλικιακό group.



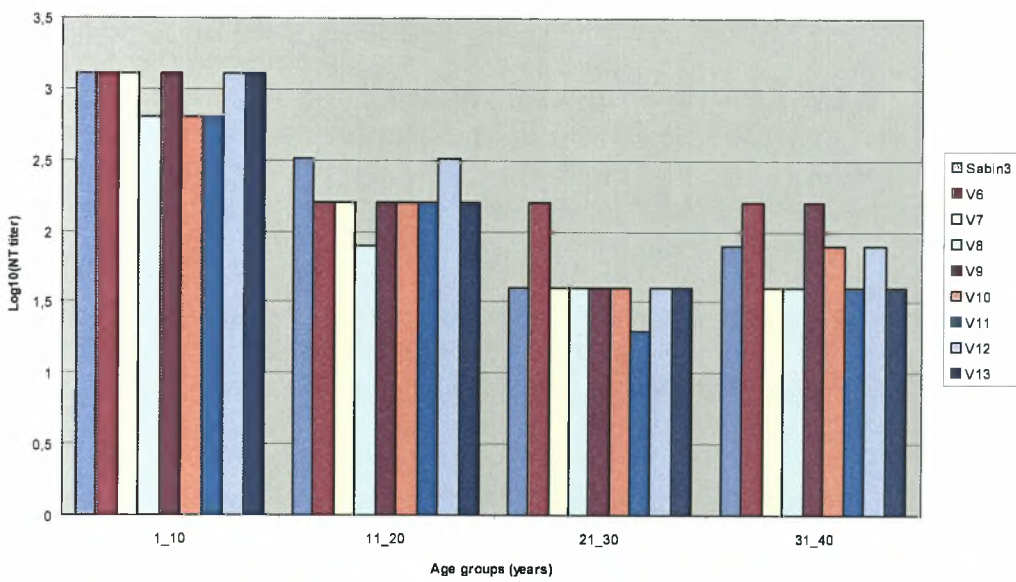
Διάγραμμα 1: Στο διάγραμμα1 απεικονίζεται η συγκέντρωση των αντισωμάτων έναντι των τριών πρότυπων στελεχών Sabin σε συνάρτηση με το ηλικιακό group. Το μπλε χρώμα αντιστοιχεί στο Sabin1, το φούξια στο Sabin 2 και το άσπρο στο Sabin3



Διάγραμμα 2 : Απεικόνιση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των στελεχών οροτύπου 1 σε συνάρτηση με το ηλικιακό group.



Διάγραμμα 3: Απεικόνιση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των στελεχών οροτύπου 2 σε συνάρτηση με το ηλικιακό group



Διάγραμμα 4: Απεικόνιση της συγκέντρωσης των αντισωμάτων έναντι των στελεχών οροτύπου 3 σε συνάρτηση με το ηλικιακό group.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

➤ **Μεταλλάξεις στη VP1 :**

Συνολικά εντοπίστηκαν 40 νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Οι περισσότερες από αυτές είναι συνώνυμες. Συγκεκριμένα , από τις μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν, μόνο οι 11 οδηγούν σε αντικατάσταση αμινοξέος ενώ οι υπόλοιπες είναι συνώνυμες, γεγονός που συνηγορεί και με προηγούμενες μελέτες. (Cherkasova et al. 2002). Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις (37/40) είναι transitions (αντικατάσταση πυριμιδίνης από άλλη πυριμιδίνη, ή πουρίνης από άλλη πουρίνη). Το γεγονός αυτό συμφωνεί με την τάση της 3D^{pol} να εισάγει κυρίως transitions κατά την ιική αντιγραφή (Agol 2002). Από τα δείγματα που εξετάστηκαν , μόνο το δείγμα 7 (V15) φέρει ποσοστό απόκλισης 1,8% δηλαδή μεγαλύτερο του 1% και κατά συνέπεια χαρακτηρίζεται ως cVDPV. Τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζουν ποσοστό απόκλισης μικρότερο από 1% και χαρακτηρίζονται ως Sabin- like, μάλιστα τα δείγματα ID (V4) και IF(V5) εμφανίζουν 0% απόκλιση από την αλληλουχία του πρότυπου Sabin2 στελέχους . Οι περισσότερες από τις μεταλλάξεις που ανιχνεύτηκαν δεν εντοπίζονται σε αντιγονικές θέσεις, αλλά σε περιοχές που σχετίζονται με την μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών στα αντίστοιχα νευρομολυσματικά πατρικά στελέχη.

- **Το δείγμα 7 (V15) (Sabin 1)** φέρει 5 μη συνώνυμες μεταλλάξεις. Η μετάλλαξη Val 56 Ile εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου, ενώ οι μεταλλάξεις Ile 90 Met, Lys99Glu, Thr106Ala και Phe237Ile βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του καψιδίου.

Η μετάλλαξη **Val 56 Ile** εντοπίζεται στο αμινοτελικό άκρο της VP1. Το αμινοτελικό άκρο της VP1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο γιατί (i) αλληλεπιδρά με τα αμινοτελικά άκρα των πρωτεϊνών VP2, VP3 και VP4 συμβάλλοντας στη σταθεροποίηση του καψιδίου (Phister et al), (ii) κατά τη διάρκεια σχηματισμού των Α-σωματιδίων η οποία επάγεται από την πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα του , η VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 κινούνται εξωτερικά του καψιδίου και δημιουργούν ένα κανάλι που επιτρέπει την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή (Simon Tsang , 2001, Blondel et al.1999).

Οι μεταλλάξεις **Ile90Met** και **Thr106Ala** αντιστοιχούν σε μεταλλάξεις που εντοπίζονται στα β-πτυχωτά φύλλα B και C αντίστοιχα. Τα κατάλοιπα αυτά συμμετέχουν σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους και παίζουν ρόλο στη χαρακτηριστική αναδίπλωση της VP1 (σε 8-κλώνο αντιπαράλληλο β-βαρέλι). Και οι δυο αυτές μεταλλάξεις συμβάλουν στη μεταστροφή στο γονότυπο του πατρικού στελέχους Mahoney (Cherkasova et al.2002). Η μετάλλαξη Ile90Met βρίσκεται στην αντιγονική θέση 1 (η οποία αποτελείται από τα αμινοξέα 90-105 της VP1). Η μετάλλαξη Thr106Ala έχει συσχετιστεί με αυξημένη νευρομολυσματικότητα (Bouchard et al. 1995).

Η μετάλλαξη **Lys99Glu** βρίσκεται στην αντιγονική θέση 1 και εντοπίζεται στην κορυφή της θηλιάς B-C της VP1 (Cherkasova et al.2002).

Η μετάλλαξη **Phe 237 Ile** εντοπίζεται στη βάση της αύλακας , μετάλλαξη στη γειτονική θέση 236 επηρεάζει τη μετάβαση από το 160S στο 135S ιικό σωματίο πιθανόν τροποποιώντας τις αλληλεπιδράσεις στη διεπιφάνεια μεταξύ των πρωτομερών (E. Colston και V. Racaniello1994). Κατά συνέπεια η αντικατάσταση της Phe από Ile στη θέση 237 πιθανόν να επηρεάσει τη μετάβαση από το 160S στο

135S ιικό σωματίο η οποία είναι απαραίτητη για την απελευθέρωση του ιικού RNA στο κύτταρο του ξενιστή.

- **Sabin 2 δείγματα [I34(V1), 580(V2), 730(V3), ID(V4) και IF(V5)]**

Τα δείγματα ID(V4) και IF(V5) δεν φέρουν νουκλεοτιδικές μεταλλάξεις . Τα δείγματα I34 (V1) , 580 (V2) και 730 (V3) φέρουν και τα τρία μετάλλαξη στη **θέση 143**. Η παρουσία της ισολευκίνης στη θέση 143 παίζει καθοριστικό ρόλο στην εξασθένηση του νευρομολυσματικού χαρακτήρα. Στο δείγμα I34(V1) η ισολευκίνη αντικαθίσταται από βαλίνη , αμινοξύ με παρόμοιες ιδιότητες. Στο δείγμα 580 (V2) η ισολευκίνη αντικαθίσταται από ασπαραγίνη και στο δείγμα 730 (V3) αντικαθίσταται από θρεονίνη. Η μετάλλαξη Ile143Thr αποτελεί μεταστροφή στο πατρικό νευρομολυσματικό στελέχος. Το κατάλοιπο 143 της VP1 βρίσκεται στο εξωτερικό του καψιδίου στη θηλιά DE η οποία συνδέει τα β- πτυχωτά φύλλα D και E της VP1. Η DE θηλιά αλληλεπιδρά με τη BC θηλιά ώστε να σχηματίσουν την αντιγονική θέση 1. Το δείγμα V3 φέρει επίσης τη μετάλλαξη Phe 136 Cys . Η μετάλλαξη αυτή εντοπίζεται στο εσωτερικό του καψιδίου κοντά στο σημείο πρόσδεσης της σφιγγοσίνης. Μετάλλαξη στη γειτονική θέση 132 η οποία βρίσκεται επίσης κοντά στο σημείο πρόσδεσης της σφιγγοσίνης έχει βρεθεί ότι επηρεάζει τη δομή της αύλακας. (Colston E. And V.R. Racanielo.1994)

- **Sabin 3 δείγματα [591(V6), 590(V7), 738(V8), 584(V9) ,581(V10) ,584(V9) ,581(V10),IK(V11),744(V12) και 8029(V13)**

Όλα τα Sabin3 δείγματα φέρουν τη μετάλλαξη Thr6Ile ενώ το δείγμα V13 φέρει επιπροσθέτως τη μετάλλαξη Ile258Val. Η μετάλλαξη Thr6Ile βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου ,αποτελεί μεταστροφή στο γενότυπο του πατρικού στελέχους αγρίου τύπου P3/Leon/37 και έχει συσχετιστεί με τη νευρομολυσματικότητα (F. FRIEDRICH.1996).

Η μετάλλαξη Ile 258 Val βρίσκεται μερικώς εκτεθειμένη στην επιφάνεια του καψιδίου ,κοντά στην αντιγονική θέση 1.

➤ ΟΡΟΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΙΪΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΜΕ ΟΡΟΥΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ

Τα αποτελέσματα της οροεξουδετέρωσης έδειξαν σταθερότητα των ανοσολογικών ιδιοτήτων των ιικών στελεχών ακόμα και για τα στελέχη στα οποία εντοπίστηκαν μεταλλάξεις στις κύριες αντιγονικές τους θέσεις. Το γεγονός αυτό συμφωνεί και με προηγούμενες μελέτες (M.Yakovenko et al.2005).

- Ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι και των τριών οροτύπων Sabin είναι εξίσου υψηλός για την ομάδα ατόμων ηλικίας 1-10 ετών αλλά μειώνεται στις ομάδες ηλικιών 11-20, 21-30 και 31-40. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι τα άτομα μικρής ηλικίας έχουν έρθει πιο πρόσφατα σε επαφή με τα στελέχη Sabin λόγω του πιο πρόσφατου εμβολιασμού τους. Στα Sabin 2 στελέχη ο τίτλος των αντισωμάτων παραμένει σταθερός για τις ηλικίες 11-20, 21-30 και 31-40. Ο τίτλος των Sabin 1 στελεχών παραμένει σε υψηλά επίπεδα για όλα τα ηλικιακά group και πέφτει ελάχιστα στις ηλικίες 21-30. Στις ηλικίες 1-10 και 11-20 το επίπεδο ανοσίας είναι καλύτερο για τα στελέχη Sabin 1 και Sabin 3 . Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι το εμβόλιο OPV περιέχει τα στελέχη Sabin σε αναλογία 10/1/3 (S1/S2/S3) αντίστοιχα και τα άτομα μικρότερης ηλικίας έχουν εμβολιαστεί πιο πρόσφατα με το

OPV. Στις μεγαλύτερες ηλικίες (21-30 και 31-40) παρατηρείται καλύτερη ανοσία έναντι των στελεχών Sabin 1 και Sabin 2 ενώ ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι των Sabin 3 στελεχών μειώνεται αισθητά, πέφτει κάτω από τις 2 μονάδες Log₁₀(NT titer. Αυτό πιθανόν δηλώνει μεγαλύτερη κυκλοφορία των στελεχών Sabin 1 και Sabin 2 στον πληθυσμό.

- Ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι του δείγματος 7 (V15) (ορότυπος P1) παραμένει στα ίδια επίπεδα με τον τίτλο, έναντι του αντίστοιχου προτύπου εμβολιακού στελέχους Sabin1. Κατά συνέπεια η οροεξουδετέρωση του πρότυπου εμβολιακού στελέχους Sabin 1 και του cVDPV στελέχους V15 το οποίο φέρει μεταλλάξεις στην αντιγονική θέση 1 (Ile90Met, Lys99Glu) δείχνει σταθερότητα στις ανοσολογικές ιδιότητες παρά την παρουσία μεταλλάξεων σε κύριες αντιγονικές θέσεις . Αν και ο τίτλος των αντισωμάτων έναντι του V15 μειώνεται αρκετά στις ηλικίες 21-30, η μείωση αυτή όμως είναι αντίστοιχη με τη μείωση του τίτλου των αντισωμάτων έναντι και του πρότυπου Sabin 1 στελέχους που επίσης μειώνεται στο ίδιο ηλικιακό group. Γεγονός που επίσης συνηγορεί στη σταθερότητα των ανοσολογικών ιδιοτήτων του.

- Η ανοσία έναντι του πρότυπου Sabin 2 στελέχους αλλά και των αντίστοιχων παραγόμενων εμβολιακών στελεχών εμφανίζεται εξίσου υψηλή για τις ηλικίες 1-10 και μειώνεται ελάχιστα στις υπόλοιπες ηλικίες συγκριτικά με το group 1-10 . Ο τίτλος των αντισωμάτων διατηρείται σχετικά σταθερός για τις ηλικίες 21-30 και 31-40. Συγκεκριμένα στις ηλικίες 21-30 παρατηρείται μικρότερη ανοσία συγκριτικά με το πρότυπο στέλεχος Sabin 2 έναντι 2 μόνο στελεχών , ενώ στις ηλικίες 31-40 έναντι ενός μόνο στελέχους .

- Η ανοσία έναντι πρότυπου Sabin 3 στελέχους αλλά και των αντίστοιχων παραγόμενων εμβολιακών στελεχών παραμένει σταθερή και σε υψηλά επίπεδα στις ηλικίες 1-10 και μειώνεται στις μεγαλύτερες ηλικίες. Μεγάλη μείωση παρατηρείται στις ομάδες 21-30 και 31-40 . Η μεγαλύτερη μείωση παρατηρείται στην ομάδα 21-30, όπου ο τίτλος των αντισωμάτων των δειγμάτων , συμπεριλαμβανομένου και του πρότυπου Sabin3 στελέχους , πέφτει κάτω από τις 2 μονάδες Log₁₀(NT titer). Εξαιρεση αποτελεί το δείγμα V6 όπου ο τίτλος των αντισωμάτων παραμένει σταθερός ανάμεσα στα 3 ηλικιακά group 11-20, 21-30 και 31-40. Το γεγονός αυτό πιθανόν δηλώνει ότι το στέλεχος V6 κυκλοφόρησε πρόσφατα στο πληθυσμό.

- Συμπερασματικά : Η ανοσία έναντι τόσο των πρότυπων εμβολιακών στελεχών Sabin όσο και των αντίστοιχων "εμβόλιο-παραγόμενων" στελεχών εμφανίζεται να είναι εξίσου υψηλή στην ομάδα ηλικιών 1-10 αλλά μειώνεται στις υπόλοιπες ομάδες . Η μεγαλύτερη μείωση της ανοσίας έναντι των στελεχών Sabin 1 και Sabin 3 παρατηρείται στα άτομα της ομάδας 21-30. Το γεγονός αυτό πιθανόν οφείλεται στους εξής παράγοντες : τα άτομα αυτής της ηλικίας έχουν λιγότερα αντισώματα σε σχέση με τα άτομα που ανήκουν σε μικρότερα ηλικιακά group διότι τα άτομα από μικρότερες ηλικίες έχουν εμβολιαστεί πιο πρόσφατα και επίσης τα άτομα ηλικίας 21-30 συνήθως δεν έχουν προλάβει να τεκνοποιήσουν έτσι ώστε να έρθουν σε επαφή με τους ιούς με τους οποίους έχουν έρθει σε επαφή τα παιδιά τους. Έχει αποδειχθεί ότι τα στελέχη Sabin του OPV καθώς και τα παράγωγα τους (στελέχη στα οποία έχουν συσσωρευτεί μεταλλάξεις) μπορούν και διασπείρονται από τα εμβολιασμένα άτομα σε άλλα άτομα του οικείου περιβάλλοντος τους με αποτέλεσμα την επίτευξη ευρύτερης ανοσοποίησης (Walter R. Dowdle et al.2003).

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1) **Andino R., G. E. Rieckhof, P. L. Achacoso, and D. Baltimore. 1993.** Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNA complex formed around the 5'-end of viral RNA. *The EMBO Journal* 12(9): 3587-3598.
- 2) **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- 3) **Barco A. and L. Carrasco. 1998.** Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J. Virol.* 72(5):3560-3570.
- 4) **Barton D. J., B. J. O'Donnell, and J. B. Flanagan. 2001.** 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a cis-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO Journal* 20(6): 1439-1448.
- 5) **Basavappa R., R. Syed, O. Flore, J. P. Icenogle, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1994.** Role and mechanism of the maturation cleavage of VP0 in poliovirus assembly: structure of the empty capsid assembly intermediate at 2.9 angstrom resolution. *Protein Sci.* 3:1651-1669.
- 6) **Blomqvist S., A. L. Bruu, M. Stenvik, and T. Hovi. 2003.** Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J. Gen. Virol.* 84(3):573-580.
- 7) **Bouchard M. J., D. H. Lam, and V. R. Racaniello. 1995.** Determinants of attenuation and temperature sensitivity in the type 1 poliovirus Sabin vaccine. *J. Virol.* 69:4972-4978.
- 8) **Boussadia O., M. Niepmann, L. Creancier, A. C. Prats, F. Dautry, and H. Jacquemin-Sablon. 2003.** Unr is required in vivo for efficient initiation of translation from the Internal Ribosome Entry Sites of both rhinovirus and poliovirus. *J. Virol.* 77(6): 3353-3359.
- 9) **Cherkasova E. A., E. A. Korotkova, M. L. Yakovenko, O. E. Ivanova, T. P. Ereemeeva, K. M. Chumakov, and V. I. Agol. 2002.** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J. Virol.* 76(13):6791-6799.

- 10) **Colston E. and V. R. Racaniello. 1994.** Soluble receptor-resistant poliovirus mutants identify surface and internal capsid residues that control interaction with the cell receptor. *The EMBO Journal* 13(24): 5855-5862.
- 11) **Cuervo N. S., S. Guillot, N. Romanenkova, M. Combiescu, A. Aubert-Combiescu, M. Seghier, V. Caro, R. Crainic, and F. Delpeyroux. 2001.** Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J. Virol.* 75(13):5740-5751.
- 12) **Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002.** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.
- 13) **Duggal R., A. Cuconati, M. Gromeier, and E. Wimmer. 1997.** Genetic recombination of poliovirus in a cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13786-13791.
- 14) **Duggal R. and E. Wimmer. 1999.** Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology* 258:30-41.
- 15) **Equestre M., D. Genovese, F. Cavalieri, L. Fiore, R. Santoro, and R. P. Bercoff. 1991.** Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J. Virol.* 65(5): 2707-2710.
- 16) **Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld. 2003.** Membrane requirements for uridylylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* 77(21): 11408-11416.
- 17) **F.Frantzidou, E.Diza, D.Halkia, and A.Andoniadis. 2005.** A seroprevalence study of poliovirus antibody in the population of northern Greece. *Clin. Microbiol. Infect* 11: 68-71
- 18) **Georgescu M. M., F. Delpeyroux, and R. Crainic. 1995.** Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76(9):2343-2348.
- 19) **Georgopoulou A., and P. Markoulatos. 2001.** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11):792-799.
- 20) **Goodfellow I., Y. Chaudhry, A. Richardson, J. Meredith, J. W. Almond, W. Barclay, and D. J. Evans. 2000.** Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J. Virol.* 74(10): 4590-4600.

- 21) **Goodfellow I., D. Kerrigan, and D. J. Evans. 2003.** Structure and function analysis of the poliovirus cis-acting replication element (CRE). *RNA* 9: 124-137.
- 22) **Guillot S., D. Otelea, F. Delpeyroux and R. Crainic. 1994.** Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction. *Vaccine* 12(6): 503-507.
- 23) **Guillot S., V. Caro, N. Cuervo, E. Korotkova, M. Combiescu, A. Persu, A. Aubert- Combiescu, F. Delpeyroux, and R. Crainic. 2000.** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74(18):8434-8443.
- 24) **Herold J. and R. Andino. 2001.** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- 25) **Herremans T., J. H. J. Reimerink, T. G. Kimman, H. G. A. M. VAN DER Avoort, and M. P. G. Koopmans. 2000.** Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with Oral Live Attenuated or Inactivated Poliovirus Vaccine and after natural exposure. *Clin. and Diagn. Labor. Immunol.* 7(1): 40-44.
- 26) **Hyypia, T., T. Hovi, N. J. Knowles, and G. Stanway. 1997.** Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. *J. Gen. Virol.* 78:1-11..
- 27) **Karakasiliotis I., P. Markoulatos, and T. Kartsorchis. 2004.** Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell Probes.* 18(2):103-109.
- 28) **King, A. M. Q., F. Brown, P. Christian, T. Hovi, T. Hyypia, N. J. Knowles, S. M. Lemon, P. D. Minor, A. C. Palmenberg, T. Skern, and G. Stanway. 1999.** Picornaviridae, p. 996. In M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle and R. B. Wickner (ed.), Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif.
- 29) **Lyons T., K. E. Murray, A. W. Roberts, and D. J. Barton. 2001.** Poliovirus 5'-Terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 75(22): 10696-10708.

- 30) **Martin J., E. Samoilovich, G. Dunn, A. Lackenby, E. Feldman, A. Heath, E. Svirchevskaya, G. Cooper, M. Yermalovich, and P. D. Minor. 2002.** Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76(21):1092-10928.
- 31) **Morasco B. J., N. Sharma, J. Parilla, and J. B. Flanagan. 2003.** Poliovirus cre(2C)-dependent synthesis of VPgpUpU is required for positive- but not negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(9): 5136-5144.
- 32) **Murray K. E. and D. J. Barton. 2003.** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J. Virol.* 77(8): 4739-4750.
- 33) **Ochs K., L. Saleh, G. Bassili, V. H. Sonntag, A. Zeller, and M. Niepmann. 2002.** Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus Internal Ribosome Entry Site. *J. Virol.* 76(5): 2113-2122.
- 34) **Ochs K., A. Zeller, L. Saleh, G. Bassili, Y. Song, A. Sonntag, and Michael Niepmann. 2003.** Impaired Binding of Standard Initiation Factors Mediates Poliovirus Translation Attenuation. *J. Virol.* 77(1): 115-122
- 35) **Paul A. V., J. Yin, J. Mugavero, E. Rieder, Y. Liu, and E. Wimmer. 2003.** A 'Slide-back' mechanism for the initiation of Protein-primed RNA synthesis by the RNA polymerase of poliovirus. *J. Biol. Chem.* 278(45): 43951-43960.
- 36) **Prevot D., D. Decimo, C. H. Herbreteau, F. Roux, J. Garin, J. L. Darlix, and T. Ohlmann. 2003.** Characterization of a novel RNA-binding region of eIF4GI critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal* 22(8): 1909-1921.
- 37) **Siafakas N., A. Gergopoulou, P. Markoulatos, N. Spyrou, and G. Stanway. 2001.** Molecular detection and identification of an enterovirus during an outbreak of aseptic meningitis. *J. Clin. Laboratory Analysis* 15:87-95.

Reviews

- 1) **Agol V. I. 1997.** Recombination and other genomic rearrangements in Picornaviruses. *Seminars in Virology* 8:77-84.

- 2) Agol V. I. 2002. Genome instability in picornaviruses. *Mol. Biol.* 36(2):216-222.
- 3) Agol V. I., 2002. Picornavirus genome: an overview. In: Semler B. L., Wimmer E. (Eds.), *Molecular Biology of Picornaviruses*. ASM Press, Washington, DC, pp. 127-148.
- 4) ΑΝΤΩΝΙΑΔΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΚΑΡΤΑΛΗ ΣΟΦΙΑ & ΛΕΓΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΤΕΦΑΝΟΣ & ΜΑΝΙΑΤΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ & ΤΣΕΛΕΝΤΗΣ ΙΟΑΝΝΗΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑ, ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ, 3^η Έκδοση
- 5) Blondel B., G. Duncan, T. Couderc, F. Delpeyroux, N. Pavio and F. Colbere-Garapin. 1998. Molecular aspects of poliovirus biology with a special focus on the interactions with nerve cells. *J. NeuroVirol.* 4:1-26.
- 6) Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 7) Dowdle W. R., E. De Gourville, O. M. Kew, M. A. Pallansch, and D. J. Wood. 2003. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.* 13:277-291.
- 8) Figlerowicz M, M. Magdalena Alejska, A. Kurzyn'ska-Kokorniak, M. Figlerowicz . 2003. Genetic Variability: The Key Problem in the Prevention and Therapy of RNA-Based Virus Infections. *Medicinal Research Reviews* 23(4):488-518.
- 9) Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.
- 10) Hogle, J. M., 2002. Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- 11) Kew O. M, P. F Wright, V. I Agol, F. Delpeyroux, H. Shimizu, N. Nathanson, and M. A. Pallansch. 2004. Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bulletin of the World Health Organization* 82:16-23.
- 12) Minor D. P. 1999. Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*.
- 13) Muir P., U. Kammerer, K. Korn, M. N. Mulders, T. Poyry, B. Weissbrich, R. Kandolf, G. M. Cleator, and A. M. Van Loon. 1998. Molecular typing of

enteroviruses: current status and future requirements. *Clin. Microbiol. Reviews* 11(1):202-227.

14) Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999. Molecular Biology of poliovirus. Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.

15) Solecki D., M. Gromeier, J. Harber, G. Bernhardt, and E. Wimmer. 1998. Poliovirus and its cellular receptor: a molecular genetic dissection of a virus/receptor affinity interaction. *J. Mol. Recogn.* 11:2-9.

16) Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993. Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.

