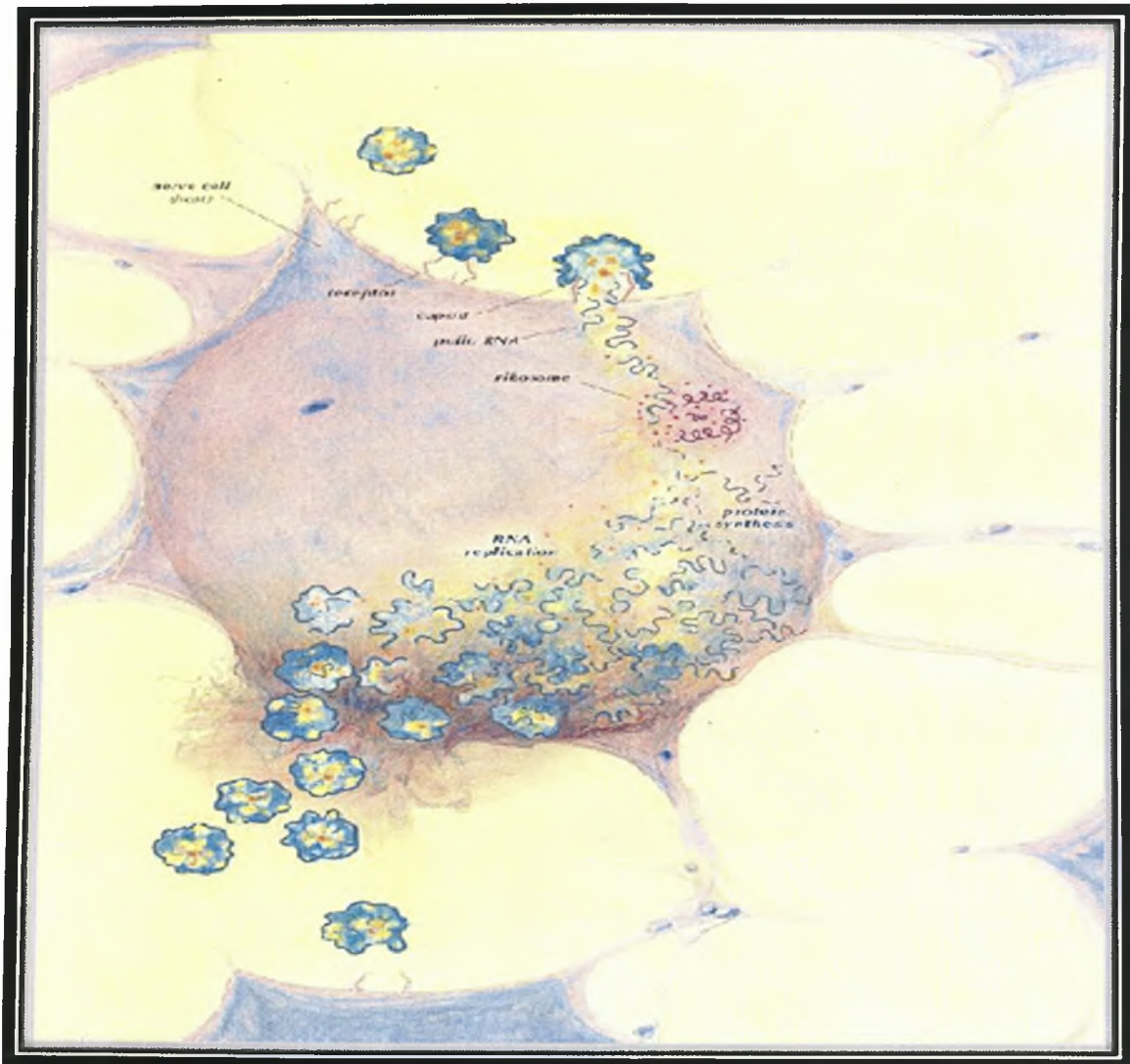


ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΤΙΣ 2C ΚΑΙ 3D ΓΕΝΩΜΙΚΕΣ
ΠΕΡΙΟΧΕΣ ΕΜΒΟΛΙΑΚΩΝ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ



ΚΑΤΕΡΙΝΑ ΜΠΙΡΛΗ

Επιβλέπων: Καθηγητής Παναγιώτης Μαρκουλάτος
Λάρισα 2009



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

Αριθ. Εισ.: 7649/1
Ημερ. Εισ.: 03-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΜΠΙ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087178

Στους γονείς μου Γιάννη και Δημητρά

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ 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



Ημερομηνία Κατάθεσης Πτυχιακής εργασίας: 25 – 5 – 2009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε στο τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στο εργαστήριο Μικροβιολογίας-Ιολογίας, από τον Οκτώβριο του 2007 ως τον Σεπτέμβριο του 2008 υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Παναγιώτη Μαρκουλάτου.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και την βαθύτερη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη για την ανάθεση του θέματος της πτυχιακής μου, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου καθώς επίσης και για την συμπαράσταση, την ενθάρρυνση και για τις γνώσεις που μου παρείχε καθ' όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τους καθηγητές μου, κ. Ζήση Μαμούρη και Δημήτριο Μόσιαλο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στη τριμελή επιτροπή για τη παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου τους Δεδεψίδη Ευάγγελο, Πλιάκα Βίκυ και Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα τόσο για την καθοδήγηση τους και την βοήθεια τους κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, όσο και για το ιδιαίτερα ζεστό και φιλικό περιβάλλον που είχε διαμορφωθεί στο χώρο του εργαστηρίου.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ολόψυχα τους φίλους-συνάδελφους μου Κουρκουμέλη Χαριτώ, Σαλατάϊ Άντα, Γιάννη Καραγιαννίδη και Βύρωνα Γοργογιέτα για την αμέριστη συμπαράσταση, ηθική και συναισθηματική στήριξη, το πραγματικό ενδιαφέρον και τη φιλική διάθεση που έδειξαν προς το άτομο μου όλα αυτά τα χρόνια. Πραγματικά σε αυτά τα χρόνια του πανεπιστημίου γνώρισα και έκανα πραγματικές φίλιες με ανθρώπους που πιστεύω ότι θα συνεχίσουν να υπάρχουν στη ζωή μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των εντεροϊών, οι οποίοι ανήκουν στην οικογένεια των «*Picornaviridae*» και χωρίζονται σε τρεις οροτύπους (PV1, PV2, PV3). Οι Picorna-ιοί ανήκουν στους περισσότερο ποικιλόμορφους (πάνω από 200 ορότυποι) και από παλαιότερα γνωστούς στον άνθρωπο ιούς (οι πρώτες αναφορές προέρχονται από την Αίγυπτο γύρω στο 1400 π.Χ.). Όπως δηλώνει και η ονομασία τους που προέρχεται από την λατινική λέξη «Pico» (πολύ μικρό) και τη λέξη RNA που περιγράφει το γενετικό τους υλικό, αποτελούν μια ευρεία οικογένεια μικρών μη ελυτροφόρων RNA-ίων θετικής πολικότητας. Οι πολιοϊοί και γενικά όλοι οι RNA ιοί έχουν την δυνατότητα να εξελίσσονται με πολύ υψηλούς ρυθμούς, γεγονός που τους επιτρέπει να παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και να προσαρμόζονται ευκολότερα στο περιβάλλον τους. Αυτοί οι υψηλοί ρυθμοί εξέλιξης στους πολιοϊούς, οφείλονται στο σχετικά μικρό γένωμα τους καθώς επίσης και στις ιδιότητες της ιικής πολυμεράσης. Οι μηχανισμοί που προωθούν την εξέλιξη των πολιοϊών είναι οι γενετικοί ανασυνδυασμοί και οι μεταλλάξεις.

Η πολιομυελίτιδα αναγνωρίστηκε ως ιική νόσος το 1909 από τους Landsteiner και Popper, παρότι ο ιός απομονώθηκε για πρώτη φορά αρκετά αργότερα, στη δεκαετία του 1930. Η ανάπτυξη του πολιοϊού σε κυτταροκαλλιέργειες επιτεύχθηκε το 1949 από τον Enders (Enders et al., 1949), θέτοντας παράλληλα τις βάσεις για την δημιουργία εμβολίων κατά της ασθένειας της πολιομυελίτιδας. Το 1955 δημιουργήθηκε το IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine) και το 1962 το OPV (Oral Poliovirus Vaccine). Το OPV αποδείχτηκε εξαιρετικά αποτελεσματικό εμβόλιο, καθώς οδήγησε στις μέρες μας στην σχεδόν οριστική εξάλειψη της πολιομυελίτιδας. Ωστόσο, το OPV εμφάνισε το μειονέκτημα της εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP: vaccine-associated paralytic poliomyelitis) μέσω της συσσώρευσης μεταλλάξεων ή και ανασυνδυασμών στο γένωμα των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών Sabin. Ο ανασυνδυασμός πραγματοποιείται συνήθως στις 2C και 3D μη δομικές γενωμικές περιοχές μεταξύ των εξασθενημένων εμβολιακών στελεχών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin).

Συνεπώς σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου τύπου, την κύρια πηγή μόλυνσης από πολιοϊούς σε παγκόσμια κλίμακα αποτελούν τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPVs). Επίσης καθώς η πλειονότητα των χωρών, ελευθέρων από άγρια στελέχη πολιοϊών, έχει αντικαταστήσει το OPV εμβόλιο με το IPV η εμφάνιση ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στη δημόσια υγεία. Επομένως είναι ιδιαίτερα αναγκαία και σημαντική η χρήση μοριακών μεθόδων με σκοπό τον εντοπισμό των ανασυνδυασμών στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιακών στελεχών πολιοϊών. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η μοριακή μέθοδος RT-PCR. Για να ελεγχθεί η αξιοπιστία της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν 14 ανασυνδυασμένα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών τα οποία έχουν χαρακτηριστεί με γενωμική αλληλούχιση σε προγενέστερο πειραματικό στάδιο από την ομάδα μας.

Παρόλο που ο πιο καθοριστικός χαρακτηρισμός των VDPVs γίνεται μέσω γενωμικής αλληλούχισης, σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται μια νέα, οικονομική και ευρέως εφαρμόσιμη μέθοδος για τον εντοπισμό των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού που είναι οι S3/Sx για την 2C περιοχή και S2/Sx για την 3D αντίστοιχα και μπορεί να αποτελέσει μια πρώτη προσέγγιση για τον γρήγορο εντοπισμό των VDPVs σε εργαστήρια τα οποία δεν έχουν δυνατότητα γενωμικής αλληλούχισης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	8
1.1 Ταξινόμηση	
1.2 Δομή πολιοϊών	
1.2.1 Δομή και αντιγονικότητα	
1.2.2 Ιδιότητες δομικών πρωτεϊνών	
1.3 Οργάνωση του ιικού γενόματος	
1.3.1 Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR)	
1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)	
1.3.3 Δομική περιοχή	
1.3.4 Λειτουργική περιοχή	
1.3.5 Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR)	
2. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	22
2.1 Ο υποδοχέας CD155 των πολιοϊών	
2.2 Πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα και είσοδος του ιικού RNA στο κύτταρο	
2.3 Μετάφραση	
2.4 Επεξεργασία ιικής πολυπρωτεΐνης	
2.5 Αντιγραφή	
2.6 Καψιδίωση ιικού RNA –Δημιουργία ιικών σωματιδίων	
2.7 Κυτταρικές αποκρίσεις κατά την μόλυνση με πολιοϊό	
3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ.....	38
3.1 Παθογένεια πολιομυελίτιδας	
3.2 Κλινικά συμπτώματα	
3.3 Εμβόλια κατά των πολιοϊών	
3.4 Εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα – VAPP	
3.5 Εμβολιοσυνδεδεμένα στελέχη πολιοϊών (V.D.P.V)	
3.6 Επιδημιολογία	
3.7 Εργαστηριακή διάγνωση	
4. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ.....	52
4.1 Μεταλλάξεις των πολιοϊών	
4.2 Ανασυνδυασμοί	

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	58
2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ	
3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA	
4. ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ	
5. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)	
6. ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.....68

ΣΥΖΗΤΗΣΗ71

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ74

1. Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

1.1 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι πολιοϊοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την πολιομυελίτιδα, αποτελούν μέλη της οικογένειας *Picornaviridae* και συγκεκριμένα ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών.. Η οικογένεια των *Picornaviridae* περιέχει περίπου 230 διαφορετικούς οροτύπους και χωρίζεται σε 9 γένη. Η ταξινόμηση στην οικογένεια των *Picornaviridae* έχει γίνει με βάση τη διαφοροποίηση την οποία παρουσιάζουν στα αντιγονικά χαρακτηριστικά τους, στους ξενιστές, στα όργανα που προσβάλλουν, καθώς και στις φυσικοχημικές ιδιότητες τους.

Ανθρώπινη παθογένεια παρουσιάζουν τα γένη των Εντεροϊών (*Enterovirus*), των Ρινοϊών (*Rhinovirus*), των Καρδιοϊών (*Cardiovirus*), των ιών Ηπατίτιδας Α (*Hepatovirus*) των *Parechovirus* και των *Kobuvirus*, ενώ τα υπόλοιπα τρία γένη των *Erbovirus*, *Aphthovirus* και *Teschovirus* δεν παρουσιάζουν παθογένεια σε ζωικούς οργανισμούς (King et al., 2000).

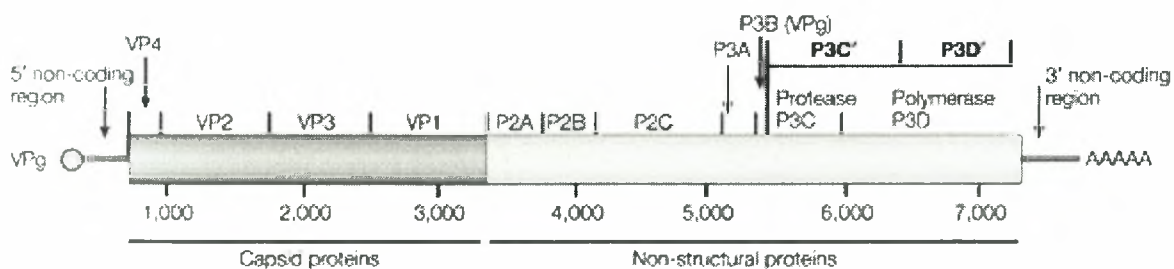
Οικογένεια	Γένος
<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>
	<i>Rhinovirus</i>
	<i>Hepatovirus</i>
	<i>Cardiovirus</i>
	<i>Aphthovirus</i>
	<i>Parechovirus</i>
	<i>Erbovirus</i>
	<i>Kobuvirus</i>
<i>Teschovirus</i>	

Πίνακας 1.1.1: Ταξινόμηση των ιών της οικογένειας *Picornaviridae*.

Συμφώνα με τα σύγχρονα μοριακά δεδομένα, το γένος των εντεροϊών χωρίζεται σε 8 είδη και αποτελείται από περισσότερους από 80 διαφορετικούς οροτύπους οι περισσότεροι από τους

οποίους παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια (King et al., 2000). Με βάση την ισχύουσα ταξινόμηση οι εντεροϊοί που παρουσιάζουν ανθρώπινη παθογένεια χωρίζονται σε πέντε είδη: στο είδος A (HEVA) που περιλαμβάνει τους Coxsackie ιούς A2-A8, A10, A12, A14, A16 και τον εντεροϊό 71, στο είδος B (HEVB) το οποίο περιλαμβάνει όλους του Coxsackie B ιούς (CBV1-6), όλους τους Echo ιούς (E1-E9, E11-E21, E24-27, E29-33), τον Coxsackie A9 και τους εντεροϊούς 69 και 73 (EV69, EV73) (Oberste et al., 2001), στο είδος C (HEVC) που περιέχονται αποκλειστικά Coxsackie A ιοί και συγκεκριμένα οι A1, A11, A13, A15, A17-22 και A24, στο είδος D που περιλαμβάνει τους EV68 και EV70 και τέλος στο είδος των πολιοϊών που περιέχονται οι πολιοϊοί τύπου 1,2 και 3 (Fauquet et al., 2005). Ωστόσο, πρόσφατες φυλογενετικές μελέτες συστήνουν ότι οι πολιοϊοί θα πρέπει να συμπεριληφθούν στο είδος C των εντεροϊών (Brown et al., 2003).

Υπάρχουν τρία στελέχη πολιοϊών (PV1, PV2, PV3) ταξινομημένα με βάση τα αντιγονικά τους χαρακτηριστικά και την χρησιμοποίηση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Κάθε ορότυπος υποδιαιρείται σε διαφορετικά στελέχη τα οποία μπορούν να ταυτοποιηθούν μέσω οροεξουδετέρωσης ή μέσω προσδιορισμού νουκλεοτιδικής ή αμινοξικής αλληλουχίας. Αντιπροσωπευτικά είδη από κάθε ορότυπο έχουν αλληλουχηθεί και έχει βρεθεί να είναι πολύ ομόλογοι σε νουκλεοτιδική και αμινοξική αλληλουχία. Η επιπλέον ανάλυση στις αλληλουχίες όλων των ιικών πολυπεπτιδίων οδήγησε στην δημιουργία ενός ολοκληρωμένου γενετικού χάρτη (Pfister et al., 1999) (εικόνα 1.1.2).

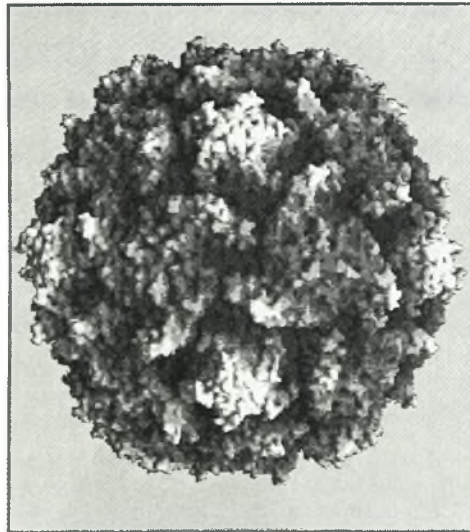


Εικόνα 1.1.2: Γενετικός χάρτης των πολιοϊών. Παρουσιάζεται η θέση των δομικών και λειτουργικών γονιδίων.

1.2 ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

1.2.1 Δομή Καψιδίου και Αντιγονικότητα

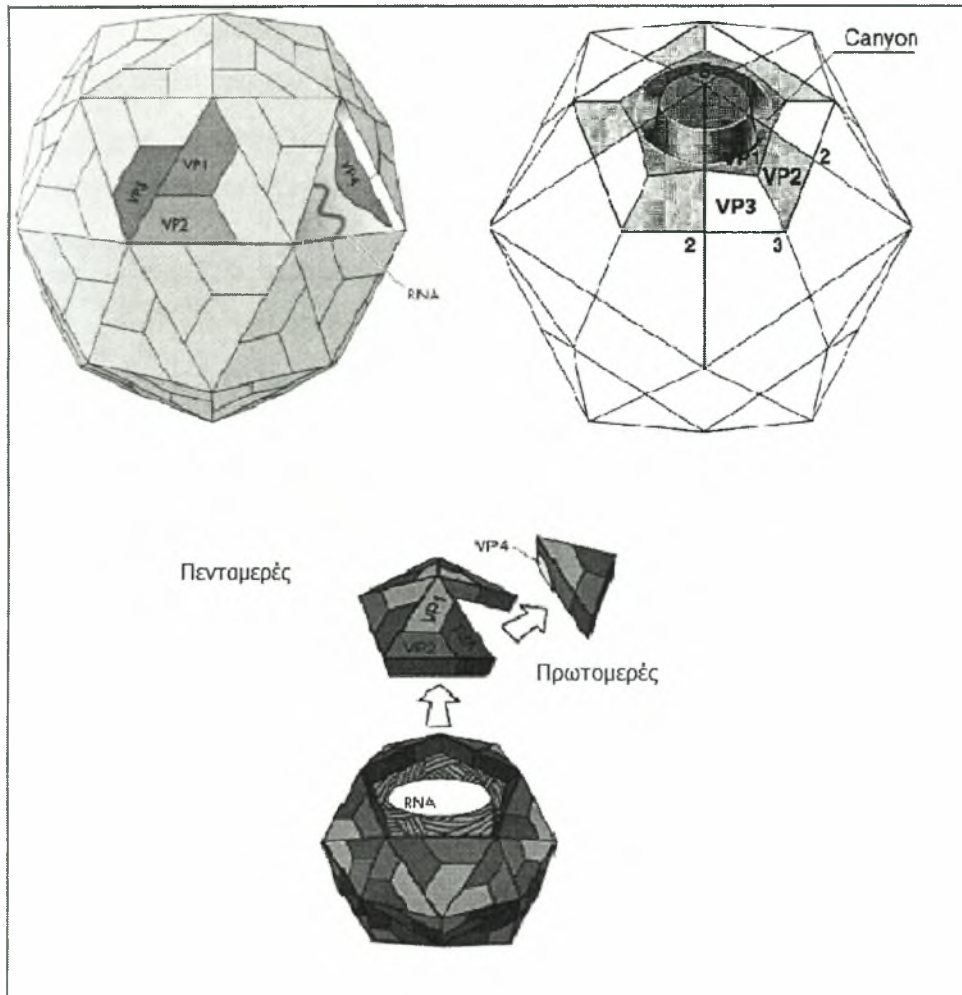
Το ιικό σωματίδιο των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο RNA μόριο θετικής πολικότητας το οποίο περιβάλλεται από ένα μη-ελυτροφόρο εικοσαεδρικής συμμετρίας πρωτεϊνικό καψίδιο. Η τρισδιάστατη δομή του ιικού σωματιδίου και των τριών οροτύπων των πολιοϊών έχει προσδιοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ (εικόνα 1.2.1.1) (Lentz et al. 1997).



Εικόνα 1.2.1.1: Η ατομική δομή του πολιοϊού τύπου 1, ανάλυση με κρυσταλλογραφία ακτίνων-Χ. Είναι εμφανής οι αυλακώσεις (canyons) που περιβάλλουν τις επιφανειακές προεξοχές στο κέντρο του κάθε πενταμερούς άξονα συμμετρίας.

Οι πολιοϊοί είναι ιοί με καψίδιο εικοσαεδρικής συμμετρίας το οποίο δεν περιβάλλεται από έλυτρο λιπιδικής σύστασης. Το καψίδιο τους έχει διάμετρο 28 nm και δομείται από τις τέσσερις πρωτεΐνες (VP1,VP2,VP3,VP4) που προέρχονται από την πρωτεόλυση της P1 πρόδρομης πρωτεΐνης (Pfister et al., 1999). Κατά την πρωτεόλυση, η P1 πρόδρομη πρωτεΐνη του καψιδίου τεμαχίζεται στα τρία πολυπεπτίδια VP0, VP3 και VP1 τα οποία αλληλεπιδρούν

μεταξύ τους και σχηματίζουν τα πρωτομερή (VP0, VP3,VP1). Κατόπιν τα πρωτομερή συσσωματώνονται γρήγορα και δίνουν τα πενταμερή [(VP0, VP3,VP1)₅]. Δώδεκα από τα πενταμερή αυτά δημιουργούν το «προκαψίδιο» [(VP0,VP3,VP1)₅]₁₂.



Εικόνα 1.2.1.2: Σχηματική αναπαράσταση του καψιδίου των πολιοϊών. Στη συγκεκριμένη εικόνα απεικονίζεται το ιικό καψίδιο. Οι πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 αποτελούν το πρωτομερές του καψιδίου. Η VP4 βρίσκεται στο εσωτερικό του καψιδίου. Είναι εμφανής οι 2X, 3X και 5X άξονες συμμετρίας και οι θέσεις των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3 ενός πρωτομερούς. Επίσης φαίνεται η αύλακα (canyon) η οποία περιβάλλει τον 5X άξονα συμμετρίας.

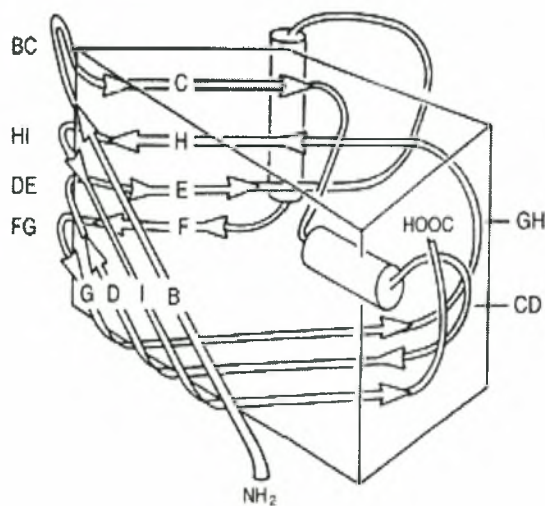
Κατά το στάδιο της καψιδίωσης όπου το RNA ‘‘πακετάρεται’’ στα ιικά σωματίδια, πραγματοποιείται η «αντίδραση ωρίμανσης» στην οποία η πρόδρομη πρωτεΐνη VP0 τεμαχίζεται στις VP4 και VP2. Το καψίδιο χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τριών αξόνων συμμετρίας. Στο κέντρο των πενταμερών βρίσκεται ο πενταμερής (5X) άξονας συμμετρίας ενώ μεταξύ των πενταμερών βρίσκονται ο τριμερής (3X) και ο διμερής (2X) άξονας συμμετρίας. Πιο συγκεκριμένα, πέντε μόρια της VP1 περιβάλλουν τον πενταμερή άξονα συμμετρίας, ενώ οι VP2 και VP3 εναλλάσσονται γύρω από τον τριμερή άξονα συμμετρίας. Η VP4 πρωτεΐνη βρίσκεται εξ ολοκλήρου στο εσωτερικό του καψιδίου. (Blondel et al. 1998).

Ένα ή δυο μόρια της VP0 παραμένουν μη διασπασμένα σε κάθε καψίδιο. Η VP4 φαίνεται έτσι να είναι η συνέχεια του αμινοτελικού άκρου της VP2 (Stanway et al., 1990). Η VP4 είναι η μικρότερη καψιδική πρωτεΐνη και βρίσκεται στην εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου, κάτω από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες. Το κάθε πενταμερές σταθεροποιείται από ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του καρβοξυτελικού και αμινικού άκρου των VP1 και VP3 μαζί με την VP4. Γειτονικά πενταμερή συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τμημάτων των VP2 και VP3. Στην σταθερότητα της δομής του καψιδίου μπορεί να συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, όπως για παράδειγμα η σύνδεση του αμινοτελικού άκρου της VP4 με μυριστικό οξύ (Chow et al., 1987). Το λιπώδες αυτό οξύ υπάρχει και σε ιούς άλλων οικογενειών και η λειτουργική αυτή διαφοροποίηση του αμινοτελικού άκρου της VP4 εκτός από την δημιουργία του καψιδίου, συμβάλλει στην προσκόλληση του ιού στους υποδοχείς του ξενιστή και στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού στο κυτταρικό περιβάλλον. Σημαντικό ρόλο στην απελευθέρωση του νουκλεϊκού οξέος στον ξενιστή παίζει η δυνατότητα φωσφορυλίωσης των VP2 και VP4 από κυτταρικές κινάσες, κάτι που οδηγεί στην αποσταθεροποίηση του καψιδίου.

1.2.2 Ιδιότητες δομικών πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες του καψιδίου διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς το μέγεθος, όσο και ως προς την αμινοξική τους αλληλουχία. Ωστόσο, οι καψιδιακές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3 έχουν παρόμοια τριτοταγή διαμόρφωση. Συγκεκριμένα, το κοινό δομικό μοτίβο που παρουσιάζουν είναι ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι 8 κλώνων.

Οι κλώνοι των β-βαρελιών συνδέονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές που προεξέχουν από την επιφάνεια του καψιδίου και οι οποίες είναι χαρακτηριστικές για κάθε πρωτεΐνη. Οι «θηλιές» αυτές προεξέχουν στην επιφάνεια του ιϊκού καψιδίου και είναι ποικιλόμορφες. Σε μια ανοσολογική απόκριση του οργανισμού ξενιστή εναντίον του ιού, τα αντισώματα που είναι ικανά να εμποδίσουν την ιϊκή μόλυνση, αναγνωρίζουν τις «θηλιές» αυτές, οι οποίες για το λόγο αυτό αποτελούν τα κύρια στοιχεία των αντιγονικών τόπων του ιού. Οι πολιοϊοί έχουν τέσσερις αντιγονικές περιοχές οι οποίες χαρτογραφούνται στις τρεις κύριες πρωτεΐνες του ιϊκού καψιδίου (VP1, VP2 και VP3).



Εικόνα 1.2.2.1 Η δομή των καψιδικών πρωτεϊνών των πολιοϊών (VP1, VP2, VP3) (Pfister et al., 1999)

Αυτές οι αμινοξικές θηλιές λοιπόν αποτελούν τις κύριες δομές των αντιγονικών θέσεων του ιού (N- Ags). Στους πολιοϊούς έχουν αναγνωριστεί 4 θέσεις πρόσδεσης αντισωμάτων (N- Ags). Συγκεκριμένα στους πολιοϊούς τύπου 1, 2 και 3η N-AgI, η N-AgII, η N-AgIIIa και η N-AgIIIb οι οποίες αποτελούνται από αμινοξέα των δομικών πρωτεϊνών του καψιδίου VP1 VP2 και VP3 (Minor et al., 1986).

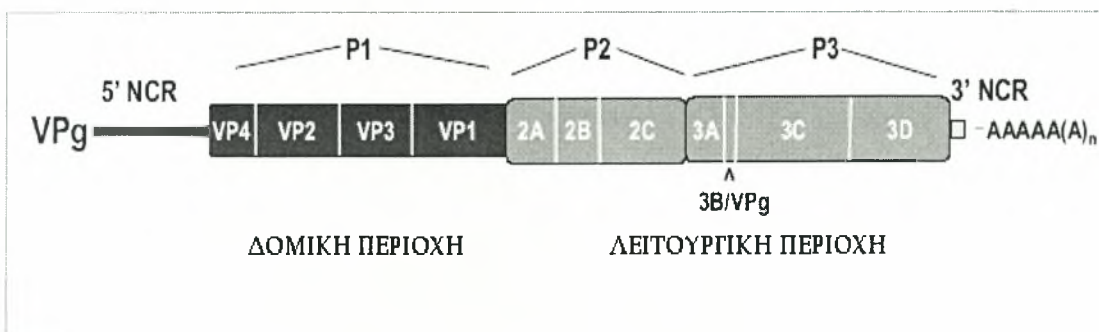
Στο εξωτερικό του καψιδίου γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας εδράζεται μια εκτεταμένη διαμόρφωση αύλακας γνωστή και ως canyon. Η αύλακα σχηματίζεται από αμινοξέα των VP1, VP2 και VP3. Το βόρειο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 91-107 και 166-169 της VP1, το νότιο τμήμα της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 138-142 και 172 της VP2 και 223-226 της VP1. Η βάση της αύλακας σχηματίζεται από τα αμινοξέα 228-235 της VP1 και 180 της VP3. Η αύλακα πιστεύεται πως αποτελεί τη θέση πρόσδεσης του κυτταρικού υποδοχέα CD155 των πολιοϊών (Colston & Racaniello 1994; Belnap et al., 2000; He et al., 2000).

Στη βάση της αύλακας, στο εσωτερικό του β-βαρελιού της VP1 βρίσκεται ένα λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης, το οποίο πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του καψιδίου και επίσης πιστεύεται ότι ελέγχει την ικανότητα του καψιδίου να πραγματοποιεί δομικές μεταβολές κατά την προσκόλληση του ιού στο κύτταρο ξενιστή, με σκοπό την απελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο κυτταρικό περιβάλλον. Οι σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις που είναι υπεύθυνες για τη σταθερότητα του καψιδίου σημειώνονται μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών. Ειδικότερα γύρω από τον πενταμερή άξονα συμμετρίας τα αμινοτελικά άκρα 5 μορίων της VP3 δημιουργούν ένα σχηματισμό β-κυλίνδρου. Η συγκεκριμένη δομή περιβάλλεται από 5 β-πτυχωτά φύλλα τριών κλώνων το καθένα, που σχηματίζονται από τα αμινοτελικά άκρα των VP4 και VP1. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο αυτών δομών συντονίζονται μέσω του μυριστικού οξέος που βρίσκεται προσδεμένο στην VP4 (Chow et al., 1987). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πενταμερών σταθεροποιούνται μέσω της δομής ενός β-βαρελιού 7 κλώνων το οποίο συντίθεται από 4 β-κλώνους της δομής β-βαρελιού της VP3 και 1 β-κλώνο που προέρχεται από το αμινοτελικό άκρο της VP1, ο οποίος εσωκλείει 2 β-κλώνους που προέρχονται από το

αμινοτελικό άκρο της VP2 πρωτεΐνης του γειτονικού πενταμερούς (Colston & Racaniello 1994). Τέλος, πιστεύεται ότι το αμινοτελικό άκρο της VP1 συμμετέχει στην καψιδίωση του ιικού RNA (Kirkegaard, 1990).

1.3 Οργάνωση γονιδιώματος πολιοϊών

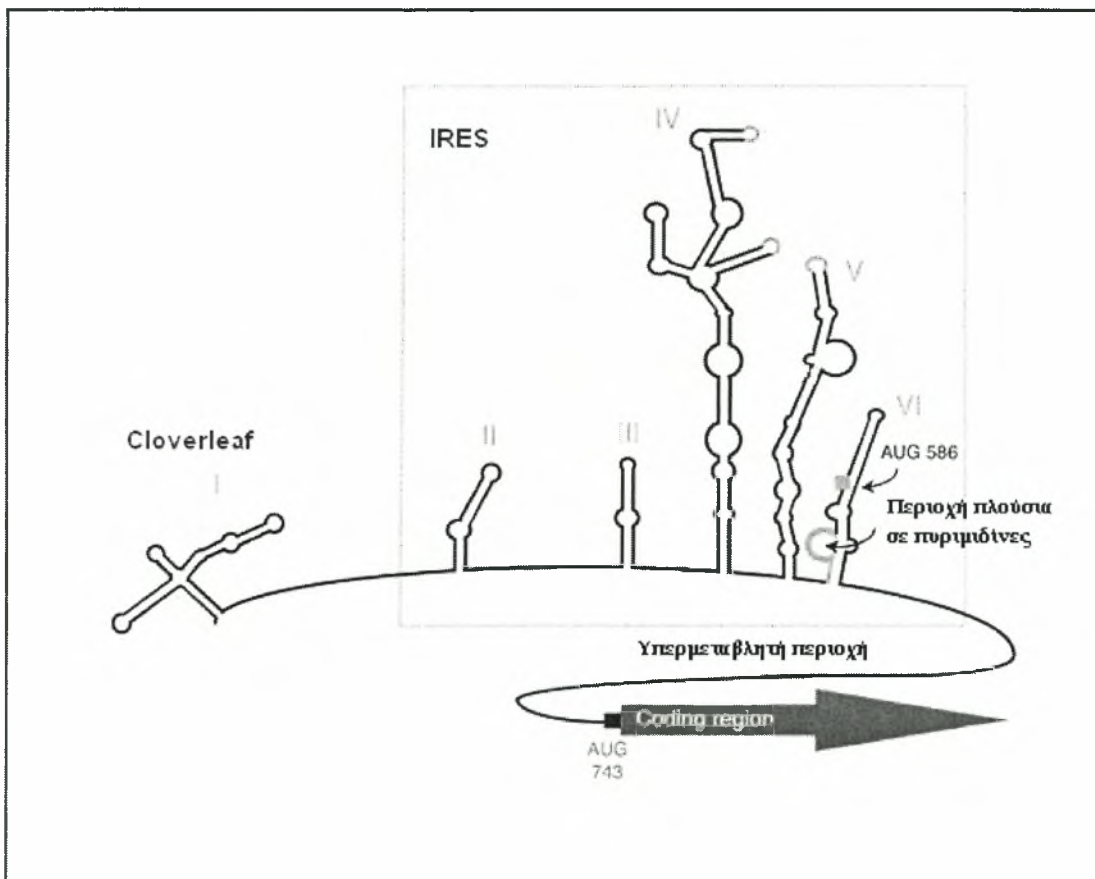
Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται από ένα μονόκλωνο μόριο μολυσματικού RNA θετικής πολικότητας με μέγεθος περίπου 7.500 νουκλεοτιδίων, το οποίο είναι πολυαδενυλιωμένο στο 3'-άκρο του και συνδεδεμένο με μία μικρή ιική πρωτεΐνη (VPg) στο 5'-άκρο του (Wimmer et al. 1993). Το γονιδίωμα των πολιοϊών χωρίζεται στις εξής τέσσερις περιοχές: 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR), ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) και πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly(A) tract). Η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλούχιση του γενώματος και των τριών οροτύπων των πολιοϊών αποκάλυψε έναν υψηλό βαθμό ομολογίας, αν και συγκεκριμένες περιοχές όπως μία αλληλουχία 154 nt που βρίσκεται στο τέλος της 5'-UTR περιοχής και οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες του καψιδίου είναι λιγότερο όμοιες (Wimmer et al. 1993).



Εικόνα 1.3.1: Χάρτης του γονιδιώματος των πολιοϊών. Στο 5' άκρο της 5'UTR είναι προσδεμένη η VPg πρωτεΐνη, κωδικοποιούμενη από τον ίδιο τον ιό και στο 3' άκρο της 3'UTR βρίσκεται η πολυαδενυλιωμένη περιοχή. Η κωδική περιοχή χωρίζεται σε τρία τμήματα, τα P1, P2 και P3. Η P1 περιοχή κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες ενώ οι P2 και P3 περιοχές κωδικοποιούν τις λειτουργικές πρωτεΐνες του ιού.

1.3.1 Η 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR)

Η 5'-UTR είναι μία περιοχή μεγέθους 742 nt, πλούσια σε περίπλοκες δευτεροταγές δομές και περιλαμβάνει 6 ξεχωριστά δομικά στοιχεία RNA (I-VI). Τα πρώτα 100 nt σχηματίζουν μία δομή που είναι γνωστή ως cloverleaf (δομικό στοιχείο I) και η οποία αποτελεί ένα απαραίτητο cis-acting γενετικό στοιχείο που εμπλέκεται στην έναρξη της αντιγραφής του κλώνου θετικής πολικότητας και είναι επίσης σημαντική για τη σταθερότητα του RNA. Αυτή η δομή ακολουθείται από ένα δεύτερο cis-acting γενετικό στοιχείο γνωστό ως IRES (internal ribosomal entry site) μεγέθους περίπου 400 nt που περιλαμβάνει τα δομικά στοιχεία II-VI και το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της μετάφρασης (Εικόνα 1.3.1.1).

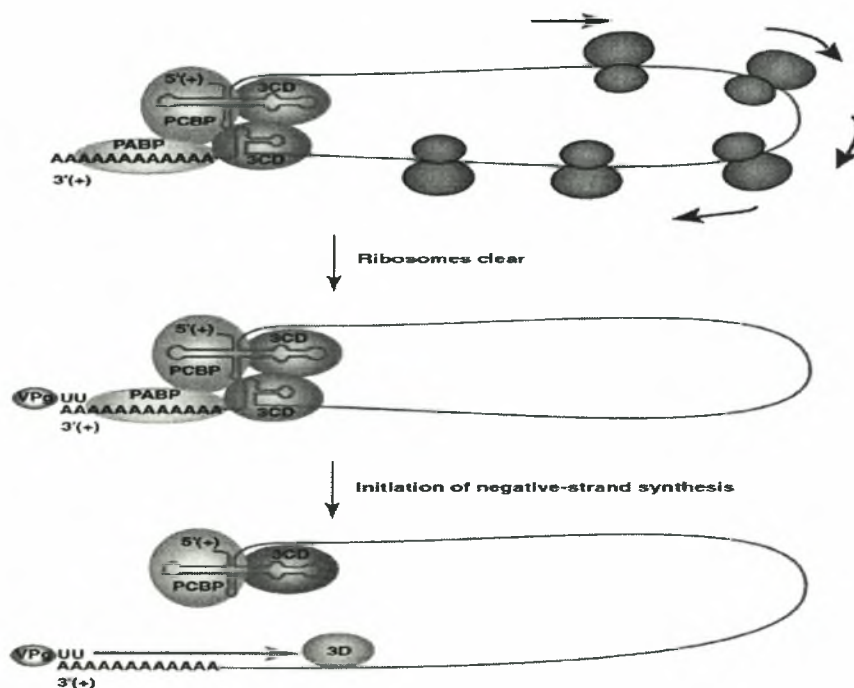


Εικόνα 1.3.1.1: Απεικόνιση της 5' μη μεταφραζόμενης περιοχής.

Η αλληλουχία της 5'-UTR περιοχής εμφανίζει μεγάλη ομολογία μεταξύ των τριών οροτύπων των πολιοϊών γεγονός το οποίο είναι πολύ σημαντικό για την διατήρηση της δευτεροταγούς δομής της και την συμμετοχή της σε σημαντικές λειτουργίες του ιού πχ εγκλεισμό του RNA στο ιικό καψίδιο και στον πολλαπλασιασμό του ιού.

Το cloverleaf αποτελείται από 4 δομές μίσχου – θηλιάς τις a, b, c και d. Το cloverleaf διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές λειτουργίες του ιού σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα είτε με ικές είτε με κυτταρικές πρωτεΐνες.

Συγκεκριμένα, μέσω της πρόσδεσης της κυτταρικής πρωτεΐνης Poly(rC) binding protein 2 (PCBP 2) στην περιοχή b στο cloverleaf, το ικό RNA σταθεροποιείται. Επίσης επιτυγχάνεται η κυκλοποίηση του ικού γενώματος, που είναι απαραίτητη για τη μετάφραση και την αντιγραφή του ιού, μέσω της αλληλεπίδρασης των PCBP2 (προσδεδεμένη σε cloverleaf) και της Poly (A) binding protein (PABP) η οποία είναι προσδεδεμένη στην poly(A)tract (Herold & Andino, 2001).



Εικόνα 1.3.1.2: Αλληλεπίδραση των 5' και 3' άκρων (κυκλοποίηση του ικού γενώματος).

Το cloverleaf επίσης συντονίζει τη μετάβαση από τη μετάφραση του ιικού γενώματος στην αντιγραφή. Η μετάφραση του ιικού γενώματος ευνοείται με την πρόσδεση μόνο της PCBP2 στο cloverleaf. Ωστόσο η πρόσδεση της ιικής πρωτεΐνης 3CD (στην περιοχή d) μαζί με την PCBP2 στο cloverleaf, οδηγεί στην παύση της μετάφρασης και στην έναρξη της αντιγραφής (Gamarnic & Andino, 1998). Το cloverleaf ακολουθείται από ένα δεύτερο cis-acting γενετικό στοιχείο γνωστό ως IRES (internal ribosomal entry site) μεγέθους περίπου 400 nt το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της μετάφρασης.

Το IRES απαρτίζεται από 5 διακριτά δομικά RNA στοιχεία (II-VI), μια περιοχή πλούσια σε πυριμιδίνες, ένα κωδικόνιο έναρξης AUG, το οποίο είναι σιωπηλό και μία υπερμεταβλητή περιοχή. Η βασική λειτουργία του IRES είναι η προαγωγή της μετάφρασης. Η συγκεκριμένη λειτουργία επιτελείται μέσω της πρόσδεσης των ριβοσωμάτων και των κανονικών παραγόντων μετάφρασης στο εσωτερικό του IRES και της μετακίνησής τους μέχρι το κωδικόνιο έναρξης μετάφρασης. Εκτός των κανονικών παραγόντων μετάφρασης, στο IRES προσδένονται και αρκετές άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες οι οποίες οι οποίοι συνδέονται στο στοιχείο IRES και προάγουν την μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA όπως η La, unρ PCBP2 και Polygyrimidine Tract-Binding protein (PTB). Η PCBP2 προσδένεται στη δομή IV του IRES, ενώ στη συνέχεια προσδένεται στην PCBP2. Η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνη για την «στρατολόγηση» των ριβοσωμάτων στο IRES (Sharma et al., 2004). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες πιστεύεται ότι έχουν ιδιότητα συνοδού μορίου (chaperon) και προσδενόμενες στο IRES το καθοδηγούν να λάβει την διαμόρφωση εκείνη που είναι η ευνοικότερη για την πρόσδεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (Jackson & Kaminski, 1995).

1.3.2 Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF)

Το mRNA των πολιοϊών χαρακτηρίζεται ως μονοκιστρονικό. κωδικοποιεί δηλαδή μια πολυπρωτεΐνη, η οποία με αυτοκαταλυτική πρωτεολυτική διάσπαση θα δώσει ώριμες δομικές

και λειτουργικές πρωτεΐνες με διαφορετικές λειτουργίες (πρωτεΐνες καψιδίου, RNA πολυμεράση, πρωτεάσες, πρωτεΐνες για την σύνθεση του RNA, κ.α.). Η κωδικοποίηση ενός πολυπεπτιδίου από ένα μόνο mRNA παρέχει στους ιούς αυτούς το πλεονέκτημα της περαιτέρω συμπίεσης του γενώματός τους καθώς δεν απαιτούνται γενετικά στοιχεία για την ρύθμιση της μεταγραφής υπογενωμικών mRNA.

Η διάσπαση επιτελείται από δύο κύριες ιικές πρωτεΐνάσες. Η 2A πρωτεάση κόβει μεταξύ του καρβοξυτελικού άκρου της VP1 και του δικού της αμινοτελικού άκρου, ξεχωρίζοντας έτσι τις δομικές από τις μη δομικές πρωτεΐνες. Η υπόλοιπη επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης πραγματοποιείται από την πρωτεάση 3C ή από την πρόδρομη πρωτεΐνη 3CD (Baxter et al., 2006).

1.3.3 Δομική περιοχή

Η δομική περιοχή του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης κωδικοποιεί τις δομικές πρωτεΐνες του ιού VP1, VP2, VP3 και VP4, οι οποίες όπως προαναφέρθηκε συμμετέχουν στο σχηματισμό του ιικού καψιδίου. Οι δομικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το 5' άκρο του ORF.

1.3.4 Λειτουργική περιοχή

Οι γενετικές πληροφορίες για την παραγωγή των μη-δομικών πρωτεϊνών των εντεροϊών βρίσκονται προς το 3' άκρο του γενετικού υλικού (Stanway G., 1990). Η λειτουργική περιοχή του γονιδιώματος των πολιοϊών κωδικοποιεί πρωτεΐνες (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) καθώς και λειτουργικά ενδιάμεσα των πρωτεϊνών αυτών (2BC, 3AB, 3CD), που διαδραματίζουν σημαντικούς ρόλους σε πολλές λειτουργίες του ιού (πίνακας 1.3.4.1), όπως η ιική αντιγραφή, η επεξεργασία της ιικής πολυπρωτεΐνης, το σταμάτημα των κυτταρικών λειτουργιών, η αλλαγή διαμόρφωσης των κυτταρικών μεμβρανών και η δημιουργία κυστιδίων. Οι πρωτεΐνες αυτές αποδείχτηκε ότι διατηρούνται φυλογενετικά περισσότερο από ότι οι καψιδικές πρωτεΐνες σύμφωνα με συγκριτικές μελέτες που έχουν γίνει μεταξύ μη - δομικών πρωτεϊνών διαφόρων *picorna* ιών.

		ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ
Μη-δομικές πρωτεΐνες	2A	Πρωτεάση της κυστεΐνης: καταλύει το πρωτεολυτικό κόψιμο μεταξύ των περιοχών P1 και P2 της ικής πολυπρωτεΐνης διαχωρίζοντας έτσι τις πρόδρομες πρωτεΐνες του καψιδίου από αυτές των μη δομικών πρωτεϊνών.
	2B	Όπως και η πρόδρομη 2BC εμποδίζουν την μεταφορά πρωτεϊνών από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi και αυξάνει την διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης.
	2C	Ελικάση: συμβάλει στην σύνθεση του ιικού RNA.
	3A	Αναστέλλει την μεταφορά πρωτεϊνών από το ΕΔ στο Golgi, με αποτέλεσμα να μειώνει τις εκκρίσεις (αντιαποπτωτικό αποτέλεσμα για το κύτταρο) και συμβάλει στη σύνθεση του RNA θετικής πολικότητας και σωστή επεξεργασία της ικής πολυπρωτεΐνης.
	3AB	Σημαντικό ρόλο στη συναρμογή του αντιγραφικού συμπλέγματος του ιού καθώς αλληλεπιδρά τόσο με την 2BC και με την ική πολυμεράση 3D επίσης 3AB προσδένει το λειτουργικό ενδιάμεσο 3CD και διεγείρει την αυτοκατάλυσή του σε 3C και 3D.
	3B	VPg: Συμμετέχει στην έναρξη της αντιγραφής του γενώματος του ιού.
	3C	Πρωτεάση κυστεΐνης: Διεξάγει την πλειοψηφία των πρωτεολυτικών διασπάσεων.
	3CD	Παρουσιάζει ισχυρότερη δραστικότητα πρωτεάσης από την 3C, αλλά δεν παρουσιάζει δραστικότητα πολυμεράσης. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ική αντιγραφή συμβάλλοντας στη δημιουργία κυστιδίων αντιγραφής και σηματοδοτώντας την εκκίνηση της ικής αντιγραφής και αυτοκαταλύεται σε 3C και 3D.
	3D	Ιική RNA πολυμεράση: αντιγράφει το γένωμα του ιού και παράγει θετικής και αρνητικής πολικότητας RNA. Επίσης έχει δραστηριότητα ελικάσης.

Πίνακας 1: Οι μη-δομικές πρωτεΐνες των πολιοϊών και η λειτουργίες τους.

1.3.5 Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR)

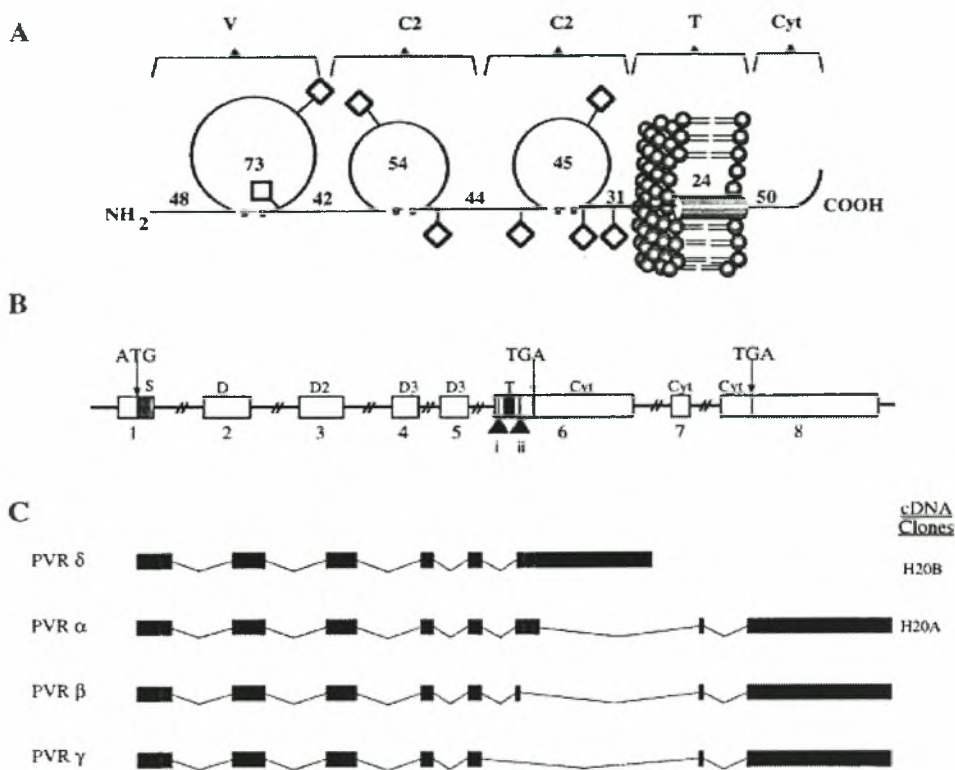
Η 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή (3' UTR) αποτελείται από 65 νουκλεοτίδια και δημιουργεί ένα μοτίβο τριτοταγούς δομής. Ενώ η αλληλουχία της 3'-UTR ποικίλει μεταξύ των διαφόρων στελεχών των εντεροϊών, η ύπαρξη πολύ συντηρημένων δευτεροταγών δομών υποδηλώνει ότι αυτές οι δομές είναι οι λειτουργικές μονάδες που εμπλέκονται στην αντιγραφή. Στην περιοχή αυτή του γενώματος παρουσιάζονται δύο θηλιές (X και Ψ) οι οποίες αλληλεπιδρούν μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου, δημιουργώντας έτσι το μοτίβο τριτοταγούς δομής (Wimmer et al. 1993). Στο τέλος της η 3' UTR φέρει μια poly-(A) ουρά (αντίστοιχα υπάρχει poly-(U) τμήμα στην αντίστοιχη περιοχή του αρνητικής πολικότητας RNA), η οποία σε αντίθεση με τα ευκαρυωτικά mRNA, κωδικοποιείται γενετικά από τον ίδιο τον ιό. Η περιοχή αυτή φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή του ιού (Rohll et al., 1995). Η πρόσδεση κυτταρικών παραγόντων στην 3' UTR φέρνει την poly(A)tail κοντά στην 3D διεγείροντας με αυτόν τον τρόπο την εκκίνηση του κλώνου αρνητικής πολικότητας κατά την ιική αντιγραφή. Ωστόσο, η 3' UTR δεν είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικού κλώνου (Dobrikova et al., 2003). Η πολυαδενλική ουρά (poly(A)tail) στους πολιοϊούς έχει μήκος 80 νουκλεοτίδια και συμμετέχει στην ιική αντιγραφή. Συγκεκριμένα, η πρόσδεση της PABP στην poly(A)tail έχει σαν αποτέλεσμα την κυκλοποίηση του ιικού γενώματος που είναι απαραίτητη για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Τέλος η Poly(A)tail δρα σαν καλούπι για την VPg εξαρτώμενη, εκκίνηση της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου (Silvestri et al., 2006).

2. ΚΥΚΛΟΣ ΖΩΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Ο κύκλος ζωής των πολιοϊών αρχίζει με την προσκόλληση του καψιδίου στους κατάλληλους υποδοχείς (κυτταρικό υποδοχέα CD155) στην επιφάνεια του κυττάρου-ξενιστή. Η προσκόλληση αυτή δίνει τα ερεθίσματα για αλλαγές στη χωροδιάταξη του καψιδίου, οδηγώντας στο σχηματισμό των σωματιδίων A (προέρχονται από το καψίδιο έχοντας χάσει την πρωτεΐνη VP4). Το γενετικό υλικό του ιού που έχει απελευθερωθεί στο κύτταρο δρα ως mRNA και η μετάφρασή του οδηγεί στη δημιουργία της πολυπρωτεΐνης, η οποία διασπάται πρωτεολυτικά δίνοντας τις δομικές και τις μη-δομικές πρωτεΐνες του ιού (Hellen et al., 1991). Μετά την μετάφραση του ιικού γενώματος ξεκινάει η αντιγραφή του. Το πρώτο στάδιο της αντιγραφής είναι η δημιουργία του αρνητικού κλώνου ο οποίος χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την σύνθεση του θετικού κλώνου. Στη συνέχεια ακολουθεί ο εγκλεισμός του γενετικού υλικού σε πρώιμη μορφή ιϊκού σωματιδίου το οποίο αποτελείται από τις πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3. Όταν πραγματοποιηθεί ο εγκλεισμός αυτός του γενώματος, η VP0 διασπάται στις VP2 και VP4 δίνοντας πλέον ένα ώριμο ιϊκό σωματίδιο. Εξαιτίας της αναστολής της πρωτεϊνοσύνθεσης από τον ιό, τελικά ο ξενιστής καταστρέφεται, επιτρέποντας την τελική απελευθέρωση των ιών .

2.1 Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ CD155 ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Όπως αναφέρθηκε, το αρχικό γεγονός του κύκλου ζωής των πολιοϊών είναι η πρόσδεση του ιού στον υποδοχέα. Στους ανθρώπους ο υποδοχέας των πολιοϊών (hPVR) έχει ταυτοποιηθεί ως ένα μέλος της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών. Ο hPVR, μία γλυκοσυλιωμένη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 80 KDa αποτελείται από τρεις περιοχές, οι οποίες βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία καρβοξυτελική κυτταροπλασματική ουρά (εικόνα 3.1.1.A).



Εικόνα 2.1.1: A: οι λειτουργικές περιοχές του hPVR. B) το γονίδιο του hPVR. C) οι τέσσερις ισομορφές του υποδοχέα (Από D. Solecki et al. 1998).

Η αμινοτελική εξωτερική περιοχή V του υποδοχέα παρουσιάζει δίπλωμα παρόμοιο με αυτό της μεταβλητής περιοχής ανοσοσφαιρινών, ενώ οι υπόλοιπες 2 εξωτερικές περιοχές C2, παρουσιάζουν δίπλωμα σταθερών περιοχών ανοσοσφαιρίνης. Η N-τελική V περιοχή του hPVR είναι απαραίτητη για την μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς και συνεπώς για την πρόσδεση του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Η αμινοτελική περιοχή του υποδοχέα προσδέεται στην ιική αύλακα κατά την αλληλεπίδραση ιού - υποδοχέα και «πυροδοτεί» την απελευθέρωση του ιικού RNA. . Το γονίδιο του hPVR έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα 19q 13.1-13.2 και περιέχει οκτώ εξόνια (εικόνα 3.3.1.B). Ο hPVR εκφράζεται ως ένα μίγμα τεσσάρων ισομορφών οι οποίες προκύπτουν με εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου του (εικόνα 3.3.1.C): δύο ενσωματωμένες στη μεμβράνη ισομορφές (hPVRα και hPVRδ) και δύο εκκρινόμενες ισομορφές από τις οποίες απουσιάζει το εξόνιο της διαμεμβρανικής περιοχής

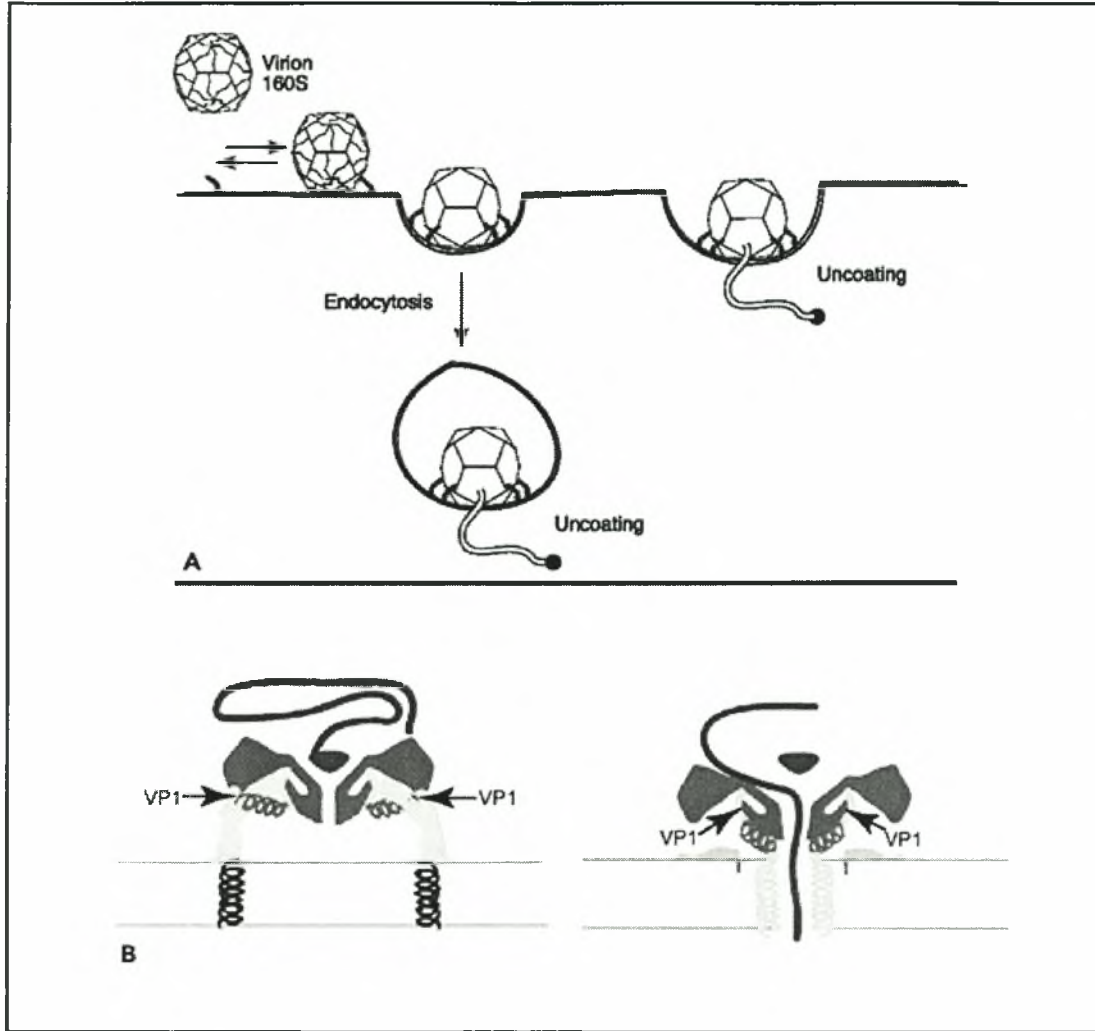
(hPVRβ και hPVRγ). Οι ισομορφές hPVRα και hPVRδ χρησιμοποιούνται ως υποδοχείς του ιού και διαφέρουν μόνο στην αλληλουχία της C-τελικής κυτταροπλασματικής περιοχής τους και οι άλλες 2 είναι εκκρινόμενες από το κύτταρο (Pfister et al., 1999).

2.2 ΠΡΟΣΔΕΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ ΣΤΟΝ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΚΑΙ ΕΙΣΟΔΟΣ ΙΚΟΥ RNA ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Η λειτουργία του hPVR είναι διπλή κατά την μόλυνση των πολιοϊών: είναι υπεύθυνος τόσο για την πρόσδεση του ιού στην κυτταρική επιφάνεια όσο και για την αποσταθεροποίηση του ιικού σωματιδίου η οποία επιτυγχάνεται μέσω μεταβολών της διαμόρφωσης του καψιδίου απαραίτητων για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος στο κύτταρο. Αυτές οι στερεοδομικές μεταβολές στο καψίδιο του ιού μετατρέπουν τους πολιοϊούς σε μορφές γνωστές ως «Α σωματίδια» (Wimmer et al, 1994).

Αυτές οι μεταβολές της διαμόρφωσης περιλαμβάνουν την απώλεια της εσωτερικής πρωτεΐνης του καψιδίου VP4 και την εξώθηση του εσωτερικού N-τελικού άκρου της VP1. Επίσης, θεωρείται πιθανό ότι η ικανότητα του καψιδίου να υφίσταται αυτές τις μεσολαβούμενες από τον υποδοχέα δομικές μεταβολές ρυθμίζεται από ένα υδρόφοβο λιπιδικό μόριο σφιγγοσίνης γνωστό και ως <rocket factor> το οποίο προσδένεται στη βάση της αύλακας (canyon) και συγκεκριμένα στον πυρήνα του β-βαρελιού της VP1. Τα ιικά σωματίδια εισέρχονται στο κύτταρο, είτε απευθείας μέσω της πλασματικής μεμβράνης μετά την πρόσδεση στον υποδοχέα είτε με ενδοκύττωση μεσολαβούμενη από τον υποδοχέα. Ωστόσο, έχει αποδειχτεί ότι δεν απαιτείται ένα στάδιο χαμηλού pH για την απελευθέρωση του ιικού γενώματος. Η αλληλεπίδραση του υποδοχέα με το βόρειο μέρος της αύλακας οδηγεί στην απελευθέρωση του μορίου σφιγγοσίνης και «πυροδοτεί» την είσοδο του ιικού RNA στο κύτταρο (He et al., 2003). Συγκεκριμένα, τα 31 πρώτα αμινοξέα του αμινοτελικού άκρου της VP1 (θεωρείται ότι σχηματίζουν μια αμφιπαθική έλικα) σε συνδυασμό με την VP4, εξέρχονται από την εσωτερική επιφάνεια του καψιδίου και προσδένονται στις λιποσωμικές μεμβράνες των κυττάρων ξενιστών. Η πρόσδεσή τους στις λιποσωμικές

μεμβράνες των κυττάρων οδηγεί στη δημιουργία ενός πόρου-καναλιού, μέσω του οποίου εισέρχεται το ιικό RNA στο κύτταρο (Bubeck et al., 2005) (Εικόνα 3.2.1).



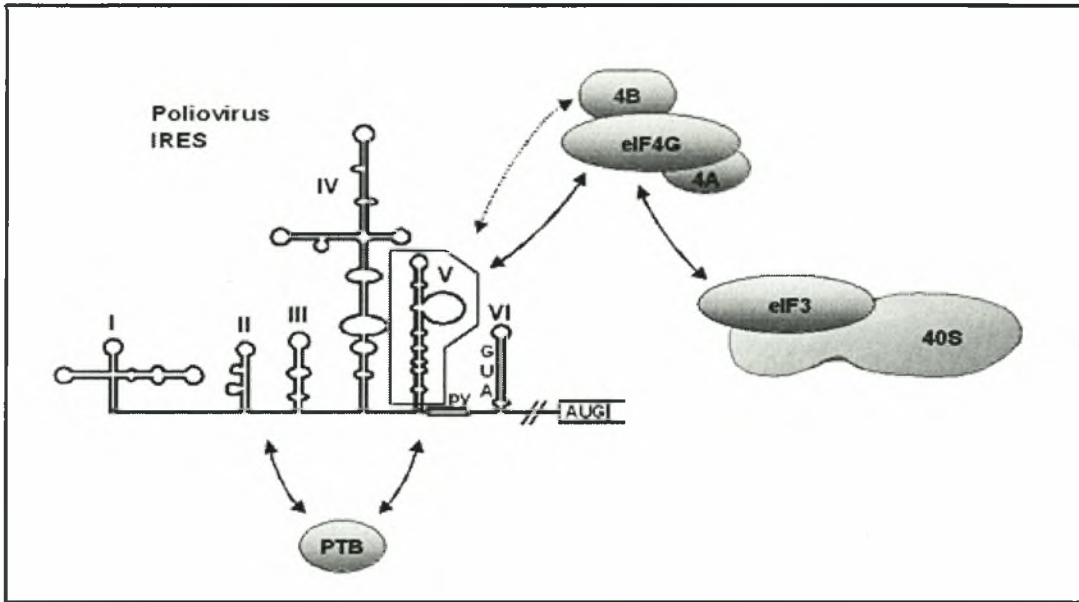
Εικόνα 2.2.1: **A.** Μοντέλο εισόδου του πολιοϊού μέσα στο κύτταρο. **B.** Αλληλεπίδραση ιού-υποδοχέα και είσοδος ιικού RNA στο κύτταρο: έξοδος N- τελικού άκρου VP1,VP4 και πρόσδεσή τους σε κυτταρικές μεμβράνες, δημιουργία καναλιού και είσοδος ιικού RNA στο κύτταρο (Από Fields Virology, 5th Ed).

2.3 ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ

Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού RNA δεν απαιτεί μία 5' m⁷G δομή καλύπτρας και η πρόσδεση της 40S ριβοσωμικής υπομονάδας συμβαίνει σε μία εσωτερική αλληλουχία, γνωστή ως IRES, η οποία βρίσκεται 100 nt upstream του κωδικονίου έναρξης AUG. Έπειτα από την είσοδο του ιικού RNA στο κυτταρόπλασμα, μία κυτταρική πρωτεάση (VPg-Unlinkase) απομακρύνει την VPg από το 5' άκρο του ιικού γενώματος και πραγματοποιείται η μετάφραση του από τα ριβοσώματα του κυττάρου σε μια πολυπρωτεΐνη. Κατά την έναρξη της μετάφρασης στους πολιοϊούς, η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα κατευθύνεται σε μία μικρή περιοχή του IRES που εμπεριέχει το σιωπηλό κωδικόνιο AUG, πιθανόν μέσω της δράσης παραγόντων έναρξης. Για την μετάφραση του ιικού RNA σχεδόν όλοι οι παράγοντες έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eIFs) είναι απαραίτητοι, με μοναδική εξαίρεση τον παράγοντα eIF4E ο οποίος αναγνωρίζει και προσδέεται στην καλύπτρα (cap). Στους πολιοϊούς η θέση πρόσδεσης των eIFs δεν είναι ακόμα γνωστή. Ωστόσο, έχει προταθεί ότι η πρόσδεσή τους γίνεται κυρίως στην περιοχή V του στοιχείου IRES καθώς κάθε μετάλλαξη που επηρεάζει τη δομή της καθιστά το IRES στοιχείο μη-λειτουργικό (Kerstin Ochs et al. 2002).

Εκτός όμως από τους καθιερωμένους παράγοντες έναρξης της μετάφρασης, στο IRES στοιχείο των Picornaίων προσδέονται και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου ξενιστή, που προάγουν την μετάφραση ή διαμορφώνουν την ισορροπία μεταξύ μετάφρασης και αντιγραφής του ιικού RNA. Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε κυτταρικοί trans-acting παράγοντες, εκ των οποίων οι τέσσερις είναι πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA: η πρωτεΐνη των 57kDa που προσδέεται στην πολυπυριμιδική περιοχή PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η πρωτεΐνη La των 52kDa (La auto antigen), η poly(rC) πρωτεΐνη PCBP2 (Poly(rC) Binding Protein2) των 39 kDa και η Unr (Upstream of N-Ras) (Murray et al, 2001; Costa-Mattioli et al, 2004; Boussadia et al., 2003). Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να είναι απαραίτητες αλλά όχι επαρκείς από μόνες τους για την έναρξη της μετάφρασης (Hunt S.L., 1999), εκτός από την Unr (κωδικοποιείται από ένα γονίδιο upstream του N-ras) η οποία είναι πράγματι αναγκαία σ' αυτή τη διαδικασία (Boussadia et al., 2003). Τέλος ο πέμπτος παράγοντας είναι ο ITAF₄₅,

μία πρωτεΐνη που σχετίζεται με τον κυτταρικό κύκλο (Kerstin Ochs et al. 2002, Oreda Boussadia et al. 2002).



Εικόνα 2.3.1: Η αλληλεπίδραση των eIF παραγόντων με το στοιχείο IRES κατά την έναρξη της μετάφρασης του ιού στο κύτταρο ξενιστή. Φαίνεται η PTB πρωτεΐνη που προσδέεται στην πολυπυριμιδική περιοχή καθώς και το σιωπηλό κωδικό AUG στην VI περιοχή της 5'UTR.

Τυπικά για την μετάφραση ενός ευκαρυωτικού mRNA, σχηματίζεται ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο, γνωστό ως 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο (Wells et al., 1998). Σε αυτήν τη δομή απαιτείται αρχικά η κυκλοποίηση του ιικού RNA, η οποία επιτυγχάνεται μέσω πρωτεϊνικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των PCBP2 και PABP, οι οποίες είναι προσδεδωμένες στο cloverleaf και στη poly(A)tail αντίστοιχα (Lyons et al., 2001). Σε αυτό το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο συμμετέχουν διάφοροι παράγοντες έναρξης της αντιγραφής. Πιο συγκεκριμένα, ο παράγοντας eIF4E αλληλεπιδρά με το 5'-κάλυμα του mRNA και με τον παράγοντα eIF4G, ο οποίος με τη σειρά του συνδέεται με την πρωτεΐνη PABP (poly(A)-binding protein) (Gallie D. R., 1991). Το C- τελικό τμήμα του eIF4G1 (το

αμινοτελικό άκρο έχει αφαιρεθεί πρωτεολυτικά από την 2A ιική πρωτεΐνη) προσδένεται στο ιικό RNA και δρα σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση των eIF4B και eIF4A μεταγραφικών παραγόντων, με αποτέλεσμα το σχηματισμό του συμπλόκου eIF4F. Στη συνέχεια η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (40S) σε σύμπλοκο με τους παράγοντες eIF1A(ελικάση), eIF3(μέσω του οποίου γίνεται η σύνδεση με την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα(40S)) και eIF2-GTP-mettRNA προσδένεται με το ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο eIF4F - ιικό RNA, δημιουργώντας το 43S προεναρκτήριο σύμπλοκο. Το προεναρκτήριο σύμπλοκο κινείται κατά μήκος του IRES μέχρι να συναντήσει το κωδικόνιο έναρξης. Τέλος, προσδένεται η μεγάλη υπομονάδα (60S) του ριβοσώματος δημιουργώντας το ολοκληρωμένο ριβόσωμα που φέρει εις πέρας τη μετάφραση (Prevoet et al., 2003).

Η έναρξη της μετάφρασης του ιικού γενώματος, σηματοδοτεί και μια σειρά αλλαγών μέσα στο κύτταρο ξενιστή, όπως για παράδειγμα τροποποίηση των κανονικών μεταφραστικών παραγόντων (Lloyd, 1988). Μετά από μόλυνση από εντεροϊό, παρατηρείται κόψιμο των παραγόντων όπως προαναφέρθηκε, eIF4GI και eIF4GII, παράγοντας έτσι ένα αμινοτελικό και ένα καρβοξυτελικό τμήμα. Από αυτά τα δύο τμήματα, το ένα αλληλεπιδρά με τον παράγοντα eIF4E και κατά συνέπεια με το 5'-κάλυμα ενώ το άλλο τμήμα, με την ελικάση (eIF4A), την PABP και τον παράγοντα eIF3 μέσω του οποίου γίνεται η σύνδεση με την μικρή ριβοσωμική υπομονάδα (Lamphear et al., 1995). Αντίθετα με τον παράγοντα eIF4G, η PABP κόβεται κατά τη διάρκεια τη μόλυνσης. Είναι φανερό ότι αυτές οι αλλαγές στο μολυσμένο κύτταρο εμποδίζουν την εξαρτώμενη από το 5'-κάλυμα μετάφραση των mRNA, ευνοώντας την μετάφραση μέσω στοιχείων IRES.

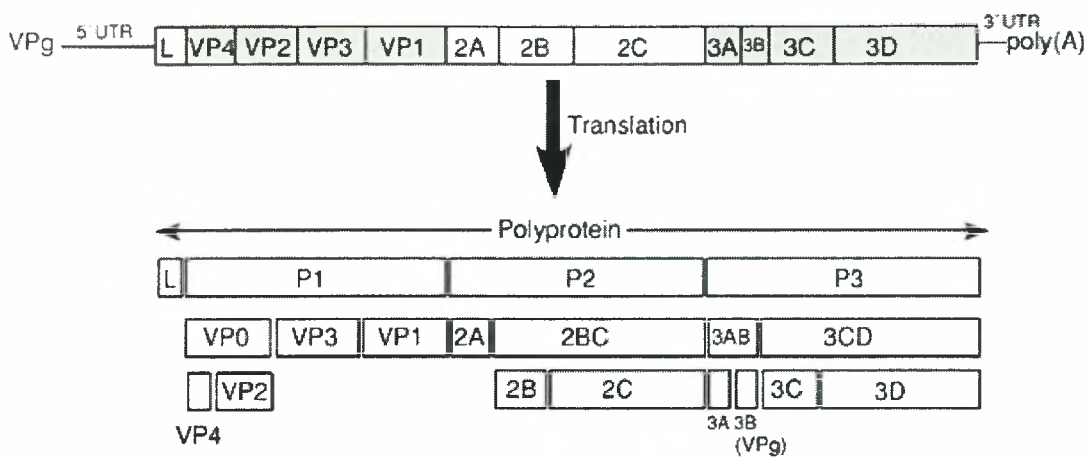
Κατά την μετάφραση του γενώματος των εντεροϊών, ο παράγοντας eIF4G συνδέεται στο στοιχείο IRES μέσω του παράγοντα eIF4B, οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο το ιικό mRNA στο ριβόσωμα (Ochs et al., 1999). Η σύνδεση του παράγοντα eIF4B στο στοιχείο IRES πραγματοποιείται στην δομική περιοχή V, ενώ αλληλουχίες της δομικής περιοχής VI συμβάλλουν στην σύνδεση αυτή του παράγοντα, χωρίς όμως να είναι απολύτως απαραίτητες για την μετάφραση του ιικού γενώματος.

Τελικά δημιουργείται μια πολυπρωτεΐνη η οποία θα δώσει όλες τις πρωτεΐνες του ιού με μια διαδικασία, στην οποία συμμετέχουν οι πρωτεάσες 2A, 3C και η 3CD του πολιοϊού.

2.4 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΙΙΚΗΣ ΠΟΛΥΠΡΩΤΕΪΝΗΣ

Μετά το πέρας της μετάφρασης του ιικού γενώματος, παράγεται η ιική πολυπρωτεΐνη η οποία είναι ασταθής και περιέχει όλες τις ικές πρωτεΐνες. Το γονιδίωμα των πολιοϊών είναι μονοσιστρονικό και κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη 247kDa. Η πολυπρωτεΐνη αυτή θα υποστεί πρωτεόλυση για την δημιουργία των δομικών και μη-δομικών πρωτεϊνών του ιού. Οι δομικές πρωτεΐνες VP1, VP2, VP3 και VP4 είναι προϊόντα ενός πρόδρομου πολυπεπτιδίου του P1, ενώ οι υπόλοιπες πρωτεΐνες προέρχονται από τα πρόδρομα μόρια P2 και P3. Η P2 περιοχή μετά την πρωτεολυτική διαδικασία θα δώσει τις ικές πρωτεΐνες 2A^{pro} (πρωτεάση) , την 2B και την 2C^{ATPase} , ενώ η P3 θα δώσει την 3A, την 3B^{VPg} , την 3C^{pro} και την 3D^{pol} (RNA πολυμεράση). Σε ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας δημιουργούνται πρόδρομα μόρια των παραπάνω μη-δομικών πρωτεϊνών όπως τα 2BC, 3AB και 3CD^{pro}, τα οποία έχουν διαφορετικές λειτουργίες από τις αντίστοιχες ώριμες πρωτεΐνες. Η πρωτεόλυση από τις 3C^{pro} και 3CD^{pro} συμβαίνει σε δεσμούς Gln-Gly ενώ από την 2A^{pro} σε δεσμούς Tyr-Gly.

Η επεξεργασία της πολυπρωτεΐνης συμβαίνει σε τρία στάδια μόλις ολοκληρωθεί η μετάφραση. Το πρώτο βήμα είναι ο αποχωρισμός της P1 πρόδρομου πρωτεΐνης. Αυτή η πρώτη τομή καταλύεται από την ιική πρωτεάση 2A^{pro} . Το δεύτερο βήμα είναι η δημιουργία των δομικών πρωτεϊνών από την P1 και των μη-δομικών από τις P2 και P3 με την σημαντική βοήθεια των πρωτεασών 3C^{pro} και 3CD^{pro}. Το τρίτο στάδιο αφορά το σχηματισμό των VP2 και VP4 από την VP0.



Εικόνα 2.4.1: Η διαδικασία της πρωτεόλυσης της ιικής πολυπρωτεΐνης. Παρουσιάζονται τα στάδια της διαδικασίας, οι πρωτεΐνες και τα πρόδρομα μόρια αυτών καθώς και οι ιϊκές πρωτεάσες που καταλύουν την αντίδραση (Από Fields Virology, 5th Ed).

2.5 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ

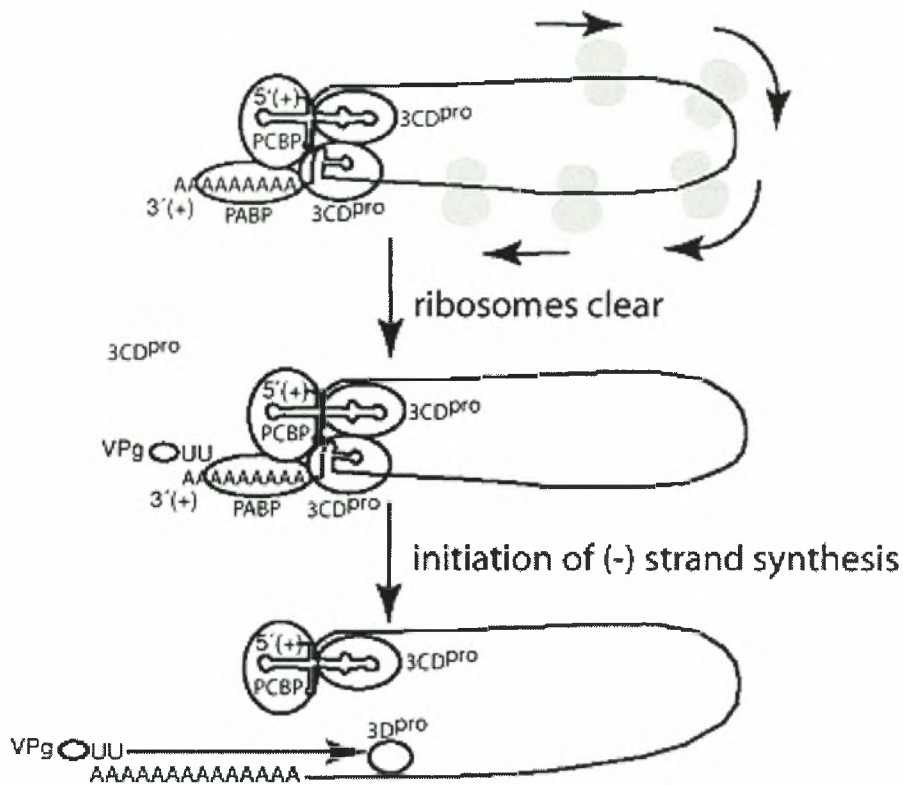
Η διαδικασία της αντιγραφής με την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας RNA (-RNA) ξεκινά όταν τα ριβοσώματα απομακρυνθούν από το RNA με την ολοκλήρωση της μετάφρασης. Το θετικής πολικότητας γένωμα των πολιοϊών χρησιμεύει σαν καλούπι για τη σύνθεση του συμπληρωματικού, αρνητικής πολικότητας κλώνου ο οποίος με τη σειρά του θα χρησιμοποιηθεί σαν καλούπι για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας.

Η ιική αντιγραφή λαμβάνει χώρα στα αντιγραφικά κυστίδια που αποτελούνται από τμήματα του ενδοπλασματικού δικτύου, του συμπλέγματος Golgi και των λυσοσωμάτων του κυττάρου. Τα σύμπλοκα αντιγραφής δημιουργούνται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια των κυστιδίων και περιλαμβάνουν προσδεδεμένες στα κυστίδια ιϊκές πρωτεΐνες όπως η RNA εξαρτώμενη RNA πολυμεράση $3D^{pol}$, η $2C^{ATPase}$, η 3A, η 3B και οι πρόδρομες αυτών 2BC και 3AB, οι οποίες λειτουργούν σαν υπόβαθρο για την πρόσδεση της ιικής πολυμεράσης 3D,

του ιικού RNA, το οποίο περιέχει cis-acting στοιχεία απαραίτητα για την σύνθεση του -RNA και κυτταρικών παραγόντων όπως η PCBP2, στα σύμπλοκα αντιγραφής (Egger et al., 2002). Cis-δραστικά στοιχεία που ρυθμίζουν την αντιγραφή αποτελούν η 3' UTR και η πολυαδενυλιωμένη ουρά, μιας και είναι γνωστό ότι το μέγεθος της πολυαδενυλιωμένης ουράς αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για την αντιγραφή του ιού (Barton et al., 2001), η δομή τριφυλλίου που βρίσκεται στο 5' άκρο της 5'-UTR επηρεάζει την σταθερότητα την μεταγραφή και την αντιγραφή των εντεροϊών. Θεωρείται ότι αυτή η δομή αλληλεπιδρά με την 3'-UTR μέσω πρωτεϊνών σχηματίζοντας ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό (RNP) σύμπλοκο, το οποίο είναι απαραίτητο για την έναρξη της αντιγραφής του κλώνου αρνητικής πολικότητας (Gamarnik et al., 1998).

Επίσης ένα τρίτο cis-δραστικό στοιχείο αποτελεί μια δομή φουρκέτας που βρίσκεται στην περιοχή 2C του γενώματος είναι απαραίτητη για την σύνθεση της VPgpUpU η οποία χρησιμοποιείται κατά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας. Με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιείται διαφορετικός μηχανισμός ουριδιλίωσης της πρωτεΐνης VPg, για την έναρξη της αντιγραφής των κλώνων θετικής και αρνητικής πολικότητας. (Goodfellow et al., 2000/Morasco et al., 2003).

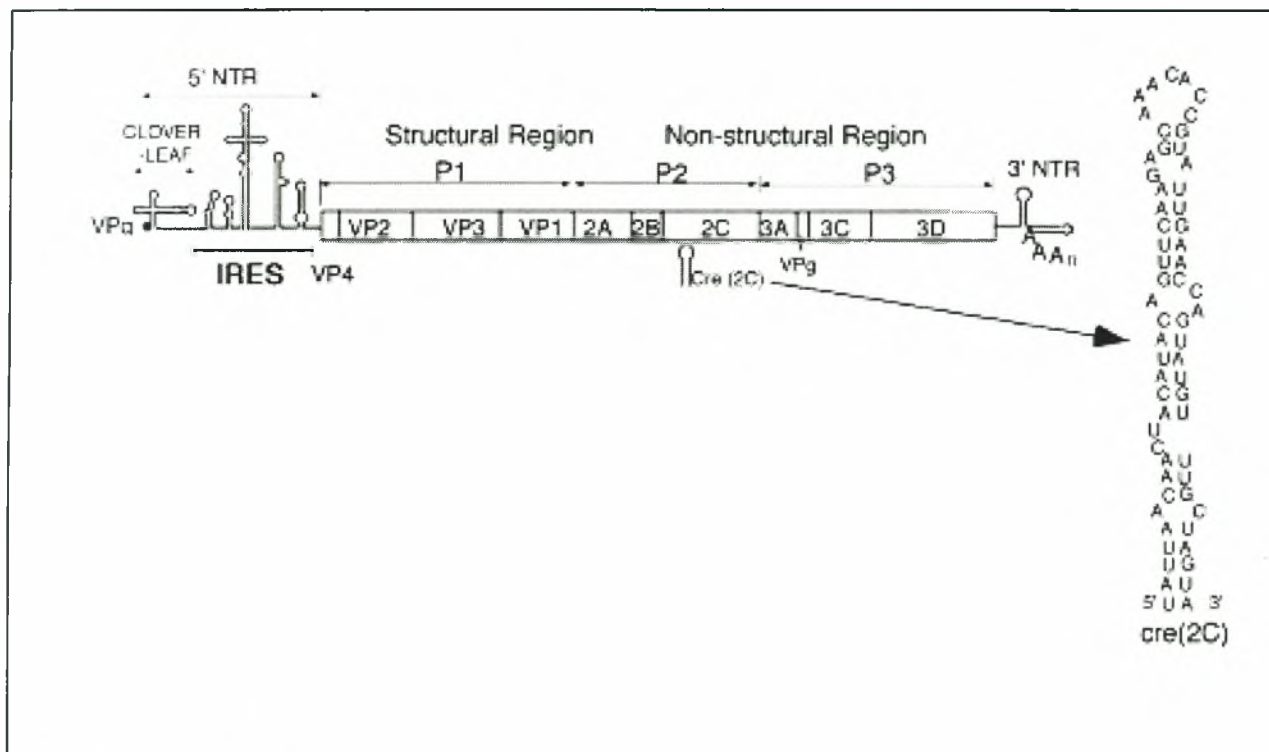
Η κυκλοποίηση του γενώματος είναι απαραίτητη για την έναρξη της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου και επιτυγχάνεται μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των PCBP2 και 3CD που είναι προσδεσμένες στο cloverleaf και των PABP, 3CD που είναι συνδεδεμένες σε poly(A)tail και 3 UTR αντίστοιχα (εικόνα 2.5.1). Έπειτα, οι 3CD πρωτεΐνες, που βρίσκονται σε κοντινή επαφή, αποκόπτουν την προσδεσμένη σε μεμβράνες 3AB, σε 3A και VPg καθώς και την 3CD σε 3C και 3D (Murray & Barton 2003). Στην επιφάνεια της 3D, η VPg, η poly(A)tail και UTP-Mg²⁺ προσδένονται σε κατάλληλη διαμόρφωση, τέτοια ώστε τα κατάλοιπα 17 και 20 της VPg να καταλύσουν την ουριδιλίωσή της VPg σε VPgpU (Schein et al., 2006).



Εικόνα 2.5.1: Μετάβαση από την μετάφραση του ιικού γενώματος στην σύνθεση του αρνητικού κλώνου πολικότητας RNA. Οι ιικές πρωτεΐνες 3CD VPg PABP PCBP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στα άκρα του ιικού RNA για να σχηματίσουν ένα κυκλικό RNP σύμπλοκο (Από Fields Virology, 5th Ed).

Το μόριο VPgU χρησιμοποιείται σαν εκκινήτήριο μόριο από την 3D για τη σύνθεση του αρνητικής πολικότητας κλώνου. Μετά το τέλος της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου δημιουργείται ένα δίκλωνο μόριο RNA γνωστό ως αντιγραφικό ενδιάμεσο. Κατά τη διάρκεια σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας κλώνου λαμβάνει χώρα η ουριδιλίωση της VPg σε VPgUpU. Η συγκεκριμένη αντίδραση απαιτεί την πρόσδεση 2 μορίων 3CD στην περιοχή

μίσχου του CRE (δομικό RNA στοιχείο στη 2C περιοχή) και την πρόσδεση στο σύμπλοκο της VPg και της 3D. Η 3D χρησιμοποιεί την αλληλουχία 5' AAAC 3' στη θηλιά του CRE (εικόνα 2.5.2) σαν καλούπι και ουριδιλιώνει την VPg σε VPgpUpU. Το VPgpUpU χρησιμοποιείται σαν εκκινητής για τη σύνθεση πολλών κλώνων θετικής πολικότητας



(Murray & Barton, 2003).

Εικόνα 2.5.2: Δομή του cre γενετικού στοιχείου. Φαίνεται η συντηρημένη αλληλουχία ${}^1\text{GXXXAAACXXXXXA}{}^{14}$ στη κορυφαία θηλιά της δομής (Από S. Mueller et al. 2005).

Κατά την αντιγραφή του ιικού γενώματος, υπάρχει μια ασυμμετρία όσον αφορά την αντιγραφή του κλώνου θετικής πολικότητας σε σχέση με τον κλώνο αρνητικής πολικότητας. Η ύπαρξη δύο διαφορετικών μηχανισμών για την δημιουργία των εκκινητικών μορίων (ουριδιλίωση της VPg στην 3' πολυαδενυλιωμένη ουρά και στην φουρκέτα cre(2C)), μπορεί

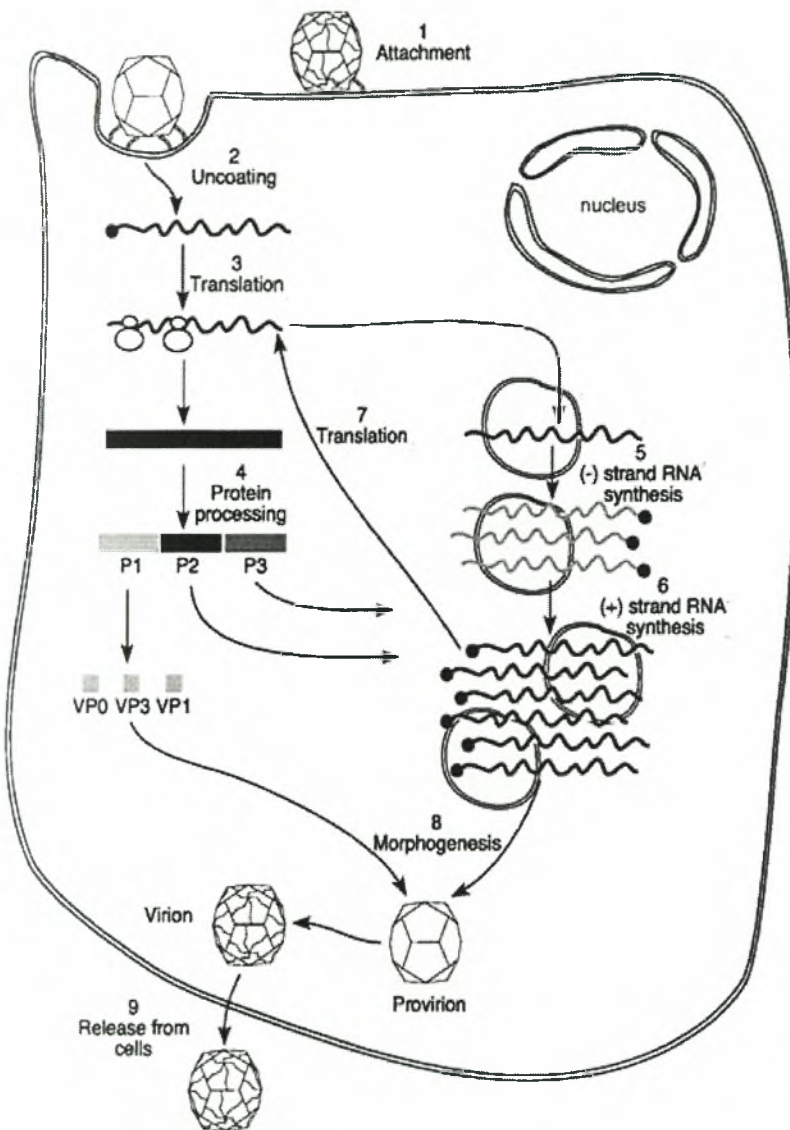
να εξηγήσει τον λόγο για τον οποίο παρατηρείται απότομη αύξηση των κλώνων θετικής πολικότητας (Morasco et al., 2003).

2.6 ΚΑΨΙΔΙΩΣΗ ΠΙΚΟΥ RNA-ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΙΚΩΝ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ

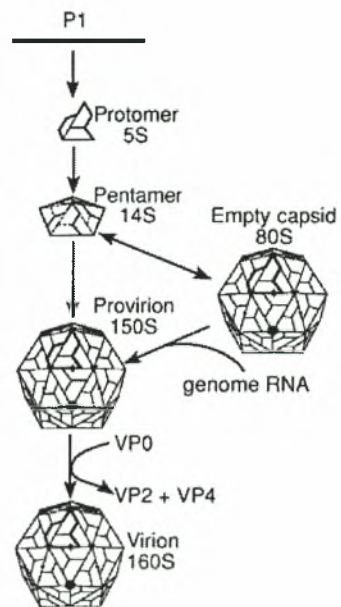
Μετά την ολοκλήρωση της αντιγραφής λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός των νέων ικών σωματιδίων ή καψιδίωση που όπως φαίνεται είναι συζευγμένη με την αντιγραφή του RNA εφόσον και τα δύο γεγονότα συμβαίνουν στην επιφάνεια μεμβρανικών κυστιδίων που επάγονται από τον ιό και βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα (Ansardi et al. 1996).

Το πρώτο βήμα για την συναρμολόγηση του καψιδίου είναι η τομή της πρόδρομου πρωτεΐνης P1 από την 3CD^{pro} και η δημιουργία ενός άωρου πρωτομερούς 5S από τις VP0, VP1 και VP3 δομικές πρωτεΐνες. Πέντε πρωτομερή αλληλεπιδρούν μεταξύ τους οδηγώντας στη δημιουργία του 14S καψιδιακού πενταμερούς. Στη συνέχεια δώδεκα πενταμερή αλληλεπιδρώντας μεταξύ τους οδηγούν στη δημιουργία του 75S άδειου καψιδίου, το οποίο με την είσοδο του RNA μετατρέπεται σε προϊκό σωματίδιο (Ansardi et al., 1994).

Το ικό σωματίδιο είναι ασταθής σχηματισμός εξαιτίας της έλλειψης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αμινοτελικών άκρων των καψιδιακών πρωτεϊνών στο εσωτερικό του καψιδίου. Η δημιουργία των 150-160S ιών συνοδεύεται με το τελευταίο πρωτεολυτικό ρήγμα, πιθανότατα από το κατάλοιπο της ιστιδίνης 195 της VP2, της VP0 σε VP2 και VP4 (maturation cleavage) οδηγώντας με αυτόν τον τρόπο στην δημιουργία των σταθερών, ώριμων ικών σωματιδίων (Hindiyeh et al., 1999).



A.



B.

Εικόνα 2.6.1: Α. Κύκλος ζωής των πολιοϊών (Από Fields Virology, 5th Ed). Β. Καψιδίωση πολιοϊών (Από Fields Virology, 5th Ed).

2.7 ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΑΠΟΚΡΙΣΕΙΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΜΟΛΥΝΣΗ ΜΕ ΠΟΛΙΟΪΟ

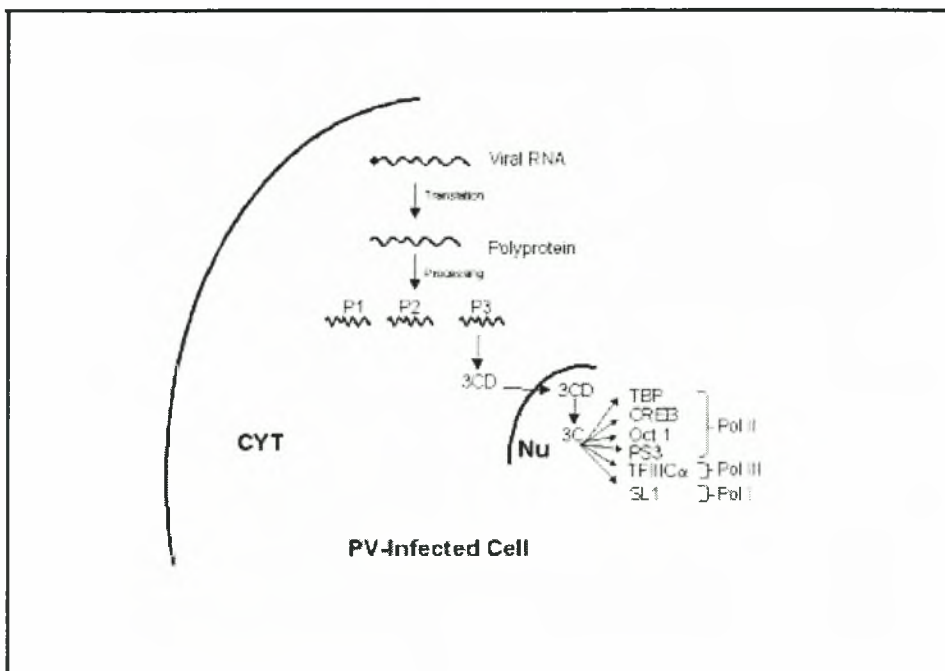
Τα κύτταρα ξενιστές κατά την μόλυνση από πολιοϊό *in vitro*, υφίστανται δραματικές μεταβολικές και μορφολογικές αλλαγές περιλαμβανομένων την στρογγυλοποίηση και την αποκόλλησή τους από το υπόστρωμα. Συλλογικά, αυτές οι αλλαγές είναι γνωστές ως CPE (cytopathic effect) (Pfister et al. 1999).

Το κύτταρο επηρεάζεται σε επίπεδο μεταγραφής, μετάφρασης και στο σύστημα έκκρισης των πρωτεϊνών. Η μόλυνση των κυττάρων από τους πολιοϊούς οδηγεί στην γρήγορη αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Η αναστολή της μετάφρασης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα των δύο πρωτεασών των πολιοϊών, της 2A^{pro} και της 3C^{pro}. Η 2A^{pro} προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο και απενεργοποιεί τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης eIF4GI διασπώντας τον στα σημεία που αυτός προσδέεται στην δομή cap του mRNA και στο ριβόσωμα και δίνει ερέθισμα για την IRES εξαρτώμενη μετάφραση.

Η διάσπαση της PABP (poly(A) binding protein) πρωτεΐνης, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην μετάφραση των κυτταρικών mRNA, μέσω της δράσης της 3C^{pro} θεωρείται εξίσου σημαντική στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης (N. Muge Kuyumcu-Martinez et al. 2004). Πρόσφατα έχει βρεθεί ότι και η 2A^{pro} τέμνει την PABP κατά την διάρκεια της μόλυνσης αλλά σε διαφορετικά σημεία από την 3C^{pro} (Kuyumcu-Martinez et al., 2002). Φαίνεται να υπάρχει συνεργασία της 2A^{pro} με την 3C^{pro} για την αναστολή της μετάφρασης. Η 2A^{pro} εμποδίζει την έναρξη της πρωτεϊνοσύνθεσης καταστρέφοντας τον eIF4GI, ενώ η 3C^{pro} αδρανοποιεί την PABP εμποδίζοντας την ανακύκλωση των ριβοσωμάτων (Kuyumcu-Martinez et al., 2004).

Άλλες τροποποιήσεις παραγόντων έναρξης όπως η φωσφορυλίωση του eIF2α πιθανόν συνεισφέρουν επίσης στην αναστολή της κυτταρικής πρωτεϊνοσύνθεσης. Επιπλέον, πρόσφατα έχει βρεθεί ότι οι πολιοϊοί ενεργοποιούν τον καταστολέα της μετάφρασης 4E-BP1, ο οποίος αναστέλλει την cap-εξαρτώμενη μετάφραση μέσω πρόσδεσής του στον παράγοντα eIF4E (Bruno Blondel et al. 1998).

Εκτός από την μετάφραση, οι ιϊκές πρωτεάσες 2A^{pro} και 3C^{pro} απενεργοποιούν και τα τρία συστήματα μετάφρασης του κυττάρου (Dasgupta et al. 2002), γεγονός που δείχνει την αλληλεπίδραση του ιού με τον πυρήνα (Weidman et al., 2003) (εικόνα 2.7.1). Πιο συγκεκριμένα, η 3C^{pro} διασπά κάποιους παράγοντες οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την δράση της RNA πολυμεράσης II, της RNA πολυμεράσης III και της RNA πολυμεράσης I. Η 3C^{pro} εισέρχεται στον πυρήνα του κυττάρου με την μορφή του προδρόμου της 3CD^{pro} και είναι πιθανόν ότι ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (NLS) που βρίσκεται στην αλληλουχία της 3D ευθύνεται για αυτή τη μεταφορά (Mary K. Weidman et al. 2003).



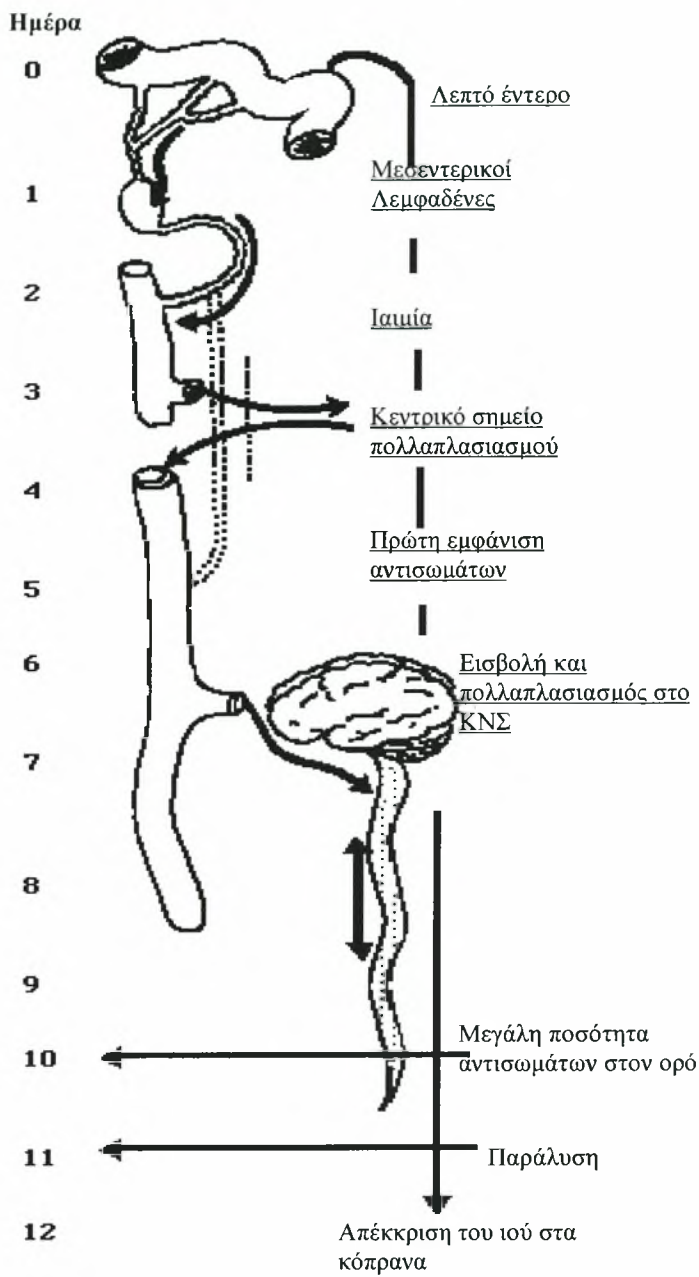
Εικόνα 2.7.1: Μοντέλο αναστολής της μεταγραφής στα μολυσμένα από πολιοϊό κύτταρα. Η 3CD^{pro} εισέρχεται στον πυρήνα και δημιουργεί την 3C^{pro} με αυτό-πρωτεόλυση. Η πρωτεολυτική διάσπαση των παραγόντων TBP, CREB, Oct-1 και p53 καταλήγει στην αναστολή της Pol II-εξαρτώμενης μεταγραφής. Επίσης η πρωτεόλυση των παραγόντων TFIIICα και TAF₁₁₀ (SL1) οδηγεί στην αναστολή της Pol III-εξαρτώμενης και Pol I-εξαρτώμενης μεταγραφής, αντίστοιχα (Από M. Weidman et al. 2003).

Τέλος, οι ιϊκές πρωτεΐνες 3A, 2B και 2BC εκτός από τον ρόλο τους στη δημιουργία του συμπλόκου αντιγραφής, εμποδίζουν την μεταφορά των πρωτεϊνών του κυττάρου ξενιστή από το ενδοπλασματικό δίκτυο προς το σύστημα Golgi επιδρώντας στο εκκριτικό σύστημα του κυττάρου (Doedens et al., 1995; Barco and Carrasco, 1998) με την υπερβολική παραγωγή κυστιδίων, χαρακτηριστικών της μόλυνσης με εντεροϊό.

3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

3.1 ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΙΤΙΔΑΣ

Σύμφωνα με **το μοντέλο του Sabin** ο πολιοϊός αρχικά εισέρχεται στον οργανισμό μέσω της στοματικής οδού και πολλαπλασιάζεται στα επιθήλια της στοματοφαρυγγικής και εντερικής κοιλότητας. Σε αυτό το στάδιο της μόλυνσης, ο ιός απεκκρίνεται και στο περιβάλλον μέσω των κοπράνων, γεγονός που είναι σε μεγάλο βαθμό υπεύθυνο για τη μετάδοσή του. Στη συνέχεια, ο ιός εισέρχεται και πολλαπλασιάζεται στα λεμφοζύδια του μέσου εντέρου και εισέρχεται στο αίμα προκαλώντας ελαφριάς μορφής ιαιμία. Η συνέχιση του ιικού πολλαπλασιασμού σε σημεία που δεν ανήκουν στον νευρικό ιστό, όπως λεμφοζύδια και μύες, προκαλεί διατήρηση του επιπέδου ιαιμίας κατά την οποία ο ιός μπορεί να ανιχνευθεί στο αίμα λόγω του μεγάλου ιικού φορτίου και τελικά είναι πιθανόν να εισέλθει στο κεντρικό νευρικό σύστημα το οποίο εξαρτάται από την κατάσταση ανοσίας του ατόμου. Σε ποσοστό 1-2% των μολύνσεων ο ιός διέρχεται μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και εισέρχεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ). Πολλαπλασιασμός του ιού στο ΚΝΣ οδηγεί σε καταστροφή των κινητικών νευρώνων και παράλυση (Bodian, 1955; Sabin, 1956) (Εικόνα 3.1.1).



Εικόνα 3.1.1 : Μοντέλο του Sabin για την παθογένεια των πολιοϊών.

3.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ

Όταν ένα άτομο ευαίσθητο σε μόλυνση εκτεθεί σε πολιοϊό, μπορεί να εμφανιστεί μια από τις παρακάτω αντιδράσεις: α) μόλυνση χωρίς συμπτώματα, β) ήπια ασθένεια, γ) άσηπτη μηνιγγίτιδα και/ή ήπια παροδική πάρεση (μη παραλυτική πολιομυελίτιδα) και δ) παραλυτική πολιομυελίτιδα. Καθώς η μόλυνση εξελίσσεται, κάποια εκδήλωση μπορεί να μετατραπεί σε μια πιο σοβαρή μορφή: μετά από μια ήπια ασθένεια μπορεί να ακολουθήσουν μερικές μέρες χωρίς συμπτώματα και στη συνέχεια να εμφανιστεί μια πιο σοβαρή μορφή της μόλυνσης (Melnick J.L., 1996).

Η ασυμπτωματική είναι η πιο συχνή μορφή της μόλυνσης. Περίπου το 95% των μολύνσεων από πολιοϊούς είναι ασυμπτωματικές. Στο 4-8% των μολύνσεων την αρχική ελαφριά ιαιμία θα ακολουθήσει μια μεγαλύτερη ιαιμία η οποία είναι χαρακτηριστικό της ανεπιτυχούς πολιομυελίτιδας (abortive poliomyelitis). Αυτή η ασθένεια περιλαμβάνει συμπτώματα όπως πονόλαιμο, πυρετό, διάρροια, μυαλγία, πονοκέφαλο και γενικευμένη κούραση. Επιπρόσθετα με τα συμπτώματα της ήπιας πολιομυελίτιδας, οι ασθενείς με μη παραλυτική πολιομυελίτιδα παρουσιάζουν ακαμψία και πόνους στην πλάτη και τον αυχένα. Συνήθως, εμφανίζεται μια ήπια μυϊκή αδυναμία ή παροδική παράλυση. Η ασθένεια διαρκεί τουλάχιστον 2-10 ημέρες και η ανάρρωση είναι σχεδόν πλήρης. Περίπου το 1-2% των μολύνσεων παίρνουν αυτή την πορεία κατά την διάρκεια επιδημιών. Σε πολύ μικρό ποσοστό η μηνιγγίτιδα καταλήγει σε παράλυση. Πρέπει να σημειωθεί ότι και άλλοι ιοί, κυρίως του γένους των εντεροϊών, μπορούν να προκαλέσουν αυτό το σύνδρομο. Η σοβαρότερη ασθένεια, η παραλυτική πολιομυελίτιδα, εκδηλώνεται με τα παραπάνω συμπτώματα της άσηπτης μηνιγγίτιδας καθώς και με εμμένουσα αδυναμία ενός ή περισσότερων μυϊκών ομάδων, είτε σκελετικών είτε κρανιακών.

Παραλυτική πολιομυελίτιδα θα εμφανιστεί στο 0,1-1% των μολύνσεων. Ανάλογα με τα κλινικά συμπτώματα η ασθένεια χωρίζεται σε 3 κατηγορίες: στη νωτιαία, στη βολβοειδή και στη νωτιαιοβολβοειδή πολιομυελίτιδα. Η νωτιαία πολιομυελίτιδα χαρακτηρίζεται από καταστροφή των κινητικών νευρώνων του νωτιαίου μυελού. Η βολβοειδής πολιομυελίτιδα

χαρακτηρίζεται από παράλυση νευρώνων που ελέγχουν τους μύες των πνευμόνων και η νωτιαιοβλβοειδή χαρακτηρίζεται από συνδυασμό συμπτωμάτων και των δύο ανωτέρω μορφών (Bodian, 1972).

3.3 ΕΜΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Έχουν δημιουργηθεί δύο τύποι εμβολίων για την αντιμετώπιση των πολιοϊών. Το εμβόλιο του Salk που ανακαλύφθηκε το 1955 με αδρανοποιημένα στελέχη πολιοϊών τύπου 1, 2, 3, γνωστό ως IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine) και το εμβόλιο Sabin με εξασθενημένα στελέχη και των οροτύπων, γνωστό ως OPV (Oral Poliovirus Vaccine) (Sabin et al., 1960).

Το απενεργοποιημένο εμβόλιο **IPV** (inactivated polio vaccine) προέκυψε από την μετατροπή άγριων παθογόνων στελεχών σε μη-μολυσματικά κατόπιν επεξεργασίας τους με φορμαλδεύδη. Απαιτούνται τουλάχιστον τέσσερις εμβολιασμοί μέσα σε μια περίοδο 1-2 χρόνων. Περιοδικά είναι απαραίτητες αναμνηστικές δόσεις ανοσοποίησης. Το IPV προσφέρει χυμική ανοσία και είναι ασφαλές γιατί εξασφαλίζει ότι δεν υπάρχουν μολυσματικοί ιοί. Δυστυχώς ωστόσο, το IPV επάγει ανεπαρκή τοπική ανοσία καθώς δεν αποτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού στο έντερο και την κυκλοφορία του στο πληθυσμό και για αυτό δεν είναι αποτελεσματικό για τον έλεγχο της μετάδοσης του ιού στον ανθρώπινο πληθυσμό (Blondel et al. 1998). Απαιτεί ενδομυϊκή ένεση με επαναλαμβανόμενες δόσεις και είναι πιο ακριβό από το OPV (Melnick J.L., 2001).

Το **OPV** (oral polio vaccine) αποτελείται από εξασθενημένα στελέχη πολιοϊών (P1/Sabin, P2/Sabin και P3/Sabin) τα οποία αναπτύχθηκαν από τον A.B Sabin ύστερα από το πέρασμα πολιοϊών αγρίου τύπου σε ιστούς πιθήκων *in vitro* και *in vivo* κάτω από μία ποικιλία συνθηκών οι οποίες διέφεραν για κάθε έναν από τους τρεις οροτύπους. Τα εξασθενημένα στελέχη P1/Sabin (P1/LSc, 2ab) και P2/Sabin (P2/P712, Ch, 2ab) προήλθαν από τα άγρια νευροτοξικά στελέχη P1/Mahoney/41 και P2/P712/56 αντίστοιχα τα οποία απομονώθηκαν από τα κόπρανα υγιών παιδιών. Το εξασθενημένο στέλεχος P3/Sabin (P3/Leon 12a₁, b)

προήλθε από το άγριο νευροτοξικό στέλεχος P3/Leon/37 το οποίο απομονώθηκε από τον εγκέφαλο και τον νωτιαίο μυελό ενός θύματος της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (F. Friedrich 1996).

Και τα τρία στελέχη Sabin είναι θερμοευαίσθητα, γεγονός που συμβάλλει στην παραγωγή μικρότερου τίτλου ιών στο έντερο σε θερμοκρασίες κατάλληλες για τους πολιοϊούς αγρίου τύπου. Το εμβόλιο δεν είναι μόνο υπεύθυνο για την δημιουργία IgM και IgG αντισωμάτων στο αίμα αλλά για την παραγωγή IgA αντισωμάτων στο έντερο, το οποίο γίνεται ανθεκτικό σε μια αναμόλυνση. Το OPV προσφέρει συστημική και εντερική ανοσία, χορηγείται από το στόμα και είναι σχετικά φθινό. Είναι χαρακτηριστικό αυτού του εμβολίου η εξάπλωση των ζωντανών στελεχών Sabin στο πληθυσμό, παρέχοντας ανοσία σε μεγαλύτερο πληθυσμό. Το μεγαλύτερο ελάττωμα του εμβολίου OPV είναι η μεταστροφή του σπανίως σε παθογόνο στέλεχος ιού, λόγω της γενετικής του αστάθειας, που μπορεί να οδηγήσει στην πρόκληση επιδημιών από κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεδεμένα στελέχη πολιοϊών (Circulating Vaccine Derived Poliovirus), στην πρόκληση δηλαδή εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Vaccine associated Paralytic Poliomyelitis) και σε χρόνιες μολύνσεις ατόμων με σύνδρομο ανοσοανεπάρκειας.

3.4 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΗ ΠΑΡΑΛΥΤΙΚΗ ΠΟΛΙΟΜΥΕΛΥΤΙΔΑ – VAPP

Σε σπάνιες περιπτώσεις ο εμβολιασμός με το OPV συνδέεται με την εμφάνιση εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) η οποία επηρεάζει είτε άτομα που πρόσφατα εμβολιάστηκαν με το OPV είτε μη-εμβολιασμένα άτομα τα οποία όμως ζουν σε άμεση επαφή με εμβολιασμένα άτομα. Η VAPP προκαλείται από την γενετική ποικιλομορφία των Sabin στελεχών, λόγω σημειακών μεταλλάξεων και γενετικού ανασυνδυασμού. Κατά τον πολλαπλασιασμό των στελεχών Sabin στο εντερικό επιθήλιο των εμβολιασμένων ατόμων, μπορεί να σημειωθούν συγκεκριμένες μεταλλάξεις στα στελέχη Sabin και γενετικός ανασυνδυασμός, που σχετίζονται με αναστροφή του εξασθενημένου φαινοτύπου τους και μπορούν να προκαλέσουν αύξηση της νευρομολυσματικότητάς τους. Πράγματι, νευρομολυσματικά στελέχη που προέρχονται από τα αντίστοιχα Sabin εμβολιακά

στελέχη έχουν βρεθεί στο έντερο υγιών εμβολιασμένων ατόμων και στο κεντρικό νευρικό σύστημα ασθενών με VAPP.

Η αναστροφή των μεταλλαγών εξασθένισης στα εμβολιακά στελέχη είναι αυτή που οδηγεί στην εμφάνιση ενός νευρομολυσματικού στελέχους. Οι δέκτες του εμβολίου εκκρίνουν συνήθως τον ιό μέσα σε 3-4 εβδομάδες. Μέσα στο διάστημα αυτό αναπαραγωγής του ιού στο έντερο του ανθρώπου, είναι δυνατόν να υπάρξουν αντικαταστάσεις βάσεων, με αποτέλεσμα την αναστροφή του στελέχους εμβολίου σε άγριο, παθογόνο στέλεχος (Minor et al., 1988). Κάποιες αναστροφές φαίνεται να είναι απαραίτητες για την εμφάνιση του παθογόνου φαινότυπου, όπως για παράδειγμα η μετάλλαξη στη θέση 472 παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις VAPP από εμβολιοσχετιζόμενο στέλεχος Sabin 3, το οποίο χάνει τον θερμοευαίσθητο φαινότυπό του (Minor P.D., 1992).

Μελέτες σε εμβόλια έχουν δείξει ότι οι αναστροφές είναι πιο γρήγορες στο στέλεχος Sabin τύπου 3 και ακολουθούν οι τύποι 2 και 1 (Kohler et al., 2002). Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να συνδέεται και με τον βαθμό εξασθένισης των ιών. Η διαφορά του Sabin 1 με το στέλεχος Mahoney (PV1) φαίνεται να είναι 5 υποκαταστάσεις βάσεων (Bouchard et al., 1995). Η εξασθένιση του Sabin 2 οφείλεται στην αντικατάσταση μόνο 2 βάσεων (Ren et al., 1991) και το Sabin 3 διαφέρει από τον πρόγονό του επίσης σε δύο βάσεις (Westrop et al., 1989).

Η αναστροφή του στελέχους εμβολίου σε παθογόνο στέλεχος μπορεί να γίνει εκτός από τις μεταλλάξεις και με ανταλλαγή γενετικού υλικού μεταξύ των στελεχών του εμβολίου. Γενετικός ανασυνδυασμός μπορεί να λάβει χώρα στο έντερο εμβολιασμένου ατόμου και μαζί με τις κατάλληλες μεταλλάξεις να οδηγήσει σε VAPP.

3.5 ΕΜΒΟΛΙΟΣΥΝΔΕΟΜΕΝΑ ΣΤΕΛΕΧΗ ΠΟΛΙΟΪΩΝ (V.D.P.V)

Τα VDPV στελέχη χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα VDPV στελέχη που απομονώνονται από άτομα με ανοσοανεπάρκεια (iVDPV), τα κυκλοφορούντα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (cVDPV) και τα αμφιλεγόμενα VDPV (aVDPV). Τα iVDPV προέρχονται από ασθενείς με ανοσοανεπάρκειες Β-κυττάρων και μπορούν να προκαλέσουν παραλυτική νόσο

στον ασθενή. Ένα εμβολιακό OPV στέλεχος θεωρείται VDPV αν φέρει απόκλιση $\geq 1\%$ στη νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του από την νουκλεοτιδική αλληλουχία της VP1 περιοχής του αντίστοιχου προτύπου OPV στελέχους.

Οι πιο σημαντικές ιδιότητες των cVDPV είναι η αυξημένη ικανότητα μετάδοσης και η αυξημένη ικανότητά τους να προκαλούν πολιομυελίτιδα.

3.6 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Η παλαιότερη καταγραφή ιογενούς λοίμωξης είναι εμφανής σε μια αιγυπτιακή στήλη από περίπου 1400 π.Χ. που απεικονίζει ένα νεαρό άνδρα με χαρακτηριστική ασύμμετρη χαλαρή παράλυση και ατροφία του ποδιού. (εικόνα 3.6.1).



Εικόνα 3.6.1: Επικήδειος στήλη που παρουσιάζει τον ιερέα Siptah με τυπική ένδειξη παραλυτικής πολιομυελίτιδας

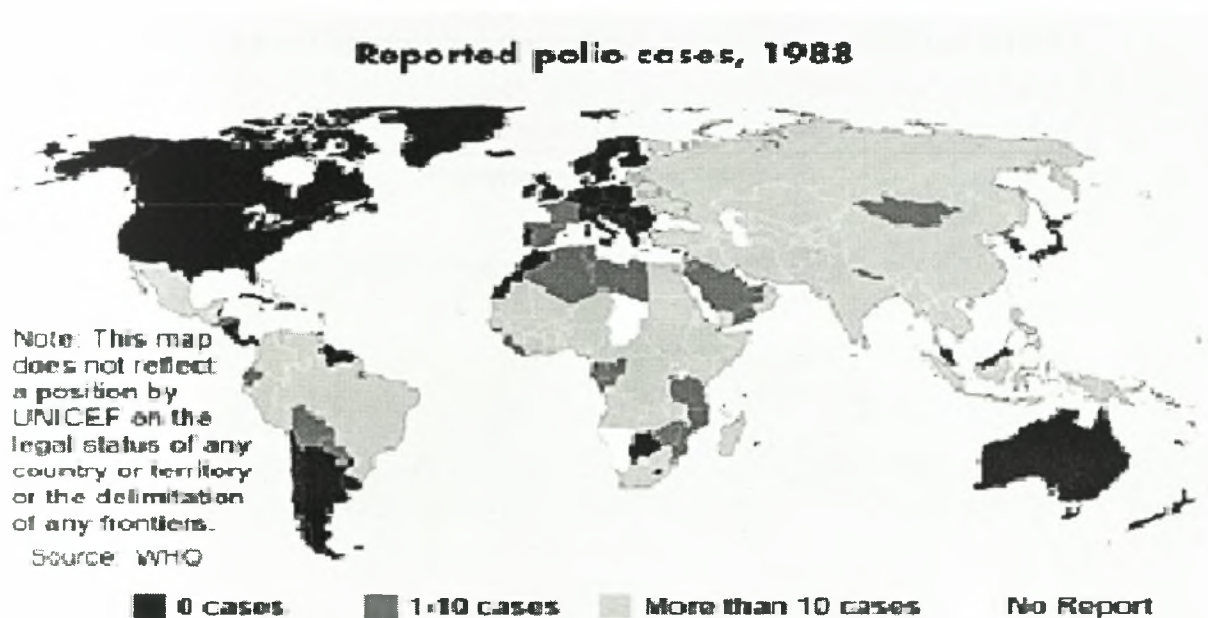
Οι άνθρωποι είναι η μόνη πηγή μόλυνσης με πολιοϊό. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που ευνοούν την μετάδοση των πολιοϊών είναι οι κακές συνθήκες υγιεινής, τα τροπικά και υποτροπικά κλίματα και η υψηλή πληθυσμιακή πυκνότητα. Οι πολιοϊοί μεταδίδονται μέσω της κόπρο-στοματικής οδού κυρίως σε αναπτυσσόμενες χώρες, ενώ σε αναπτυγμένες χώρες μεταδίδονται μέσω αναπνευστικών εκκρίσεων. Οι μολύνσεις από πολιοϊούς είναι εποχιακές σε περιοχές εύκρατων κλιμάτων και συμβαίνουν κυρίως το καλοκαίρι και το φθινόπωρο. Αντίθετα, σε τροπικού κλίματος περιοχές μολύνσεις συμβαίνουν όλο το χρόνο.

Η παγκόσμια προσπάθεια εκρίζωσης των πολιοϊών είναι ο μεγαλύτερος στόχος στον τομέα της δημόσιας υγείας στην ιστορία. Από το 1988 όταν ξεκίνησε η προσπάθεια αυτή, σημαντική πρόοδος έχει γίνει όσον αφορά την παρεμπόδιση της μετάδοσης των αγρίων στελεχών πολιοϊών και την προσπάθεια επίτευξης παγκόσμιας πιστοποίησης της εκρίζωσης της πολιομυελίτιδας μέχρι το 2005. Το **1988** οι πολιοϊοί υπήρχαν σε 125 χώρες σε 5 ηπείρους και περισσότερα από 350.000 παιδιά εμφάνισαν πολιομυελίτιδα εκείνη τη χρονιά. Μέχρι το τέλος του 2002, ο αριθμός των χωρών είχε μειωθεί σε 7, οι πολιοϊοί είχαν εξαλειφθεί από 3 ηπείρους και τα αναφερόμενα περιστατικά πολιομυελίτιδας μειώθηκαν σε 1900. Η μετάδοση της πολιομυελίτιδας έχει διακοπεί στην Αμερική, στην Ευρώπη και στις δυτικές περιοχές του Ειρηνικού, και μέχρι το τέλος του **2002** περισσότερες από 180 χώρες ήταν ελεύθερες πολιοϊών. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας είχε θέσει ως στόχο την εκρίζωση της ασθένειας μέχρι το **2004** αλλά ο αριθμός των περιστατικών πολιομυελίτιδας ανήλθε σε 1.185 σε 17 χώρες από 784 σε 15 χώρες το 2003. Το **2005** αναφέρθηκαν 205 περιστατικά πολιομυελίτιδας τα οποία κατανέμονται στις εξής περιοχές: 78 στη Νιγηρία, 66 στην Υεμένη, 24 στο Σουδάν, 14 στην Ινδία, 8 στην Ινδονησία, 7 στο Πακιστάν, 5 στην Εθιοπία, 1 στο Καμερούν και 1 στο Αφγανιστάν.

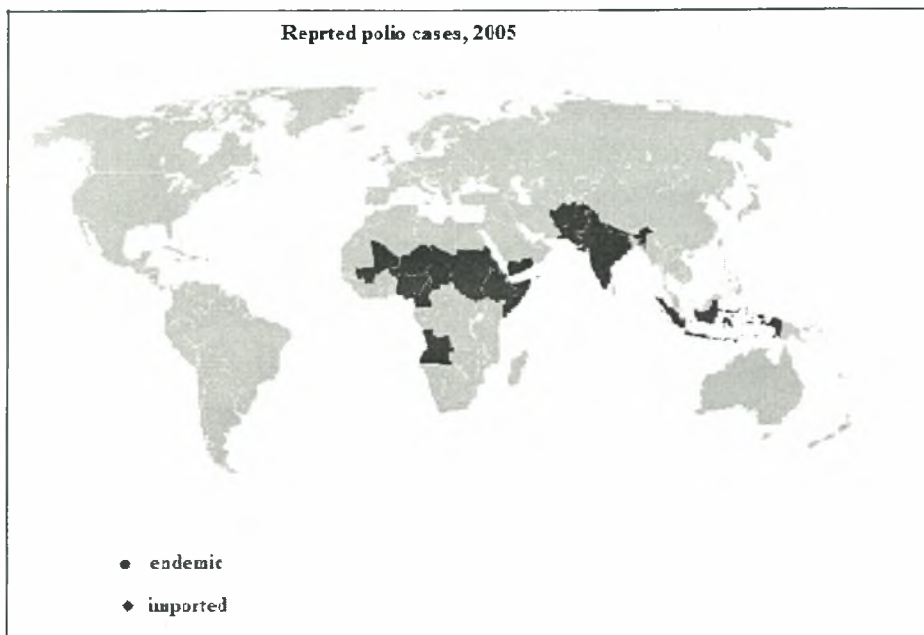
Το **2006**, μόνο τέσσερις χώρες στον κόσμο (Νιγηρία, την Ινδία, το Πακιστάν και το Αφγανιστάν) αναφέρθηκαν να έχουν ενδημικά περιστατικά πολιομυελίτιδας. Συνολικά 1.997 περιπτώσεις σε όλο τον κόσμο αναφέρθηκαν το 2006. Η Νιγηρία αντιπροσώπευε την πλειοψηφία των περιπτώσεων (1.122 περιπτώσεις) αλλά στην Ινδία έχουν αναφερθεί σε σχέση με το 2005 πάνω από 10 φορές περισσότερες περιπτώσεις πολιομυελίτιδας (676 περιστατικά ή το 30% των περιστατικών σε όλο τον κόσμο). Πακιστάν και το Αφγανιστάν αναφέρθηκαν 40 και 31 περιστατικά αντίστοιχα το 2006. Πολιομυελίτιδα εκ νέου στην επιφάνεια του Μπαγκλαντές μετά από σχεδόν έξι χρόνια απουσίας με 18 νέα περιστατικά.

Το **2007** αναφέρθηκαν 1.315 περιστατικά πολιομυελίτιδας σε όλο τον κόσμο. Πάνω από το 60% των περιστατικών (874) σημειώθηκε στην Ινδία. Ενώ στη Νιγηρία, ο αριθμός των περιστατικών πολιομυελίτιδας μειώθηκε δραματικά, από τα 1122 περιστατικά που είχαν αναφερθεί το 2006 σε 285 υποθέσεις το 2007. Κατά τη διάρκεια του **2008** 19 χώρες

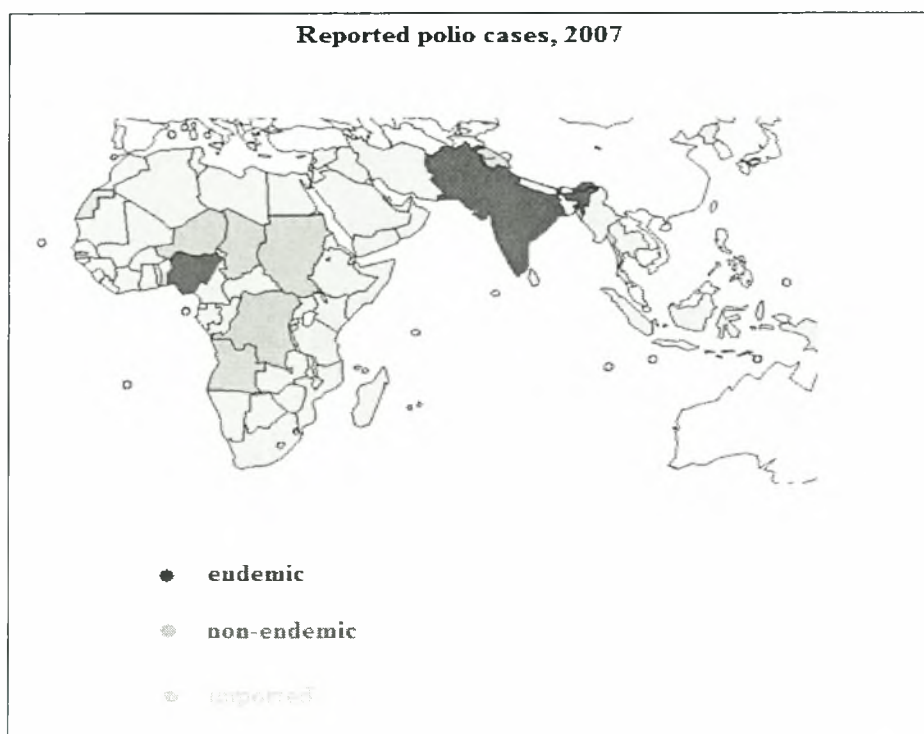
ανέφεραν περιστατικά και ο συνολικός αριθμός των περιστατικών ήταν 1.652. Από αυτά, 1506 εμφανίστηκαν στις τέσσερις ενδημικές χώρες και 146 αλλού. Ο μεγαλύτερος αριθμός ήταν στη Νιγηρία (799 περιπτώσεις) και την Ινδία (559 περιπτώσεις): οι δύο αυτές χώρες συνέβαλαν στο 82,2% του συνόλου των περιστατικών. Περιστατικά εξακολουθούν να αναφέρονται στο 2009. Από 8 Σεπτεμβρίου του 2009, 21 χώρες έχουν αναφέρει περιπτώσεις. Έξω από τις ενδημικές χώρες τέσσερις (Μπενίν, Ακτή Ελεφαντοστού, Γουινέα και το Σουδάν) έχουν αναφέρει 20 ή περισσότερα περιστατικά. Σε σύγκριση με την ίδια ημερομηνία το 2008, ο συνολικός αριθμός των κρουσμάτων έχει μειωθεί (1173 με 969), αλλά ο αριθμός των χωρών που αναφέρει περιστατικά έχει αυξηθεί (από 14 έως 21).



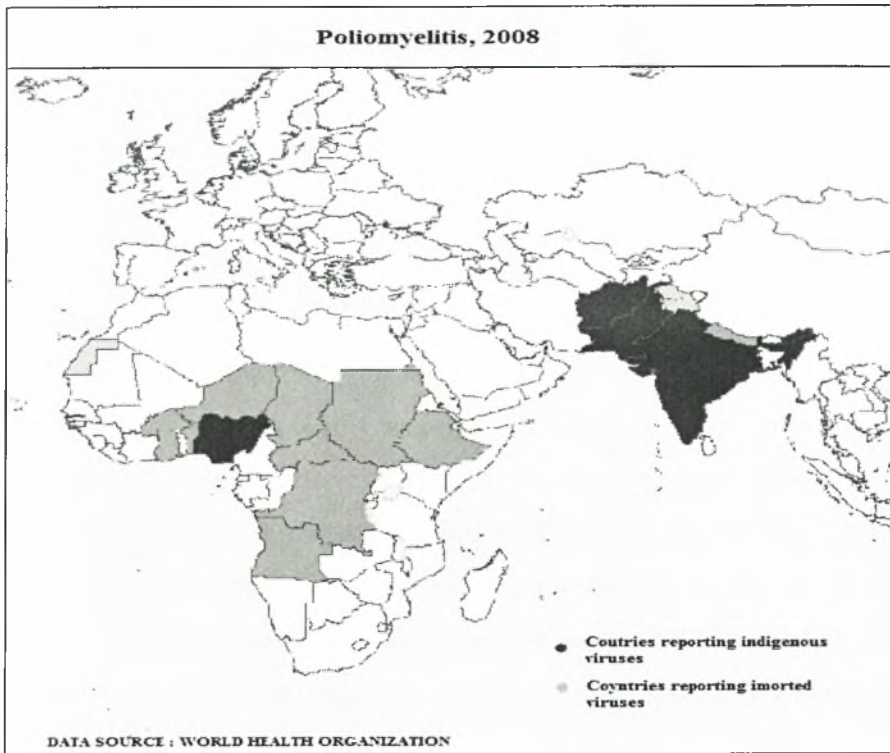
Εικόνα 3.6.2: Παρουσιάζεται η παγκόσμια κατάσταση το 1988 στην οποία φαίνεται η σχεδόν η καθολική παρουσία των πολιοϊών σε όλο τον κόσμο, ακόμα και σε ανεπτυγμένες χώρες όπως η Γαλλία και Ισπανία.



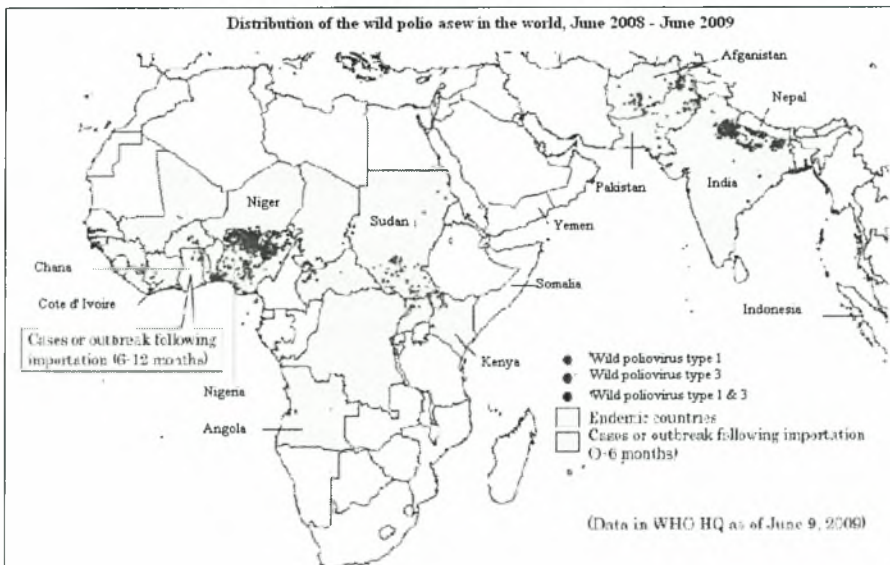
Εικόνα 3.6.3: Παρουσιάζεται η παγκόσμια κατάσταση το 2005(Από WHO).



Εικόνα 3.6.4: Παρουσιάζεται η κύρια εμφάνιση περιστατικών πολιομυελίτιδας το 2007(Από WHO).



A.



B.

Εικόνα 3.6.5: Α. Παρουσιάζεται η εμφάνιση περιστατικών πολιομυελίτιδας το 2008 (1^η Νοεμβρίου 2008), Β. Παρουσιάζεται η εμφάνιση περιστατικών πολιομυελίτιδας το 2009 (9^η Ιουνίου 2009).

3.7 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Μέθοδοι για την ανίχνευση και ταυτοποίηση εντεροϊών :

Παραδοσιακές μέθοδοι

- **Απομόνωση του ιού:**

Η απομόνωση ενός εντεροϊού από μολυσμένα όργανα και υγρά του σώματος (π. χ μυοκάρδιο, περικαρδικό υγρό ή CSF) παρέχει την ισχυρότερη ένδειξη μόλυνσης από εντεροϊό. Ωστόσο, οι εντεροϊοί σπάνια απομονώνονται από το μυοκάρδιο. Η απομόνωση εντεροϊού από συστατικά του αίματος είναι επίσης χρήσιμη και παρέχει ένδειξη συστημικής μόλυνσης. Η απομόνωση εντεροϊού από τη θρεπτική οδό (εκκρίματα του λαιμού ή δείγματα κοπράνων) παρέχει μόνο περιστασιακή ένδειξη αιτιολογίας επειδή η ύπαρξη του ιού σε αυτές τις θέσεις μπορεί να συμβαίνει απουσία συμπτωμάτων, ιδιαιτέρως στα βρέφη και κατά τη διάρκεια επιδημιών. Παρόλα αυτά, τα κόπρανα είναι το πιο ευαίσθητο δείγμα για την ανίχνευση εντεροϊών και η καλλιέργεια κοπράνων ενδείκνυται για την διάγνωση μολύνσεων από πολιοϊούς. Η επιλογή των κυτταρικών τύπων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των εντεροϊών είναι επίσης σημαντική. Μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποια κυτταρική σειρά που να επιτρέπει την ανάπτυξη όλων των γνωστών οροτύπων των εντεροϊών. Γι' αυτό συνήθως χρησιμοποιούνται συνδυασμοί των διάφορων κυτταρικών σειρών. Έτσι, εκλεκτική απομόνωση πολιοϊών μπορεί να γίνει σε πληθυσμούς ανασυνδυασμένων κυττάρων ποντικών που εκφράζουν το γονίδιο για τον υποδοχέα των πολιοϊών (PVR) όπως η L20B σειρά. Χρησιμοποιούνται επίσης κύτταρα από ανθρώπινο ραβδομυοσάρκωμα (RD), ινοβλάστες από ανθρώπινο εμβρυϊκό πνεύμονα (HEL), κύτταρα από ανθρώπινο επιδερμικό καρκίνωμα (HEP-2) και νεφρικά κύτταρα πράσινου αφρικανικού πιθήκου (Vero). Κάτω από ιδανικές συνθήκες, η απομόνωση εντεροϊών μπορεί να είναι εμφανής (παρατήρηση CPE) μέσα σε λίγες μέρες ενώ ίσως χρειαστούν περισσότερες από 14 ημέρες όταν πρόκειται για δύσκολα στελέχη ή μίγματα ιών (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Siafakas et al. 2001).

- **Ταυτοποίηση του οροτύπου των εντεροϊών:**

Μετά την απομόνωση του εντεροϊού, η ταυτοποίηση του οροτύπου μπορεί να γίνει μέσω εξουδετέρωσης της μολυσματικότητας με μίγματα αντιορών. Για το σκοπό αυτό υπάρχουν συνδυασμοί μιγμάτων αντιορών που επιτρέπουν την ταυτοποίηση 42 οροτύπων. Πραγματοποιείται επώαση του προς ανάλυση δείγματος με κάθε διαφορετικό μίγμα αντιορού και ενοφθαλμισμός σε κατάλληλα κύτταρα. Μετά από επώαση αρκετών ημερών διαβάζεται το πρότυπο εξουδετέρωσης και έτσι επιτυγχάνεται τελικά η ταυτοποίηση του οροτύπου μέσω πινάκων. Ωστόσο, προσπάθειες έχουν γίνει ώστε να μειωθεί ο χρόνος που απαιτείται για την ταυτοποίηση ορισμένων τύπων εντεροϊών με τη χρήση άλλων μεθόδων όπως ανοσοενζυμικές μέθοδοι με αντιορό ειδικό για κάθε ορότυπο, ανοσοηλεκτρονική μικροσκοπία με πολυδύναμο και ειδικό για κάθε ορότυπο αντιορό, ανίχνευση αντιγόνων των εντεροϊών στην κυτταροκαλλιέργεια είτε με έμμεσο ανοσοφθορισμό είτε με ανοσοενζυμική μέθοδο (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Siafakas et al. 2001).

- **Ορολογική διάγνωση:**

Η ορολογική διάγνωση των εντεροϊικών μολύνσεων περιπλέκεται από τον μεγάλο αριθμό οροτύπων και την εμφάνιση αναμνηστικών, ετεροτυπικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Η ύπαρξη υψηλού τίτλου IgM αντισωμάτων ειδικών των εντεροϊών στον ορό ενός ατόμου παρέχει ένδειξη μιας πρόσφατης μόλυνσης αλλά χρειάζεται μεγάλη προσοχή πριν την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων επειδή ο τίτλος των IgM αντισωμάτων μπορεί να είναι υψηλός στον γενικό πληθυσμό ιδιαίτερος κατά τη διάρκεια επιδημιών. Έτσι ενώ η ανίχνευση των IgM αντισωμάτων στον ορό είναι πιο εύκολη από την απομόνωση του ιού, αυτή παρέχει μόνο περιστασιακή ένδειξη (π. χ όταν παρατηρούνται ταυτόχρονα και κλινικά συμπτώματα). Ο έλεγχος IgM αντισωμάτων γίνεται με την μέθοδο ELISA, η οποία όμως είναι πολύπλοκη λόγω της ύπαρξης αναμνηστικών ετεροτυπικών αντιδράσεων των αντισωμάτων, της έλλειψης ενός ομοιόμορφα αντιδρώντος αντιγόνου των εντεροϊών και του μεγάλου αριθμού οροτύπων (Peter Muir et al. 1998, Nikolaos Siafakas et al. 2001).

Μοριακές μέθοδοι

- **Τεχνολογία υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων:**

Οι γενετικές ομοιότητες μεταξύ των διαφορετικών ορότυπων τους επιτρέπει τη χρησιμοποίηση cDNA ανιχνευτών προερχόμενων από έναν ορότυπο για την ανίχνευση των γενωμάτων ενός μεγάλου εύρους εντεροϊών. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος είναι επίπονη.

- **RT-PCR:**

Η σύγκριση των αλληλουχιών γενωμάτων εντεροϊών επέτρεψε τον εντοπισμό συντηρημένων αλληλουχιών και συνεπώς τον σχεδιασμό κατάλληλων primers ικανών προς ανίχνευση των περισσότερων ή όλων των εντεροϊών περιλαμβανομένων και αυτών των οποίων δεν είναι εφικτή η καλλιέργειά τους. Η μέθοδος αυτή είναι πολύ ευαίσθητη και επίσης τα αποτελέσματα μπορούν να αποκτηθούν σε λιγότερο από 5 ώρες και γι' αυτό μπορεί να έχει σημαντική εφαρμογή στην κλινική διάγνωση. Ωστόσο, ένα μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η μη ικανότητα ταυτοποίησης του ορότυπου του εντεροϊού. Συνεπώς όταν απαιτείται κάτι τέτοιο, η RT-PCR θα πρέπει να συμπληρώνεται με κάποια από τις παραπάνω παραδοσιακές μεθόδους. Εναλλακτικά η ταυτοποίηση του εντεροϊού μπορεί να γίνει με τις εξής μεθόδους: PCR με primers εξειδικευμένα για την ενίσχυση μίας μόνο συγκεκριμένης υποομάδας εντεροϊών, αλληλούχιση των PCR προϊόντων και σύγκρισή τους με τις ήδη γνωστές αλληλουχίες άλλων εντεροϊών, RFLP ανάλυση των PCR προϊόντων, υβριδισμός των PCR προϊόντων με ανιχνευτές ειδικούς για κάθε τύπο, SSCP ανάλυση των PCR προϊόντων.

4. ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΠΟΛΙΟΪΩΝ

Το γένωμα των περισσοτέρων RNA ιών χαρακτηρίζεται από υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς. Οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από εκτενή φαινόμενα ανασυνδυασμού και οι πολιοϊοί ανήκουν στους πιο γρήγορα εξελισσόμενους ιούς. Δύο βασικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τους υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης των πολιοϊών: οι μεταλλάξεις και ο γενετικός ανασυνδυασμός. (E.Domingo and J.J Holland 1997).

4.1 ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΣΤΟΥΣ ΠΟΛΙΟΪΟΥΣ

Οι μεταλλάξεις είναι ένα πολύ συνηθισμένο φαινόμενο στους πολιοϊούς και οφείλονται στην έλλειψη επιδιορθωτικής ικανότητας της ιικής πολυμεράσης. Ειδικότερα, ο ρυθμός λάθους της ιικής πολυμεράσης είναι $4,5 \times 10^{-4}$, κάτι που πρακτικά οδηγεί στην ενσωμάτωση 1 λάθους νουκλεοτιδίου ανά 2222 βάσεις.

Μια μετάλλαξη μπορεί να αυξήσει ή να μειώσει τα επίπεδα της αρμοστικότητας του ιού ή να τον αφήσει ανεπηρέαστο. Αρχικά στα λεμφοζίδια του εντέρου όπου συμβαίνει ο ιικός πολλαπλασιασμός, σε μικρού μεγέθους ιικούς πληθυσμούς καθιερώνονται είτε ουδέτερες είτε μη ευνοϊκές μεταλλάξεις. Κάποιες από τις μη ευνοϊκές μεταλλάξεις εξαλείφονται είτε από τη δράση της αρνητικής επιλογής, είτε μέσω ανασυνδιασμού. Στη συνέχεια η δράση της θετικής επιλογής σε κάποια στελέχη που φέρουν μεταλλάξεις οι οποίες τους προσδίδουν μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα μπορεί να οδηγήσει είτε σε V.A.P.P (OPV στελέχη) είτε σε παραλυτική πολιομυελίτιδα (άγριου τύπου στελέχη).

Οι πιο συχνές μεταλλάξεις είναι νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις. Μεταξύ αυτών, οι μεταπτώσεις (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πυριμιδίνη ή πουρίνης από πουρίνη)

αποτελούν το 80% των μεταλλάξεων, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι μεταστροφές (η αντικατάσταση πυριμιδίνης από πουρίνη ή το αντίθετο). Η μετάλλαξη A→G είναι η πιο συχνά παρατηρούμενη. Οι υπόλοιπες μεταλλάξεις όπως ελλείψεις και διπλασιασμοί είναι πιο σπάνιες (Figlerowicz et al. 2003). Ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό της εξέλιξης του γενώματος των πολιοϊών είναι ο διαφορετικός ρυθμός εξέλιξης των διαφόρων περιοχών του.

Σε συγκεκριμένες περιοχές των δομικών πρωτεϊνών (πχ στις περιοχές αυτές που εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα ή στην αλληλεπίδραση με τα ενεργά κέντρα ικών ενζύμων) υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί όσον αφορά τις αντικαταστάσεις αμινοξέων. Η διατήρηση της αλληλουχίας σε αυτές τις περιοχές οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές δεν είναι εκτεθειμένες στο εξωτερικό του καψιδίου και συνεπώς ξεφεύγουν της αντιγονικής πίεσης. Αντίθετα, οι περιοχές των δομικών πρωτεϊνών που συμμετέχουν στον σχηματισμό των αντιγονικών θέσεων χαρακτηρίζονται από υψηλό ρυθμό συσσώρευσης νουκλεοτιδικών και αμινοξικών υποκαταστάσεων λόγω της αντιγονικής πίεσης που υφίστανται. Αποτέλεσμα αυτού, είναι ότι ο ιός μπορεί να διαφύγει της αναγνώρισης από το ανοσοποιητικό σύστημα του οργανισμού.

Επίσης, cis-acting γενετικά στοιχεία που εμπλέκονται στην ική αντιγραφή (cloverleaf και CRE) ή στην ική μετάφραση (IRES) δέχονται ακόμα πιο λίγες μεταλλάξεις. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα γενετικά στοιχεία είναι συχνό το φαινόμενο της συν-μεταβλητότητας (covariance) κατά το οποίο οι μεταλλάξεις εμπλέκουν βάσεις που επιτρέπουν την διατήρηση της δευτεροταγής δομής τους. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός που ερμηνεύει τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης των διάφορων γενωμικών περιοχών είναι ο ομοτυπικός ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών συνυπαρχόντων γενεαλογιών, ο οποίος όμως δεν μπορεί να αναγνωριστεί. Η ευκολία με την οποία συμβαίνει ο ετεροτυπικός ανασυνδυασμός δείχνει ότι ο ομοτυπικός συμβαίνει ακόμα πιο συχνά .

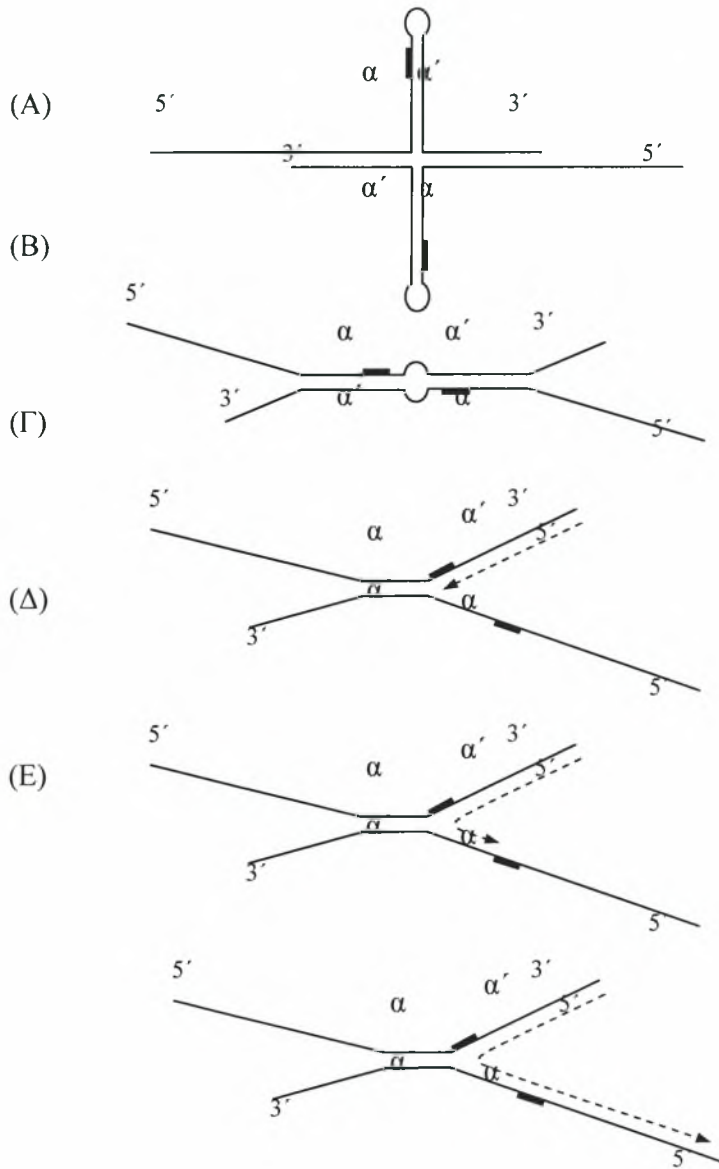
4.2 ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ

Ο ανασυνδυασμός των RNA γενωμάτων λαμβάνει χώρα σε κύτταρα συν-μολυσμένα με διάφορα ιικά στελέχη είτε του ίδιου οροτύπου (homotypic) είτε διαφορετικών οροτύπων (heterotypic). Έχουν προταθεί δύο διαφορετικοί πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν σε γενετικό ανασυνδυασμό στους πολιοϊούς, ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (Kirkegaard & Baltimore 1986) και ο μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (Gmyl et al., 1999).

- **Μηχανισμός αλλαγής μήτρας (αντιγραφικός μηχανισμός) :**

Σύμφωνα με την θεωρία αυτή, ο ανασυνδυασμός λαμβάνει χώρα κατά την διαδικασία της επιμήκυνσης ενός νεοσυντιθέμενου μορίου (-)RNA, γι' αυτό ονομάζεται και ανασυνδυασμός αντιγραφικού τύπου. Η 3D πολυμεράση κατά την σύνθεση του RNA συναντά κάποιο εμπόδιο με αποτέλεσμα να σταματά η διαδικασία της επιμήκυνσης. Στο σημείο αυτό το ένζυμο αλλάζει υπόστρωμα και συνεχίζει την αντιγραφή, χρησιμοποιώντας σαν μήτρα ένα άλλο μόριο ιϊκού RNA.

Έχει προταθεί ότι το συγκεκριμένο εμπόδιο μπορεί να είναι είτε μια σταθερή δευτεροταγής RNA δομή η οποία σχηματίζεται από την παρουσία αλληλουχιών με αντίστροφη συμπληρωματικότητα (Romanova et al., 1986) είτε η προσθήκη λάθους νουκλεοτιδίου από την ιική πολυμεράση στον νεοσυντιθέμενο RNA κλώνο (Pilipenko et al., 1995). Η αποδέσμευση της ικής πολυμεράσης σε σύμπλοκο με τον νεοσυντιθέμενο αρνητικό κλώνο οδηγεί στην δέσμευσή της ικής πολυμεράσης, καθώς και του ημιτελούς αρνητικού κλώνου, σε περιοχή υψηλής ομολογίας ενός διαφορετικού κλώνου θετικής πολικότητας που θα λειτουργήσει τώρα σαν καλούπι για την ολοκλήρωση της σύνθεσης του αρνητικού κλώνου. Ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας θεωρείται ο επικρατέστερος μηχανισμός RNA ανασυνδυασμού στους πολιοϊούς (Εικόνα 4.2.1) (Romanova et al., 1986, King et al., 1988).



Εικόνα 4.2.1: Μηχανισμός ανασυνδιασμού στους πολιοϊούς κατά Romanova et al., 1986. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που θα χρησιμεύσουν ως μήτρες του ανασυνδυασμένου μορίου. Οι αυτο-συμπληρωματικές περιοχές παριστάνονται ως α και α'. Η διακεκομμένη γραμμή αντιστοιχεί στο νεοσυντεθέννο RNA μόριο (Romanova et al., 1986)

- **Μηχανισμός ρήξης και επανένωσης (μη αντιγραφικός μηχανισμός):**

Σύμφωνα με το μηχανισμό αυτό, ένα ανασυνδυασμένο RNA γένωμα προκύπτει από την σύνδεση προσυντεθέντων RNA τμημάτων προερχόμενων από την διάσπαση διαφορετικών πατρικών RNA μορίων. Υπάρχουν δύο προτεινόμενοι χημικοί μηχανισμοί για το συγκεκριμένο τύπο αναδιάταξης. Σύμφωνα με τον πρώτο, φωσφοδιεστερικοί δεσμοί προσβάλλονται από ένα εξωτερικό νουκλεόφιλο και τα εκτιθέμενα (3'υδροξυλικό και 5'φωσφορικό) άκρα δημιουργούν μια δομή διακλάδωσης και ενώνονται από ενεργοποίηση της 5'φωσφορικής ομάδας (Chetverin A. B., 1999). . Ο δεύτερος χημικός μηχανισμός εμπλέκει την προσβολή του φωσφοδιεστερικού δεσμού από ένα παρακείμενο 2-υδροξύλιο, το οποίο δρα σαν εσωτερικό νουκλεόφιλο. Τότε παράγονται ένα 2',3'-κυκλικοφωσφορικό και ένα 5'φωσφορικό άκρο, τα οποία μπορούν να ενωθούν με αντίδραση *trans*-εστεροποίησης (Gmyl et al., 1999) .

Ο ανασυνδυασμός παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των RNA ιών: i) βοηθάει στην εξάλειψη δυσμενών μεταλλάξεων που συσσωρεύονται κατά την ιική αντιγραφή και συνεπώς συμβάλλει στην διατήρηση ενός γενότυπου αγρίου τύπου , ii) συμβάλλει στην δημιουργία ιικών στελεχών καλύτερα προσαρμοσμένων για επιβίωση και iii) επιταχύνει την εξέλιξη μέσω της ανταλλαγής ολόκληρων γενετικών μονάδων μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου γένους ή και ακόμα μεταξύ στελεχών που ανήκουν σε διαφορετικά γένη (Wimmer et al. 1993).

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι ο εντοπισμός των συνήθων τύπου ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές εμβολιακών στελεχών πολιοϊών με τη χρήση RT-PCR.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΚΛΙΝΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκαν κλινικά δείγματα, τα οποία μελετήθηκαν για ανασυνδυασμούς στις 2C και 3D περιοχές. Τα στελέχη αυτά είχαν απομονωθεί κατά την περίοδο 1978-2002 είτε από κόπρανα εμβολιασμένων ατόμων είτε από το περιβάλλον.

Δείγμα	Ορότυπος εμβολιακού στελέχους	Κλινικές εκδηλώσεις/ (Προέλευση)	Τύπος ανασυνδιασμού/ Σημείο ανασυνδιασμού	Δημοσίευση	Κωδικός πρόσβασης GenBank
744 (EP16)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4892-4914	Paximadi et al. 2006	AY736180
8029 (EP23)	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S1 4878-4887	Paximadi et al. 2006	AY736181
581 (EPA)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6589-6598	Paximadi et al. 2007a	<u>AY738635</u>
590 (EPB)	Polio 3	Υγιής εμβολιασμένος	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6589-6598	Paximadi et al. 2007a	<u>AY738636</u>
591 (EPC)	Polio 3	V.A.P.P	2C S3/S2 4642-4657, 3D S2/S3 6526-6550	Paximadi et al. 2007a	<u>AY738637</u>
(LK3)	Polio 3	-/(Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4766-4791 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	<u>DO150697</u>
(LK6)	Polio 3	-/(Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	<u>DO150698</u>
(LK10)	Polio 3	-/(Λύματα- Κύπρος)	2C S3/S2 4793-4803 2C S2/S1 4949-4950	Paximadi et al. 2007b	<u>DO150699</u>
(ENP5)	Polio 2	-/(Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6679-6692	Paximadi et al. 2007b	AY820970
(ENP7)	Polio 2	-/(Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S3 6549-6553	Paximadi et al. 2007b	AY820972
(ENP8)	Polio 2	-/(Λύματα- Κύπρος)	3D S2/S1 6790-6794	Paximadi et al. 2007b	AY820973
584	Polio 3	Περιβάλλον	2C S3/S2 4449-4464 3D S2/S1 7150- 7172	Submitted	EU598486
738	Polio 3	Περιβάλλον	3C S3/S2 5804-5814 3D S2/S1 6901-6909	Submitted	EU598487
742	Polio 1	Περιβάλλον	2A S1/S3 3461-3465 2C S3/S2 4511-4527	Submitted	EU598488

Πίνακας 1.1: Ανασυνδυασμένα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των ανασυνδυασμών στις 2C και 3D περιοχές. Σε παρένθεση αναφέρεται η κωδικοποίηση των δειγμάτων στις δημοσιεύσεις.

2. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ

Αρχικά έγιναν σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων οι οποίες κυμάνθηκαν από 10^{-1} μέχρι 10^{-10} της αρχικής συγκέντρωσης. Οι σειριακές αραιώσεις έγιναν σε erpendorf τα οποία περιείχαν ίσα ποσά θρεπτικού υλικού MEM-D (π. χ στο πρώτο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl κλινικού δείγματος, στο δεύτερο erpendorf: 180μl MEM-D και 20μl από το περιεχόμενο του πρώτου erpendorf κ.ο.κ). Κατόπιν το περιεχόμενο των erpendorf ενοφθαλμίστηκε σε πλάκες μικροτιτλοποίησης (εικόνα 2.1) οι οποίες περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε 100 μl θρεπτικό υλικό MEM-D. Ο ενοφθαλμισμός της κάθε αραιώσης έγινε εις διπλούν ώστε να είναι αξιόπιστη η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων (100μl από κάθε erpendorf μεταφέρθηκαν στην πλάκα εις διπλούν). Οι πλάκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση ενός χαρακτηριστικού κυτταροπαθολογικού φαινομένου (CPE: cytopathic effect) λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (κύτταρα Hep2 με θρεπτικό υλικό MEM-D). Στη συνέχεια το περιεχόμενο των πηγαδιών της πλάκας της όσο δυνατόν μεγαλύτερης αραιώσης με CPE ενοφθαλμίστηκε σε φλάσκες που περιείχαν κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% βόειο ορό. Οι φλάσκες παρέμειναν στους 37°C μέχρι την εμφάνιση CPE λαμβάνοντας υπόψη και την κατάσταση των μαρτύρων (φλάσκες με κύτταρα Hep2 ανεπτυγμένα σε θρεπτικό υλικό MEM-D με 10% βόειο ορό). Τέλος, μετά την παρατήρηση CPE οι φλάσκες διατηρήθηκαν στους -20 °C μέχρι να ακολουθήσει το επόμενο στάδιο της εκχύλισης του γενετικού υλικού του ιού. Σκοπός των σειριακών αραιώσεων και του ενοφθαλμισμού των φλασκών με την όσο δυνατόν μεγαλύτερη αραιώση είναι η αποφυγή μιγμάτων του ιού καθώς όπως αναφέρθηκε είναι χαρακτηριστικό των πολιοϊών η ύπαρξή τους ως quasi-species.

	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: Απεικονίζεται μια πλάκα μικροτιτλοποίησης στην οποία έγινε ο ενοφθαλμισμός των σειριακών αραιώσεων των κλινικών δειγμάτων. Η κάθε πλάκα χρησιμοποιήθηκε για τον ενοφθαλμισμό 4 δειγμάτων (AB: το πρώτο δείγμα, CD: το δεύτερο δείγμα, EF: το τρίτο δείγμα, GH: το τέταρτο δείγμα). Οι αριθμοί μέσα στα πηγαδάκια απεικονίζουν τις σειριακές αραιώσεις των κλινικών δειγμάτων ενώ με το γράμμα M απεικονίζεται η θέση των μαρτύρων.

3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

Η εκχύλιση του ιικού RNA των ιικών στελεχών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θειοκυανιούχου γουανιδίνης (GuSCN) (Casas et al., 1995). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε πλαστικούς σωλήνες των 2 ml εισήχθησαν 100 μl από το απόθεμα κάθε ιικού στελέχους, 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sarcosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate και 10 μl γλυκογόνο (100 mg/ml).

Ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min προκειμένου να επιτευχθεί η λύση των κυτταρικών μεμβρανών και των πρωτεϊνικών καψιδίων, ώστε να απελευθερωθεί το ιικό RNA. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 400 μl παγωμένης ισοπροπανόλης (-20°C) και ύστερα από ισχυρή ανάδευση, οι πλαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν για 20 min στους -20°C. Μετά την επώαση, ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα που απέμεινε προστέθηκε 500 μl παγωμένης αιθανόλης (-20°C) και στη συνέχεια ακολούθησε ισχυρή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 14.000 g για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μl διπλά απιονισμένου νερού (ddH₂O) (Sigma, USA) ελεύθερου ριβονουκλεασών. Τα RNA των ιικών στελεχών αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

Διαλύματα :

Διάλυμα θειοκυανιούχου γουανιδίνης : 4M GuSCN, 0,5% N-Lauroyl sarcosine, 1mM dithiothreitol, 25mM sodium citrate (Merck, Germany).

4. ΕΚΚΙΝΗΤΙΚΑ ΜΟΡΙΑ

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 4.1 μαζί με τις αλληλουχίες τους, το μήκος του προϊόντος PCR και την περιοχή του ιικού γενώματος που ενισχύουν. Στη συγκεκριμένη περίπτωση τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος **primer 3** (<http://www.genome.wi.-mit.edu/genomesoftware/other/>) με βάση τις 2C και 3D περιοχές των πρότυπων κατατεθειμένων στελεχών Sabin1 (**AY184219**), Sabin 2 (**184220**) και Sabin 3 (**184221**). Τα σημεία ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές είχαν εντοπιστεί ύστερα από RFLP και αλληλούχιση που πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενο πειραματικό στάδιο από την ομάδα μας.

<u>Όνομα</u>	<u>Θέση</u>	<u>Πολικότητα</u>	<u>Αλληλουχία (5'-3')</u>	<u>Γενωμική Περιοχή</u>
S3sC2b	4088-4110	Sense	TTGGAGATTCCCTATGTTATTAG	2C
Sa13C2	5350-5368	Antisense	GTGTCCAGCAAACAGTTTA	2C
Sa23C2	5295-5315	Antisense	AAAGTAGT TACTGCTTGTAGG	2C
S2s3dmp	6430-6450	Sense	GGAATTA ACTTACCGCTTGTA	3D
S1a3dmp	7141-7163	Antisense	GCATTACTGGATGAATAAGAAAT	3D
S31aD3	7213-7232	Antisense	GACACAAGGAGCGTACATGG	3D

Πίνακας 4.1: Παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και η θέση τους στο γονιδίωμα του ιού, η αλληλουχία τους και η πολικότητά τους. Στις πρώτες τρεις γραμμές παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της 2C περιοχής και στις επόμενες τρεις τα εκκινητικά μόρια για την 3D αντίστοιχα.

5. ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT)

Μετά από την εκχύλιση του γενετικού υλικού του ιού (RNA) , απαραίτητο βήμα είναι η μετατροπή του σε cDNA, προκειμένου να ακολουθήσει PCR μέσω της οποίας θα ενισχυθεί η περιοχή του ιικού γενώματος που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε .

Για την σύνθεση cDNA από το προϊόν της εκχύλισης του RNA, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής. Αρχικά, 5μl από το RNA επώασθη με 1μl τυχαίων εκκινητών (random primers) d(N)₉ (Takara Biomedical group, Shiga, Japan) (με συγκέντρωση 100 pmol/μl) στους 70 °C για 5 min. Η επώαση στους 70° c είναι αναγκαία προκειμένου να αποδιαταχθούν τα μόρια του RNA ώστε τα primers να μπορέσουν να υβριδοποιηθούν πάνω τους. Αφού τα δείγματα μεταφέρθηκαν αμέσως στον πάγο στη συνέχεια παρασκευάστηκε το μίγμα που είναι απαραίτητο για τη δράση της αντίστροφης

μεταγραφάσης. Ανάλογα με τον αριθμό των σωληναρίων προσαρμόζονται και οι ποσότητες του κάθε αντιδραστηρίου που προσθέτουμε στο συνολικό μίγμα. Τελικά σε κάθε σωληνάριο προστέθηκε μίγμα αποτελούμενο από: 5μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x (M-MLV reaction buffer), 5μl μείγματος νουκλεοτιδίων 10mM (dNTPs), 0,5 μl αναστολέα των ριβονουκλεασών (40u/μl), 0.5μl αντίστροφης μεταγραφάσης (100 units /μl) MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) και τέλος απεσταγμένο και αποστειρωμένο, ελεύθερο νουκλεασών νερό, σε ποσότητα που καθορίζεται από τον όγκο που χρειάζεται να προστεθεί ώστε το συνολικό περιεχόμενο του σωληναρίου να είναι 25μl. Ακολούθησε επώαση στους 37 °C για 1h, βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της MMLV-RT και στην συνέχεια έγινε απενεργοποίηση της αντίστροφης μεταγραφάσης με επώαση στους 95°C για 5 min.

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Ύστερα από την παραγωγή cDNA , σειρά έχει η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR χρησιμοποιείται προκειμένου να ενισχύσουμε μια συγκεκριμένη περιοχή του ιικού γενόματος. Ακριβώς για να «επιλέξουμε» την περιοχή που θέλουμε να ενισχύσουμε, χρησιμοποιούμε ειδικά primers (εναρκτήρια μόρια). Όπως προαναφέρθηκε στη συγκεκριμένη περίπτωση τα εκκινητικά μόρια σχεδιάστηκαν με βάση τις 2C και 3D γενωμικές περιοχές των πρότυπων κατατεθειμένων στελεχών Sabin1 (AY184219) , Sabin 2 (184220) και Sabin 3 (184221) για τον εντοπισμό των συνηθών τύπων ανασυνδυασμού S3/Sx για την 2C περιοχή και S2/Sx για την 3D αντίστοιχα . Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 6.1) φαίνονται τα primers , η πολικότητά τους , οι τύποι των ανασυνδυασμών που ανιχνεύουν, καθώς και το μήκος του προϊόντος τους μέσω της PCR.

<u>Εκκινητές</u>	<u>Πολικότητα</u>	<u>Μήκος PCR προϊόντος σε bp</u>	<u>Τύπος Ανασυνδυασμού στην περιοχή</u>	
			<u>2C</u>	<u>3D</u>
S3sC2b Sa13C2 Sa23C2	Sense			
	Antisense	1280	S3/S1	
	Antisense	1227	S3/S2	
S2s3dmp S1a3dmp S31aD3	Sense			
	Antisense	733		S2/S1
	Antisense	803		S2/S3

Πίνακας 6.1: Παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία καθώς και η πολικότητα τους οι τύποι των ανασυνδυασμών που αναγνωρίζουν, καθώς και το μήκος του προϊόντος τους μέσω της PCR. Στις πρώτες τρεις γραμμές παρουσιάζονται τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της 2C περιοχής και στις επόμενες τρεις τα εκκινητικά μόρια για την 3D αντίστοιχα.

Η αντίδραση της PCR έγινε με τη χρήση της Paq 5000 Stratagene και πιο συγκεκριμένα ακολουθήθηκε το εξής πρωτόκολλο: Σε σωληνάκια των 200μl προστέθηκαν αρχικά 3μl cDNA (το αντίστοιχο cDNA του κάθε δείγματος που θέλουμε να ενισχύσουμε) και 3μl εκκινητών - primers (2 μl από τον sense και 1 μl από κάθε antisense σε συγκέντρωση 50 pmol/μl). Στη συνέχεια φτιάχνουμε το μίγμα (master mix) . Σε κάθε σωληνάριο εισάγουμε 47 μl μίγματος , που αποτελούνται από 5 μl διαλύματος (συγκέντρωσης 10mM) των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs) (τελική συγκέντρωση 1mM), 5μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Paq buffer) ειδικού για το ένζυμο, 0.5 μl ενζύμου Paq πολυμεράσης 2,5u (5u/μl) και νερό ελεύθερο νουκλεασών μέχρι τελικού όγκου 50μl. Οι συγκεντρώσεις dNTPs, είχαν ήδη στανταριστεί. Ως αρνητικοί μάρτυρες στην RT-PCR χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, 2, 3). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες και επτά στελέχη της ομάδας των εντεροϊών C (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17, CAV18, CAV21).

Κατόπιν τα μικροσωληνάρια τοποθετήθηκαν στον θερμικό κυκλοποιητή (Eppendorf thermal cycler) στις εξής συνθήκες:

2C ΠΕΡΙΟΧΗ		
Εκκινητικά μόρια	<u>Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης</u>	
S3sC2b / Sa13C2 + Sa23C2	1 κύκλος	5min στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
		Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1min } 40 κύκλοι
	1 κύκλος	5min στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

3D ΠΕΡΙΟΧΗ		
Εκκινητικά μόρια	<u>Συνθήκες Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης</u>	
S2s3dmp / S1a3dmp + S31aD3	1 κύκλος	5min στους 95 °C για την αποδιάταξη του cDNA
		Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 55 °C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72 °C για 1min } 40 κύκλοι
	1 κύκλος	5min στους 72 °C για την επιμήκυνση των ημιτελών κλώνων

Ευαισθησία μεθόδου RT-PCR

Παρασκευάστηκαν σειριακές αραιώσεις $10^{5.5}-1$ TCID₅₀/0.1 ml του στελέχους **EPA**. Μετά από εκχύλιση του RNA και σύνθεση του cDNA μέσω της RT πραγματοποιήθηκαν δυο αντιδράσεις PCR με τους εκκινητές S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 και S2s3dmp, S1a3dmp, S31aD3 για τις 2C και 3D περιοχές αντίστοιχα με σκοπό να ελεγχθεί το όριο ευαισθησίας της μεθόδου RT-PCR για ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών.

7. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

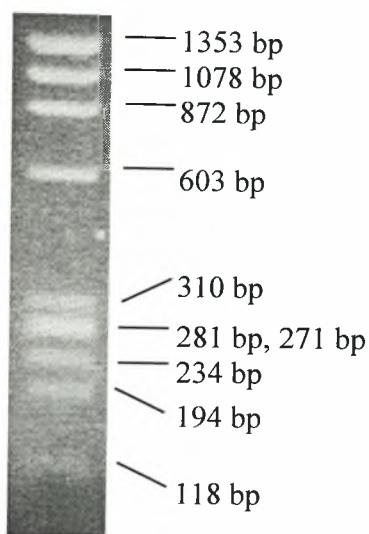
Για την ηλεκτροφόρηση των RT-PCR προϊόντων χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης με συγκέντρωση 2%. Συγκεκριμένα, 1,2 gr αγαρόζης (Invitrogen, UK) και 60ml TBE (Tris-Boric acid-EDTA) προστέθηκαν σε κωνική φιάλη των 250 ml. Ακολούθησε θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων για περίπου 1 min, ώστε να λιώσει η αγαρόζη. Όταν το διάλυμα έφτασε σε θερμοκρασία 40°C προστέθηκε ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr₂) τέτοια ώστε η τελική του συγκέντρωση να είναι 1 µg/ml. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγαριών βάσεων του δίκλωνου DNA, φθορίζοντας σε μήκος κύματος 290 nm. Στη συνέχεια το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδική θήκη ηλεκτροφόρησης προκειμένου να πήξει.

Μετά τον σχηματισμό της πηκτής αγαρόζης, 10 µl PCR προϊόντος αναμιγνύονται με 2 µl χρωστικής κυανό της βρωμοφαινόλης και ακολουθεί η προσθήκη των δειγμάτων στις ειδικές θέσεις της πηκτής. Επίσης στο πρώτο πηγαδάκι του πηκτώματος φορτώνουμε 5µl μάρτυρα μοριακού βάρους για τον προσδιορισμό του μήκους των RT-PCR προϊόντων. Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε ο ΦΧ174 HaeIII (Invitrogen, UK). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε τάση 120 Volts και ένταση 50 mA για 1 h. Το πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους φωτός UV Foto/Phoresis system (Fotodyne, Hartland, WI, USA) και φωτογραφήθηκε με Olympus digital camera.

Διαλύματα :

5x TBE : 30.25g Tris Base, 15.42g H₃BO₃ (Merck, Germany) και 1,48g EDTA διαλύονται σε 1L απιονισμένο νερό.

Κυανό της βρωμοφαινόλης : 1mM EDTA, 0,25% κυανό της βρωμοφαινόλης (Sigma, USA), 40% σουκρόζη.



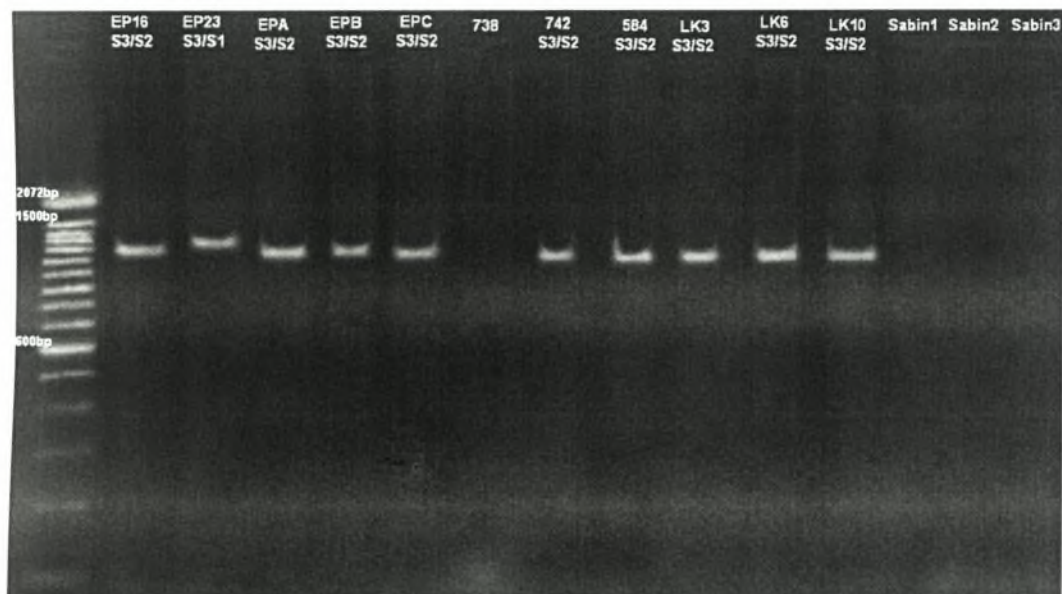
Εικόνα 7. 1: Ο μάρτυρας μοριακού βάρους HaeIII ΦΧ174.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την ενίσχυση των ανασυνδυασμένων τμημάτων των 2C και 3D γενωμικών περιοχών χρησιμοποιήθηκαν τα εκκινητικά μόρια S3sC2b, Sa13C2, Sa23C2 και S2s3dmp, S1a3dmp, S31aD3 για τις 2C και 3D περιοχές αντίστοιχα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες τα πρότυπα εμβολιακά στελέχη (Sabin 1, 2, 3) σε όλες τις PCR αντιδράσεις. Παρακάτω παρουσιάζονται οι φωτογραφίες από τις αντιδράσεις PCR, οι εκκινητές για τις 2C και 3D περιοχές, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό των ανασυνδυασμών στις 2C και 3D περιοχές καθώς επίσης και ο τύπος του ανασυνδυασμού που ανιχνεύθηκε σε κάθε δείγμα.

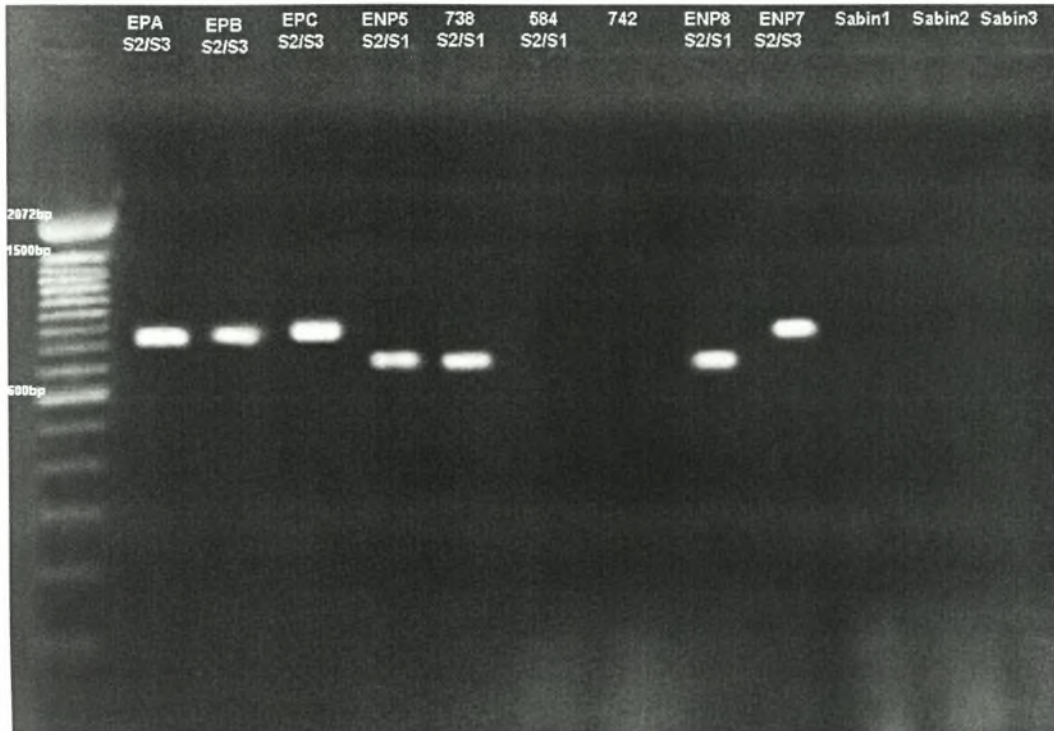
2C ΠΕΡΙΟΧΗ



Εκκινητές : S3sC2b / Sa13C2 + Sa23C2

- S3/S1 → PCR προϊόν : 1280 bp
- S3/S2 → PCR προϊόν : 1227 bp

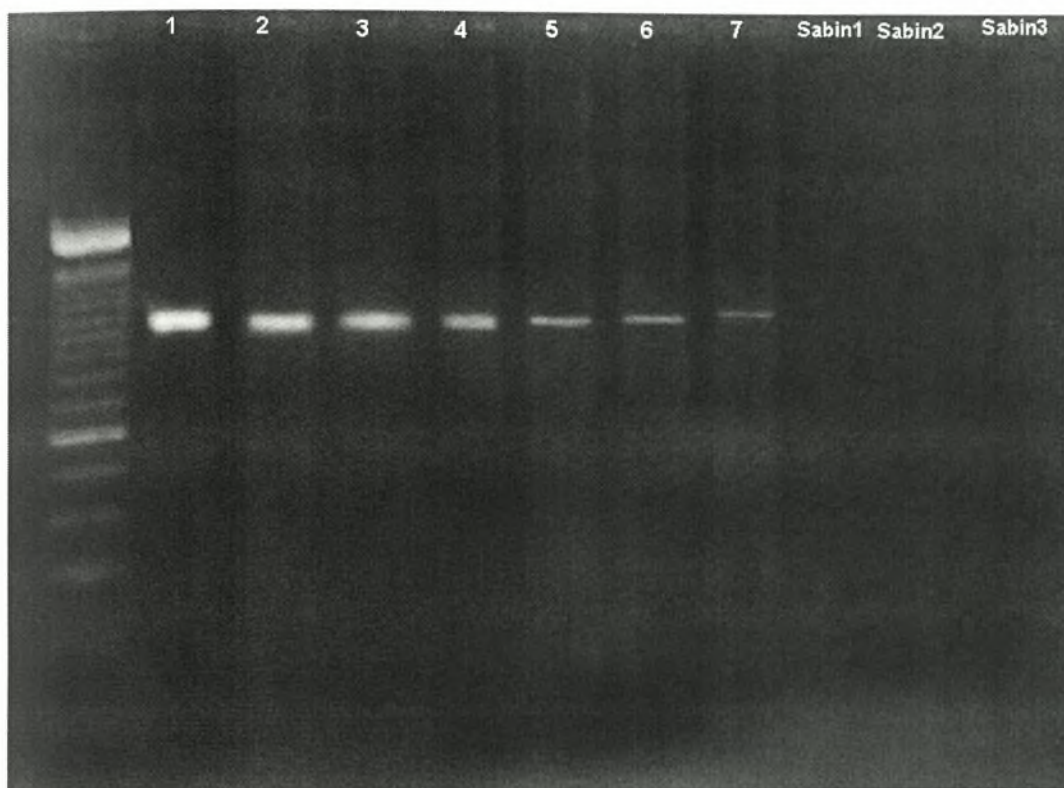
3D ΠΕΡΙΟΧΗ



Εκκινητές : S2s3dmp / S1a3dmp + S31aD3

- S2/S1 → PCR προϊόν : 733 bp
- S2/S3 → PCR προϊόν : 803 bp

Ευαισθησία μεθόδου RT-PCR στην 2C περιοχή



Lane numbers 1-7: σειριακές αραιώσεις $10^{5.5}$ - 1 TCID₅₀/0.1 ml ($10^{5.5}$, $10^{4.5}$, $10^{3.5}$, 10^3 , 10^2 , 10, 1)

- Η ευαισθησία της μεθόδου έφτασε μέχρι και 1 TCID₅₀/0.1 ml

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γένωμα των περισσότερων RNA ιών χαρακτηρίζεται από υψηλούς εξελικτικούς ρυθμούς. Οι εντεροϊοί χαρακτηρίζονται από εκτενή φαινόμενα ανασυνδυασμού και οι πολιοϊοί ανήκουν στους πιο γρήγορα εξελισσόμενους ιούς. Δύο βασικοί μηχανισμοί είναι υπεύθυνοι για τους υψηλούς ρυθμούς εξέλιξης των πολιοϊών: οι μεταλλάξεις και ο γενετικός ανασυνδυασμός. Είναι γνωστό ότι η πλειονότητα των ανασυνδυασμένων ιών έχουν ένα σημείο ανασυνδυασμού. Παρόλα αυτά σε εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών έχουν ανιχνευτεί διπλά σημεία ανασυνδυασμού με αποτέλεσμα τα στελέχη αυτά να είναι διπλά ανασυνδυασμένα. Το γεγονός αυτό αντικατοπτρίζει την ύπαρξη πολλαπλών γεγονότων ανασυνδυασμού και την αυξημένη ευελιξία του γενώματος του πολιοϊού.

Αρκετοί παράγοντες μπορεί να ευνοούν την συσσώρευση διατυπικών ανασυνδυασμών σε άτομα – δέκτες του εμβολίου OPV. Γενετικοί καθοριστές εξασθένησης συνήθως μειώνουν την αρμοστικότητα του ιού όμως ο διατυπικός ανασυνδυασμός μπορεί να γίνει το εργαλείο για την απαλοιφή αυτών των γενετικών αλλοιώσεων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες τα σημεία ανασυνδυασμού εντοπίζονται στη μέση ή στο 3' άκρο της 2C γενωμικής περιοχής, για την δημιουργία S3/Sx τύπων ανασυνδυασμού, και στο 3' άκρο της 3D γενωμικής περιοχής, για την δημιουργία S2/Sx τύπων ανασυνδυασμού. Η διατήρηση βιώσιμων RNA δευτεροταγών δομών έχει προταθεί ως πιθανή αιτία για την συγκέντρωση των ανασυνδυασμών στα σημεία αυτά.

Ο γενετικός ανασυνδυασμός έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση VAPP περιστατικών και εφόσον τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPVs) φέρουν ανασυνδυασμούς στην μη δομική περιοχή είναι αναγκαία η ύπαρξη μια γρήγορης, ευρέως εφαρμόσιμης μοριακής μεθόδου που να εντοπίζει τους ανασυνδυασμούς στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές τους. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε για την ανίχνευση των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές των εμβολιακών στελεχών πολιοϊών την μοριακή μέθοδο RT-PCR.

Οι εκκινητές S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 ενισχύουν τους συνήθεις τύπους ανασυνδυασμού S3/S1 και S3/S2 στη 2C γενωμική περιοχή και παράγουν προϊόντα 1280 και 1227 bp αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα οι άνωθεν εκκινητές ενισχύουν όλη την 2C γενωμική περιοχή (nt 4088 - 5368 για τον S3/S1 τύπο ανασυνδυασμού ή nt 4088 - 5315 για τον S3/S2 τύπο ανασυνδυασμού) παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο την δυνατότητα εντοπισμού όλων των S3/S1 και S3/S2 γεγονότων ανασυνδυασμού στην 2C περιοχή.

Οι εκκινητές S2s3dmp, S1a3dmp και S31aD3 ενισχύουν τους συνήθεις τύπους ανασυνδυασμού S2/S1 και S2/S3 στη 3D γενωμική περιοχή και παράγουν προϊόντα 733 και 803 bp αντίστοιχα. Οι άνωθεν εκκινητές ενισχύουν ένα τμήμα στο 3' μισό της 3D περιοχής (nt 6430 - 7163 για τον S2/S1 τύπο ανασυνδυασμού ή nt 6430 - 7233 για τον S2/S3 τύπο ανασυνδυασμού) παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο την δυνατότητα εντοπισμού των S2/S1 και S2/S3 γεγονότων ανασυνδυασμού στο 3' μισό της 3D περιοχής.

Δεκατέσσερα εμβολιακά στελέχη πολιοϊών τα οποία είχαν προηγουμένως χαρακτηριστεί από την ομάδα μας μέσω αλληλούχισης επιλέχθηκαν με σκοπό να εξεταστεί η αξιοπιστία της προτεινόμενης μεθόδου RT-PCR. Εννέα από αυτά (EPA, EPB, EPC, LK3, LK6, LK10, 584, 738, 742) ταυτοποιήθηκαν ως δίπλα ανασυνδυασμένα με σημεία ανασυνδυασμού στην 2C και/ή 3D περιοχή ενώ πέντε από αυτά (EP16, EP23, ENP5, ENP7, ENP8) βρέθηκαν να έχουν ένα σημείο ανασυνδυασμού που εντοπίζεται στην 2C ή 3D περιοχή. Όλοι οι τύποι ανασυνδυασμών S3/S1 ή S3/S2 που εντοπίζονται στην 2C περιοχή επιβεβαιώθηκαν μέσω της RT-PCR εκτός από τον τύπο ανασυνδυασμού S2/S1 που εδράζεται στο 3' άκρο της 2C περιοχής των στελεχών LK3, LK6 και LK10 καθώς όπως προαναφέρθηκε οι εκκινητές S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 ενισχύουν τους συνήθεις τύπους ανασυνδυασμού S3/S1 και S3/S2 στη 2C γενωμική περιοχή και όχι τον τύπο ανασυνδυασμού S2/S1. Σε κάποιο μεταγενέστερο στάδιο θα μπορούσαν να δημιουργηθούν εκκινητές που να ανιχνεύουν τον τύπο ανασυνδυασμού S2/S1 στη 2C γενωμική περιοχή. Τα δείγματα 742 και 584 παρήγαγαν ένα προϊόν 1227 bp μέσω της RT-PCR με τη χρήση των S3sC2b, Sa13C2 και Sa23C2 εκκινητών, το οποίο ανταποκρίνεται σε ανασυνδυασμό τύπου S3/S2 στην 2C περιοχή.

Επιπλέον, το δείγμα 738 παρήγαγε ένα προϊόν 733 bp με τη χρήση των S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 εκκινητών το οποίο ανταποκρίνεται σε ανασυνδυασμό τύπου S2/S1 στην 3D περιοχή. Το δείγμα 584 αν και είναι ανασυνδυασμένο στην 3D περιοχή με τύπο ανασυνδυασμού S2/S1 δεν ενισχύθηκε με τους εκκινητές S2s3dmp, S1a3dmp and S31aD3 διότι ο S1a3dmp υβριδίζεται πριν το σημείο ανασυνδυασμού.

Τα στελέχη LK3, LK6 και LK10 βρέθηκαν να είναι διπλά ανασυνδυασμένα S3/S2/S1 στην 2C γενωμική περιοχή, με τον πρώτο τύπο ανασυνδυασμού να βρίσκεται προς το 5' άκρο της 2C και τον δεύτερο τύπο ανασυνδυασμού στο 3' άκρο της 2C. Ένας τέτοιος ανασυνδυασμός που οδηγεί σε μια τριμελή 2C πρωτεΐνη είναι σπάνιο φαινόμενο. Τα τριμελή (S3/S2/S1) Sabin στελέχη είναι συνήθως ανασυνδυασμένα στην 2C (ο πρώτος ανασυνδυασμός ως S3/S2) και στην 3D (ο δεύτερος ανασυνδυασμός ως S2/S3). Όλοι οι τύποι ανασυνδυασμών S2/S1 ή S2/S3 που εντοπίζονται στην 3D περιοχή επίσης επιβεβαιώθηκαν μέσω της RT-PCR.

Η ευαισθησία της μεθόδου RT-PCR ελέγχθηκε και έφτασε μέχρι και 1 TCID₅₀/0.1 ml και στις δυο 2C και 3D περιοχές. Όμως θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι για την παρούσα μέθοδο θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα που δεν περιέχουν μίγματα πολιοϊών καθώς τα προϊόντα που προκύπτουν δεν μπορούν να διαχωριστούν λόγω του μεγάλου μεγέθους τους καθώς και του γεγονότος ότι οι μπάντες που εμφανίζονται στο gel αγαρόζης βρίσκονται πολύ κοντά η μια με την άλλη.

Σε μια εποχή εκρίζωσης των πολιοϊών αγρίου τύπου, την κύρια πηγή μόλυνσης από πολιοϊούς σε παγκόσμια κλίμακα αποτελούν τα εμβολιοσυνδεόμενα στελέχη πολιοϊών (VDPVs). Επίσης καθώς η πλειονότητα των χωρών, ελευθέρων από άγρια στελέχη πολιοϊών, έχει αντικαταστήσει το OPV εμβόλιο με το IPV και λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι το IPV δεν επάγει τα ίδια επίπεδα ανοσίας όπως το OPV, η εμφάνιση ανασυνδυασμένων εμβολιακών στελεχών στον πληθυσμό θα έχει σημαντικές επιπτώσεις στην δημόσια υγεία καθώς την μοναδική πηγή μόλυνσης από πολιοϊούς σε παγκόσμια κλίμακα θα αποτελεί το εμβόλιο (OPV).

Το γεγονός αυτό καθιστά πολύ σημαντικό τον άμεσο εντοπισμό και χαρακτηρισμό των cVDPVs. Παρόλο που ο πιο καθοριστικός χαρακτηρισμός των cVDPVs επιτυγχάνεται μέσω της γενωμικής αλληλούχισης η μέθοδος RT-PCR προσφέρει μια νέα, οικονομική και ευρέως εφαρμόσιμη προσέγγιση για τον εντοπισμό των συνήθων τύπων ανασυνδυασμού στις 2C και 3D γενωμικές περιοχές των VDPVs και μπορεί να αποτελέσει μια πρώτη προσέγγιση για τον γρήγορο εντοπισμό των VDPVs σε εργαστήρια τα οποία δεν έχουν δυνατότητα γενωμικής αλληλούχισης.



Βιβλιογραφία:

Papers:

- 1) **Agirre A., A. Barco, L. Carrasco, and J. L. Nieva. 2002.** Viroporin-mediated membrane permeabilization. *J. Biol. Chem.* 277(43):40434-40441.
- 2) **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.
- 3) **Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- 4) **Barco A. and L. Carrasco. 1998.** Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. *J. Virol.* 72(5):3560-3570.
- 5) **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.
- 6) **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.
- 7) **Betty Brown, M. Steven Oberste, Kaija Maher, and Mark A. Pallansch. 2003.** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77:8973-8984.
- 8) **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.
- 9) **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.

- 10) **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.
- 11) **Brown B., S. Oberste, K. Maher, and M. Pallansch. 2003.** Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(16):8973-8984.
- 12) **Casas I., L. Powell, P. E. Klapper, and G. M. Cleator. 1995.** New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J. Virol. Meth.* 53:25-36.
- 13) **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.
- 14) **Cho M.W., N. Teterina, D. Egger, K. Bienz, and E. Ehrenfeld. 1994.** Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology* 202: 129-145.
- 15) **Choe S. S. and K. Kirkegaard. 2004.** Intracellular topology and epitope shielding of poliovirus 3A protein. *J. Virol.* 78(11): 5973-5982.
- 16) **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.
- 17) **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.
- 18) **Dahourou G., S. Guillot, O. Le Gall, and R. Crainic. 2002.** Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J. Gen. Virol.* 83(12):3103-3110.

- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Fogg M. H., N. L. Teterina, and E. Ehrenfeld. 2003. Membrane requirements for uridylation of the poliovirus VPg protein and viral RNA synthesis in vitro. *J. Virol.* 77(21): 11408-11416.
- 23) 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.
- 24) Georgopoulou A., P. Markoulatos, N. Spyrou, and N. C. Vamvakopoulos. 2000. Improved genotyping vaccine and wild-type poliovirus strains by restriction fragment length polymorphism analysis: clinical diagnostic implications. *J. Clin. Microbiol.* 38(12):337-4342.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Herold J. and R. Andino. 2001. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) Joachims M., K. S. Harris, and D. Etchison. 1995. Poliovirus protease 3C mediates cleavage of microtubule-associated protein 4. *Virology* 211:451-461.
- 34) Jurgens C. and J. B. Flanagan. 2003. Initiation of poliovirus negative-strand RNA synthesis requires precursor forms of P2 proteins. *J. Virol.* 77(2): 1075-1083.
- 35) 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.
- 36) 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.

- 37) Krausslich H. G., C. Holscher, Q. Reuer, J. Harber, and E. Wimmer. 1990. Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity. *J. Virol.* 64:2433-2436.
- 38) Kuyumcu-Martinez N. M., M. E. Van Eden, P. Younan, and R. E. Lloyd. 2004. Cleavage of poly(A)-binding protein by poliovirus 3C protease inhibits host cell translation: a novel mechanism for host translation shutoff. *Mol. and Cell. Biology* 24(4):1779-1790.
- 39) Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, Demartino J, Rozhon E, Schwartz J, Girjavallabhan V, O'Connell J, Arnold E. 1997. Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent sch48973- comparison of the structural and biological properties of the three poliovirus serotypes. *Structure* 5:961-978.
- 40) Liu H. M., D. P. Zheng, L. B. Zhang, M. S. Oberste, M. A. Pallansch, and O. M. Kew. 2000. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J. Virol.* 74(23):11153-11161.
- 41) Lyle J. M., A. Clewell, K. Richmond, O. C. Richards, D. A. Hope, S. C. Schultz, and K. Kirkegaard. 2002. Similar structural basis for membrane localization and protein priming by an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 277(18): 16324-16331.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.

- 45) **Moss E. G., V. R. Racaniello. 1991.** Host range determinants located on the interior of the poliovirus capsid. *EMBO J.* 10: 1067-1074.
- 46) **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.
- 47) **Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch. 1999.** Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 73:1941-1948.
- 48) **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.
- 49) **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
- 50) **Paul A. V., J. H. van Boom, D. Filippov, and E. Wimmer. 1998.** Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *NATURE* 393: 280-284.
- 51) **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.
- 52) **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.
- 53) **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.
- 54) **Tucker S. P., C. L. Thornton, E. Wimmer, and R. W. Compans. 1993.** Vectorial release of poliovirus from polarized human intestinal epithelial cells. *J. Virol.* 67:4274-4282.

- 55) Weidman M. K., R. Sharma, S. Raychaudhuri, P. Kundu, W. Tsai, and A. Dasgupta. 2003. The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Research* 95:75-85.
- 56) Yeates T. O., D. H. Jacobson, A. Martin, C. Wychowski, M. Girard, D. J. Filman, and J. M. Hogle. 1991. Three-dimensional structure of a mouse-adapted type-2/type-1 poliovirus chimera. *EMBO J.* 10: 2331-2341.

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) 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.
- 5) Domingo E. and J. J. Holland. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Friedrich F. 1996. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virologica* 40:157-170.

- 9) **Hogle, J. M., 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- 10) **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.
- 11) **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.*
- 12) **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.
- 13) **Pfister T., C. Mirzayan , and E. Wimmer. 1999.** Molecular Biology of poliovirus. *Academic Press Encyclopedia of Virology* 2e.
- 14) **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.
- 15) **Wimmer E., C. U. T. Hellen, and X. Cao. 1993.** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27:353-436.
- 16) **Siafakas N.,Georgopoulou A.,Markoulatos P.,Spyrou N. (1999)** Βιολογία των εντεροϊών : δομή ,λειτουργία παθογένεση και εξέλιξή τους. Μέρος Α' . *Ελληνική Ιολογία (Hellenic Virology)* 4(1):7-24

