

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

**ΑΝΑΔΡΟΜΙΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΩΝ ΣΕ
ΠΕΡΙΒΑΝΤΟΛΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΟΛΙΟΪΩΝ**

ΜΠΡΑΚΟΥΛΙΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

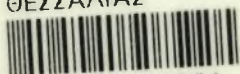
ΛΑΡΙΣΑ , 2007



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

Αριθ. Εισ.: 5204/1
Ημερ. Εισ.: 05-03-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2007
ΜΠΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087364

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Π. ΜΑΡΚΟΥΛΑΤΟΣ : ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ – ΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

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

Κ. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ : ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΜΕ ΕΜΦΑΣΗ ΣΤΗ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ – ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν ανασκοπικά, για ανασυνδυασμούς, 9 περιβαλλοντικά δείγματα εμβολιακών στελεχών (Sabin), που είχαν απομονωθεί από την ευρύτερη περιοχή του λεκανοπεδίου της Αττικής τη χρονική περίοδο 1975-1988. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε βασιζόμενη στις μεθόδους RT-PCR-RFLP και sequencing (αλληλούχιση). Τρία από αυτά τα δείγματα βρέθηκαν να έχουν διπλό ανασυνδυασμό. Τα δύο είχαν τύπου S3/ S2/ S1 και το τρίτο τύπου S1/ S3/ S2. Ο τελευταίος είναι και ο πιο σπάνιος και ακόμα πιο σπάνιο το γεγονός ότι ο πρώτος ανασυνδυασμός βρέθηκε στην κωδική περιοχή της 2Α. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται ανασυνδυασμός τύπου S1/S3 στην 2Α περιοχή του γενώματος εμβολιακών στελεχών Sabin .

Η συγκεκριμένη εργασία ενισχύει την αναγκαιότητα του περιβαλλοντικού ελέγχου για πολιοϊούς, καθώς με αυτό τον τρόπο υποδεικνύεται η ύπαρξή τους και η πρόοδος της πρωτοβουλίας της παγκόσμιας οργάνωσης υγείας που αφορά την εκρίζωση της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

ABSTRACT.

A retrospective assay intended to investigate recombinations in nine environmental samples with serotype Sabin. They isolated from the extensive region of Attica (Athens, Greece) and identified by the department of Virology, Hellenic Institute Pasteur, during the period of time 1975-1988. In this study we used the methods of RT-PCR-RFLP and sequencing. Three of these samples found to be birecombinant. Two of them were birecombinant of type S3/ S2/ S1 and the third sample of type S1/ S3/ S2. This is the first time that a S1/S3 recombination event in 2A region of poliovirus Sabin strains is reported.

This research strengthens the necessity of environmental surveillance of poliovirus circulation, which is a highly sensitive tool and reveals the existence or not of polioviruses and the spread of the paralytic poliomyelitis in a community at a given period of time, and also provide insights relevant with the progress towards global eradication of Poliomyelitis.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

<u>1.1. Η ιστορία της πολιομυελίτιδας</u>	6
<u>1.2. Γενικά για την ασθένεια</u>	6
<u>2. Οι πολιοϊοί</u>	
<u>2.1. Ταξινόμηση των πολιοϊών</u>	7
<u>2.2. Δομή του καυιδίου και αντιγονικότητα.</u>	9
<u>2.3. Το γονιδίωμα των πολιοϊών.</u>	12
<u>3. Ο κύκλος της ζωής του πολιοϊού</u>	15
<u>3.1. Ο υποδοχέας CD155 των πολιοϊών (PVR)</u>	15
<u>3.2. Μετάφραση του ιϊκού RNA.</u>	17
<u>3.3. Πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης των πολιοϊών.</u>	18
<u>3.4. Αντιγραφή του ιϊκού γενόματος</u>	19
<u>3.5. Καψιδίωση του RNA και απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων</u>	23
<u>4. Παθογένεια.</u>	24
<u>5. Κλινικά χαρακτηριστικά.</u>	25
<u>6. Επιδημιολογία.</u>	26
<u>7. Εργαστηριακή διάγνωση.</u>	28
<u>7.1. Απομόνωση των πολιοϊών.</u>	28
<u>7.2. Οροτυπική ταυτοποίηση.</u>	29
<u>7.3. Έλεγχος με αντισώματα.</u>	29
<u>7.4. Μέθοδοι μοριακής διάγνωσης</u>	29
<u>8. Εμβόλια.</u>	30
<u>8.1. OPV (Oral Poliovirus Vaccine).</u>	31
<u>8.2. IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine).</u>	32
<u>8.3. OPV και εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP).</u>	33
<u>9. Εξέλιξη των πολιοϊών.</u>	35
<u>9.1. Μεταλλαξιγένεση.</u>	35
<u>9.2. Γενετικός ανασυνδυασμός.</u>	36
<u>10. Πολιοϊοί και περιβάλλον.</u>	39
<u>ΜΕΘΟΔΟΙ-ΥΛΙΚΑ</u>	42
<u>ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.</u>	43
<u>ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ.</u>	44
<u>ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA.</u>	45
<u>ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).</u>	46
<u>ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).</u>	46
<u>RFLP (Ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα).</u>	50
<u>Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και του RFLP.</u>	51
<u>ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.</u>	52
<u>ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΓΟΡΙΘΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ.</u>	52
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.</u>	53
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.</u>	53
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RFLP</u>	54
<u>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.</u>	59
<u>ΣΥΖΗΤΗΣΗ.</u>	64
<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.</u>	66

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ιστορία της πολιομυελίτιδας

Η πολιομυελίτιδα είναι μία ασθένεια μεγάλης σημασίας, που έχει απασχολήσει πολλούς πολιτισμούς ανά τους αιώνες. Η ιδιαιτερότητα και η σημαντικότητα αυτής αποδεικνύεται από την πρώτη καταγραφή της περί το 1500-1400 π.Χ., στην Αίγυπτο, σε επικήδειο στήλη. Στην συγκεκριμένη στήλη δίνεται μία αναπαράσταση ενός ιερέα που έχει το ένα του άκρο παράλυτο, χαρακτηριστικό σύμπτωμα της παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Εικόνα 1.1).



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

Μέσα από το πέρασμα των αιώνων όμως δεν έχουμε πολλές αναφορές για αυτή την ασθένεια, όπου από τις αρχές του 19^{ου} αιώνα κάνει έντονη την παρουσία της σε Αμερική και Ευρώπη. Ένα μεγάλο βήμα για την καταπολέμηση και τον περιορισμό της έγινε περί τα μέσα του 20^{ου} αιώνα με τη χρήση των εμβολίων (OPV, Oral Polio Vaccine και IPV, Inactive Polio Vaccine).

1.2. Γενικά για την ασθένεια.

Ο φυσικός ξενιστής του ιού αυτού είναι μόνο ο άνθρωπος (Melnick J.L, 1996). Η μετάδοση του ιού γίνεται πιο εύκολα σε περιοχές με χαμηλό επίπεδο υγιεινής. Η παρουσία των πολιοϊών είναι πιο συχνή σε αστικά λύματα (στα κόπρανα κυρίως), τα οποία μπορούν να αποτελέσουν εστία μόλυνσης άμεσα ή έμμεσα μέσω των μυγών ή μέσω μολυσμένου νερού που χρησιμοποιείται ως πόσιμο, για καθαριότητα και για άρδευση. Η μετάδοση και η εξάπλωση του ιού είναι επίσης εφικτή με την ανθρώπινη επαφή. Οι ιοί μεταδίδονται πιο γρήγορα μεταξύ των μελών μιας οικογένειας. Η ασθένεια εμφανίζεται σε όλες τις ηλικίες αλλά συνήθως τα άτομα μικρής ηλικίας είναι πιο ευαίσθητα απ' ότι οι ενήλικες (Melnick J.L, 1996). Οι βέλτιστες συνθήκες κλίματος που ευνοούν τη δράση και την εξάπλωση των πολιοϊών είναι κυρίως αυτές της ζέστης και υγρασίας, δηλαδή κατά την περίοδο καλοκαιριού και φθινοπώρου για χώρες που βρίσκονται στις εύκρατες ζώνες (Georgopoulou et al, 2000), ενώ σε περιοχές της τροπικής ζώνης κατά τη διάρκεια όλου του χρόνου (Philip D. Minor 1999). Από την άλλη, ο ιός αδρανοποιείται αποτελεσματικά σε θερμοκρασία άνω των 55°C, σε έκθεση σε υπεριώδες φως (UV), καθώς και με τη χρήση διαφόρων χημικών ουσιών (όπως είναι η φορμαλδεϋδη και η χλωρίνη).

2. Οι πολιοϊοί

2.1. Ταξινόμηση των πολιοϊών

Οι πολιοϊοί ανήκουν στο γένος των Εντεροϊών (Enterovirus) της οικογένειας των Picorna ιών (*Picornaviridae*). Η οικογένεια αυτή έχει πάρει το όνομά της από την ελληνικής προέλευσης λέξη Pico (που σημαίνει, μικρό) και από το rna, που είναι και το γενετικό υλικό των ιών της συγκεκριμένης οικογένειας. Οι ιοί αυτής της οικογένειας δεν φέρουν έλυτρο στη δομή τους και το RNA γενετικό τους υλικό είναι θετικής πολικότητας. Η ταξινόμηση των Picorna ιών σε γένη έχει γίνει με βάση τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά αυτών, δηλαδή σύμφωνα με τη σταθερότητα του καψιδίου τους, τη βέλτιστη θερμοκρασία πολλαπλασιασμού, το pH του περιβάλλοντος, τον εκάστοτε ξενιστή και το όργανο που προσβάλουν, καθώς και από την ομοιότητα της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας. Έτσι αυτοί κατατάσσονται σε εννέα γένη :i) τους εντεροϊούς (enteroviruses),ii) τους ρινοϊούς (rhinoviruses),iii) τους καρδιοϊούς (cardio viruses),iv) τους αφθοϊούς (aphthovirus),v) τους ιούς της Ηπατίτιδας Α (hepatoviruses),vi) τους parecho-ιούς (par echoviruses),vii) τους ιούς Β της ρινίτιδας των ιπποειδών (equine rhinitis B viruses – Erboviruses),viii) τους kobuviruses, και ix) τους teschoviruses King et al., 2000),(Πίνακας 1.1.).

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	ΓΕΝΟΣ
	Enterovirus
	Rhinovirus
	Hepatovirus
	Cardiovirus
PICORNAVIRIDAE	Aphthovirus
	Parechovirus
	Erbovirus
	Kobuvirus
	Teschovirus

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση της οικογένειας των Picorna- ιών

Κάθε γένος αποτελείται από διακριτά ως προς την αντιγονικότητα τους στελέχη και μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί περίπου 230 ορότυποι picorna ιών. Αρχικά το γένος των Εντεροϊών χωρίστηκε σε τέσσερις κατηγορίες : (i) στους

πολιοϊούς (PV1-3), (ii) στους coxsackie A ιούς (CAV), (iii) στους coxsackie B ιούς (CBV) και (iv) στους echo-ιοούς (Melnick J.L., 1996), (Πίνακας 1.2). Μετέπειτα, όμως ανακαλύφθηκαν και ταυτοποιήθηκαν νέα στελέχη και έτσι το συγκεκριμένο γένος διαχωρίστηκε σε πέντε κατηγορίες (King et al., 2000) που έχουν την εξής διαμόρφωση που δίνεται στον παρακάτω πίνακα.

ΕΝΤΕΡΟΪΟΙ		
Ομάδα I	πολιοϊούς	PV1-3
Ομάδα II	εντεροϊούς A (HEV-A),	CAV2 έως CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 και EV71
Ομάδα III	εντεροϊούς B (HEV-B)	CAV9, CBV1 έως CBV6, E1 έως E7, E9, E11 έως E21, E24 έως E27, E29 έως E33, EV69 και EV73,
Ομάδα IV	εντεροϊούς C (HEV-C)	CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17 έως CAV22 και CAV24
Ομάδα V	εντεροϊούς D (HEV-D)	EV68 και EV70

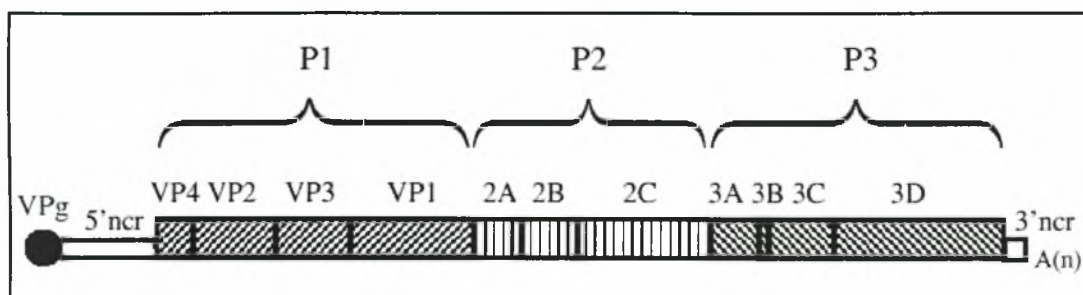
Πίνακας 1.2. Ταξινόμηση του γένους των Εντεροϊών.

Γενικά οι Εντεροϊοί πολλαπλασιάζονται αρχικά στον γαστρεντερικό σωλήνα και από εκεί διασκορπίζονται και προσβάλλουν και διάφορους άλλους ιστούς του ανθρώπινου οργανισμού (Wimmer et al 1999). Η συμπεριφορά των πολιοϊών είναι ίδια, αφού ανήκουν σ' αυτό το γένος, και κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού του 20^{ου} αιώνα είχαν προκαλέσει μεγάλες επιδημίες στις Ηνωμένες Πολιτείες και στην Ευρώπη.

Το έναυσμα για τη κατανόηση και μελέτη των πολιοϊών έγινε από τους Landsteiner και Popper το 1909 και τέσσερις δεκαετίες αργότερα επιτυγχάνεται η δημιουργία εμβολίων από τους Salk, Younger και Albert Sabin. Βέβαια, σημαντικότερη ήταν η συμβολή του τελευταίου με την παραγωγή του εμβολίου OPV (Oral Polio Vaccine), με το οποίο μειώθηκαν τα κρούσματα της πολιομυελίτιδας σε δραματικό βαθμό λόγω της ανοσοποίησης των πληθυσμών.

Οι πολιοϊοί συγκεκριμένα είναι θετικής πολικότητας RNA ιοί και διακρίνονται σε 3 διαφορετικούς ορότυπους, στους πολιοϊούς τύπου 1 (PV1), στους τύπου 2 (PV2) και τύπου 3 (PV3). Η διάκριση των ορότυπων γίνεται σύμφωνα με την αντιγονικότητα αυτών κάνοντας χρήση μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων, αντίστοιχων με αυτούς τους ορότυπους (διαδικασία οροεξουδετέρωσης), (Christofer U.T. Hellen et al 1993). Ο κάθε ορότυπος υποδιαιρείται σε διαφορετικά στελέχη τα οποία

ταυτοποιούνται είτε με οροεξουδετέρωση, είτε με την αλληλούχιση συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών περιοχών τους. Το πρώτο στέλεχος που αναγνωρίστηκε πλήρως, λόγω του προσδιορισμού της αλληλουχίας του, ήταν το στέλεχος Mahoney, [PV1(M)]. Από τότε αλληλουχίστηκαν και άλλα στελέχη, έτσι ώστε να φανεί η ομολογία της νουκλεοτιδικής ή της αμινοξικής τους αλληλουχίας. Με αυτό τον τρόπο έγινε εφικτός ο σχεδιασμός ενός γενετικού χάρτη, κυρίως από την περαιτέρω ανάλυση όλων των ιϊκών πολυπεπτιδίων των πολιοϊών (Pfister et al., 1999). (Εικόνα 2.1.)

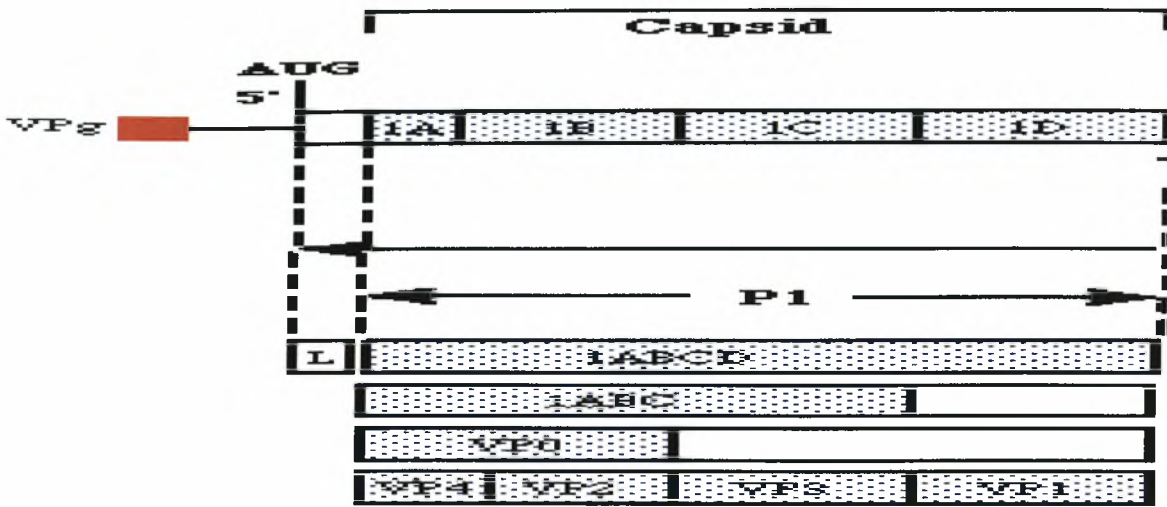


Εικόνα 2.1. Γενετικός χάρτης των πολιοϊών. Στην P1 περιοχή έχουμε όλες τις δομικές πρωτεΐνες του πολιοϊού, ενώ στις περιοχές P2 και P3 όλες τις λειτουργικές (όπου P είναι το πρόδρομο πολυπεπτιδίο της μετάφρασης).

2.2. Δομή του καψιδίου και αντιγονικότητα.

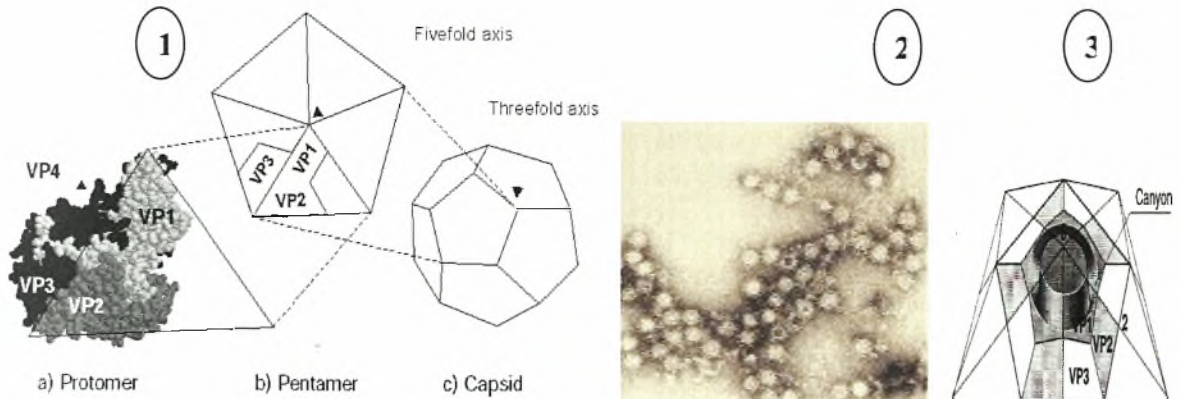
Το καψίδιο των πολιοϊών δεν περιβάλλεται από έλυτρο λιπιδικής σύστασης. Έχει εικοσαεδρική συμμετρία με διάμετρο 28 nm. Οι δομικοί λίθοι αυτού του καψιδίου είναι 60 αντίγραφα των τεσσάρων πρωτεϊνών VP1, VP2, VP3 και VP4 (Pfister et al., 1999). Αυτές οι πρωτεΐνες προκύπτουν από την πρωτεόλυση της πρόδρομου πολυπεπτιδίου P1 (Εικόνα 2.2) (Stanway G. 1990).

Αρχικά η P1 διαχωρίζεται στα τρία πολυπεπτιδία VP0 (VP4 + VP2), VP3 και VP1 τα οποία δημιουργούν τα πρωτομερή. Στην πορεία αυτά συνενώνονται ανά πέντε σχηματίζοντας τα πενταμερή [(VP0, VP3, VP1)₅]. Δώδεκα από αυτά τα πενταμερή ενώνονται σχηματίζοντας το προκαψίδιο [(VP0, VP3, VP1)₅]₁₂ (Wimmer et al. 1999). Στο τελικό στάδιο της ωρίμανσης του καψιδίου η VP0 κόβεται πρωτεολυτικά παράγοντας τις VP2 και VP4 πρωτεΐνες. (Stanway et al., 1990) (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2. Η πρωτεόλυση του P1 πρόδρομου πολυπεπτιδίου.

Όλα τα πενταμερή σταθεροποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς και μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Αυτοί οι δεσμοί όμως δεν αρκετά ισχυροί. Αυτό πιθανόν συμβαίνει για να μπορεί να γίνεται ευκολότερα η αποδιάταξη του καψιδίου και να απελευθερώνεται ευκολότερα το ιικό γένωμα στο κύτταρο ξενιστή. Στο κέντρο κάθε πενταμερούς βρίσκεται ο (5x) άξονας [(Εικόνα 2.3 (1),β) βέλος], ενώ ανάμεσα στα πενταμερή βρίσκεται ο άξονας (3x) [(Εικόνα 2.3 (1),γ) βέλος], καθώς και ο άξονας (2x) (δε φαίνεται στην εικόνα). Γύρω από τον (5x) άξονα έχουμε το σχηματισμό της αύλακας (canyon) [(Εικόνα 2.3.(3)]. Η τρισδιάστατη δομή του ιού είναι σήμερα γνωστή αφού κρυσταλλώθηκε το 1955 και αναλύθηκε για πρώτη φορά από τους Hogle, Filman και Chow το 1985.



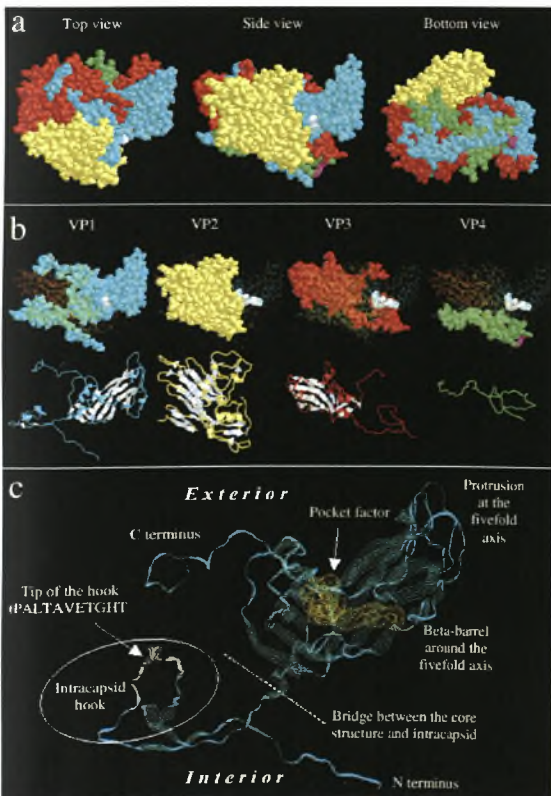
Εικόνα 2.3. (1) Απεικόνιση α) του πρωτομερούς, με βέλος δείχνεται η VP4 που βρίσκεται στο εσωτερικό, β) του πενταμερούς, με βέλος δείχνεται ο (5x) άξονας, και γ) του ώριμου καψιδίου, με βέλος δείχνεται ο (3x) άξονας. (2) Ηλεκτρονική φωτογραφία των πολιοϊών, όπου φαίνεται η εικοσαεδρική τους διαμόρφωση. (3) Απεικόνιση της αύλακας που περιβάλλει τον (5x) άξονα.

Στη σταθεροποίηση του ιικού καψιδίου πιστεύεται ότι σημαντικό ρόλο παίζει η δομική πρωτεΐνη VP4, παρόλο που βρίσκεται εσωτερικά αυτού. Αυτή η σταθεροποίηση επιτυγχάνεται, είτε αλληλεπιδρώντας με το αμινοτελικό της άκρο με τις άλλες τρεις πρωτεΐνες (VP1, VP2, VP3), (Wimmer et al 1999), είτε και με

άλλους παράγοντες όπως είναι το μυριστικό οξύ (Chow et al., 1987), (Εικόνα 2.4). Επίσης συμβάλει στην πρόσδεση του ιού με τον/τους υποδοχέα/εις του κυττάρου-ξενιστή (Ratka M. et al 1989). Καθώς και στην απελευθέρωση του ιϊκού γονιδιώματος στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του ξενιστή.

Οι υπόλοιπες 3 δομικές πρωτεΐνες (VP1, VP2 και VP3) που βρίσκονται εξωτερικά του καψιδίου, αν και διαφέρουν στο μέγεθος και στην αμινοξική τους αλληλουχία, έχουν παρόμοια τρισδιάστατη διαμόρφωση, αποτελούμενες όλες από ένα αντιπαράλληλο β-βαρέλι οχτώ κλώνων (Εικόνα 2.4, b). Αυτά τα αντιπαράλληλα β-πτυχωτά ενώνονται μεταξύ τους με αμινοξικές θηλιές (loop), οι οποίες εξέχουν στην επιφάνεια του καψιδίου και είναι διαφορετικές για τη κάθε μια δομική πρωτεΐνη. Αυτές είναι και οι κύριες αντιγονικές θέσεις του ιού (Hellen et al 1993). Οι αντιγονικές θέσεις (N-Ags) που έχουν αναγνωριστεί μέχρι σήμερα είναι τέσσερεις, οι N-AgI, N-AgII, N-AgIIIA και N-AgIIIB και είναι διαφορετικές για την κάθε πρωτεΐνη (Wimmer et al 1999).

Τέλος θα κάνουμε μια αναφορά για το ρόλο της αύλακας, η οποία εδράζεται γύρω από τον (5x) άξονα συμμετρίας κοντά στα όρια σύνδεσης των πρωτεϊνών VP1 και VP3 [(Εικόνα 2.3.(3))]. Επειδή η αύλακα έχει πολύ μικρές διαστάσεις δεν μπορεί να αναγνωριστεί από τα αντισώματα του οργανισμού-ξενιστή και πιστεύεται ότι αυτή η διαμόρφωση επιτρέπει την πιο εύκολη προσκόλληση του ιού στον υποδοχέα του ξενιστή, χωρίς επακόλουθη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού. Επιπλέον έχει βρεθεί μια υδρόφοβη εσοχή (hydrophobic pocket) εσωτερικά της αύλακας όπου συναντούμε το μόριο της σφιγγοσίνης (Εικόνα 2.4). Η σφιγγοσίνη πιθανόν ελέγχει την πλαστικότητα του ιού κατά την προσκόλλησή του στη μεμβράνη του κυττάρου ξενιστή, έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η απελευθέρωση του γονιδιώματος του ιού στο ενδοκυττάριο περιβάλλον του κυττάρου ξενιστή (Filman et al., 1989).



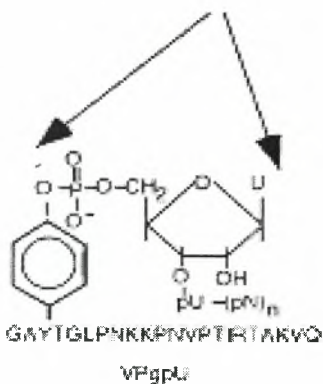
Εικόνα 2.4. Μοριακή δομή των δομικών πρωτεϊνών και η τρισδιάστατη δομή του πρωτομερούς. α) Μοντέλο του πρωτομερούς απεικονισμένο σε τρεις διαφορετικές οπτικές γωνίες. VP1 με κυανό χρώμα, VP2 με κίτρινο, VP3 με κόκκινο, VP4 με πράσινο, σφιγγόσίνη (pocket factor) με λευκό, μυριστικό οξύ με ιώδες. β) τρισδιάστατη δομή ξεχωριστά της κάθε δομικής πρωτεΐνης. Στο κάτω μέρος της εικόνας φαίνεται η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών καθώς και τα β-πτυχωτά (λευκό). γ) Απεικόνιση της VP1 πρωτεΐνης, που χρωματίζεται με κυανό, και του παράγοντα της υδρόφοβης εσοχής (σφιγγοσίνη), με κίτρινο χρώμα. Φαίνεται επίσης και η διαμόρφωση του αντιπαράλληλου β-βαρελιού. Η απεικόνιση έχει επιτευχθεί με τη βοήθεια του αλγοριθμικού προγράμματος RasMol 2.6 με βάση την αμινοξική αλληλουχία του CAV9, η οποία είναι συγγενική με αυτή των πολιοϊών. Οι πληροφορίες για την αμινοξική αλληλουχία έχουν παρθεί από το Protein Data Bank (PDB) of the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) at <http://www.rcsb.org/pdb/>.

2.3. Το γονιδίωμα των πολιοϊών.

Το γονιδίωμα των πολιοϊών εσωκλείεται στο καψίδιο (Ενότητα 2.2.). Είναι ένα μονόκλωνο μόριο RNA θετικής πολικότητας μικρού μεγέθους, περίπου 7500 βάσεων (Pfister et al., 1999). Το μέγεθός του ανάμεσα στους 3 τύπους των πολιοϊών ποικίλει με απειροελάχιστες διαφορές. Συγκεκριμένα το μήκος του γονιδιώματος του PV1 (Polio Virus 1) είναι 7440 nt, του PV2 7439 nt και του PV3 7439 nt.

Στο 5'-άκρο του ιικού RNA είναι προσδεμένη μία πρωτεΐνη 22 αμινοξέων, η VPg, ενώ στο 3'-άκρο το ιικό RNA φέρει μία πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly(A)tail), μήκους περίπου 60 nt (Εικόνα 2.1). Η VPg συνδέεται με το 5'-άκρο του ιικού γονιδιώματος ομοιοπολικά με φωσφοδιεστερικό δεσμό μεταξύ ενός κατάλοιπου τυροσίνης της VPg και της 5'-φωσφορικής ομάδας του πρώτου νουκλεοτιδίου του γονιδιώματος του ιού. Το αποτέλεσμα αυτού του δεσμού είναι η δημιουργία μιας δομής γνωστής ως VPg-pUU, (Εικόνα 2.5) η οποία είναι χαρακτηριστική για όλους του ιούς του γένους των Picorna- ιών.

Η VPg μοιάζει με τη δομή του cap των ευκαρυωτικών mRNA και παίζει σημαντικό ρόλο στην αντιγραφή, ως εκκινητικό μόριο, καθώς και στη διαδικασία της συγκρότησης των ιϊκών σωματιδίων (λεπτομέρειες, Ενότητες 3.2-3.5). Η VPg έχει τη δυνατότητα να συνδέεται ομοιοπολικά με το RNA χωρίς την παρουσία άλλων παραγόντων (Tobin et al., 1989).



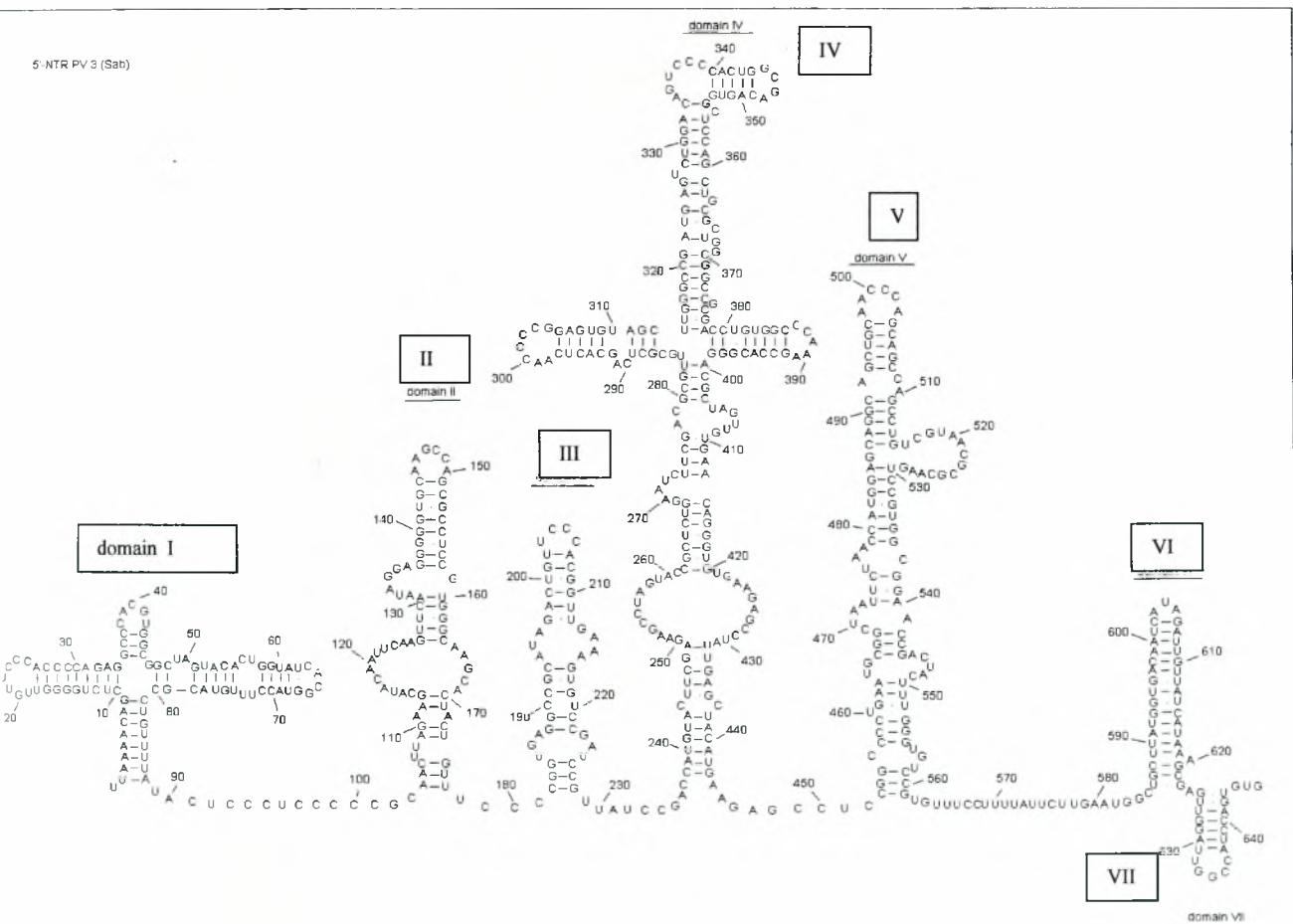
Εικόνα 2.5. Ο φωσφοδιεστερικός δεσμός μεταξύ της VPg και του πρώτου νουκλεοτιδίου του 5'-άκρο.

Ο ρόλος της πολυαδενυλιωμένης ουράς (poly(A)tail) είναι καίριος για αρκετές διεργασίες του ιικού κύκλου ζωής . Τέτοιες διεργασίες είναι η αντιγραφή και η μετάφραση. Επίσης είναι υπεύθυνη για τη σταθερότητα του ιϊκού γενώματος, αφού το RNA είναι χημικά ασταθές μόριο. Η επίτευξη αυτών των διεργασιών γίνεται με τη σύνδεση της poly(A) ουράς με πρωτεΐνες αντίστοιχες κάθε φορά για την κάθε διεργασία (λεπτομέρειες, Ενότητες 3.2 και 3.3). (Christopher U.T. Hellen et al, 1993)

Το γένωμα των πολιοϊών αποτελείται ακόμα και από άλλες τρεις διακριτές περιοχές: i) την 5'-μη κωδική περιοχή (5'-ncr: non coding region ή 5'-utr: untranslated region), ii) την κωδική

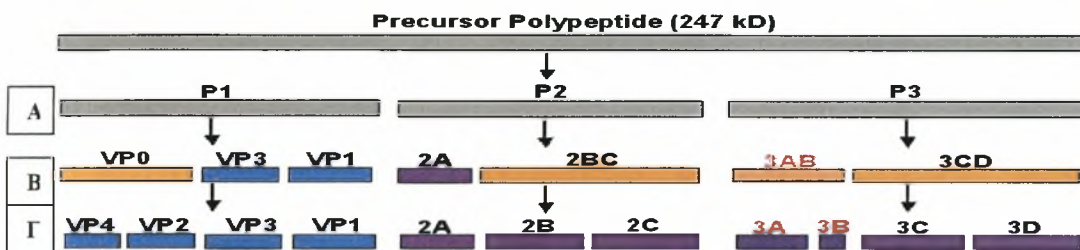
περιοχή της πολυπρωτεΐνης(P1+P2+P3), και iii) την 3'-μη κωδική περιοχή(3'-ncr ή 3'-utr),(Εικόνα 2.1).(Wimmer et al 1999).

Η 5'-μη κωδική περιοχή έχει μεγάλο μήκος αποτελούμενη από 742 νουκλεοτίδια. Αποτελεί το 8-10% του συνολικού μήκους του γενώματος των πολιοϊών, καθώς και γενικά όλων των υπολοίπων Picorna- ιών (Wimmer et al 1999). Είναι μία αρκετά συντηρημένη περιοχή, όπου εμφανίζονται αρκετές δευτεροταγείς δομές χαρακτηριστικές για το κάθε γένος των Picorna- ιών, παρόλο που διαφέρει η σύσταση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας μεταξύ των τύπων ή των υποτύπων του γένους [φαινόμενο συμμεταβλητότητας (covariance), Stanway G., 1990]. Αυτές οι δομές είναι γνωστές ως IRES (internal ribosomal entry site) και cloverleaf (Εικόνα 2.6).(Christopher U.T. Hellen et al 1993). Το στοιχείο, που επιβεβαιώνει την ύπαρξη δευτεροταγών δομών, είναι ότι αυτή η περιοχή είναι πλούσια σε περιεκτικότητα αζωτούχων βάσεων GC (γουανίνη και κυτοσίνη). Όπως θα δούμε και παρακάτω η 5'-μη κωδική περιοχή είναι σημαντική για τη βιωσιμότητα του ιού, αφού είναι σημαντική για την έναρξη της μετάφρασης στον κύκλο της ζωής του ιού (Kauder S. E. and Racaniello V. R., 2004).



Εικόνα 2.6. Η δευτεροταγής δομή της 5'-μη κωδικής περιοχής. Στη θηλιά I (domain I) έχουμε το cloverleaf, που συμμετέχει σε πολλές διεργασίες στον παθογόνο κύκλο του ιού. Το IRES αποτελείται από τις θηλιές II ως VI. Ο ρόλος της θηλιάς VII δεν πλήρως γνωστός. Στην εικόνα δεν φαίνεται η τριπλέτα έναρξης της μετάφρασης (AUG ή GUG) και βρίσκεται περίπου 100nt πιο κάτω (εδώ φαίνονται τα πρώτα 640nt).

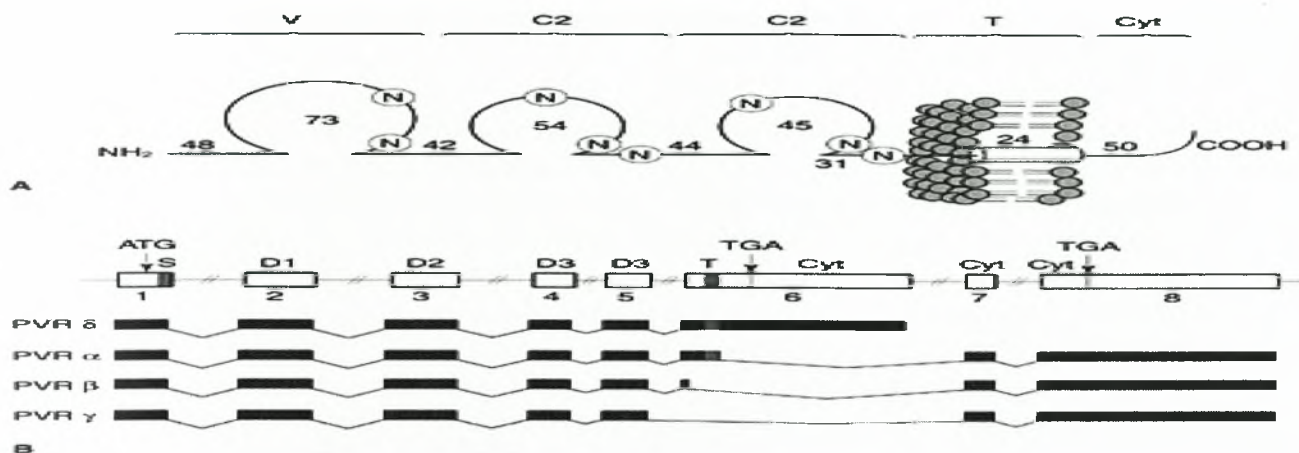
Η κωδική περιοχή ή αλλιώς το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF: open reading frame) αποτελεί το μεταφραζόμενο τμήμα του γενώματος του πολιοϊού. Αυτό σημαίνει ότι αρχικά το θετικής πολικότητας RNA μόριο, που συμπεριφέρεται το ίδιο με το ευκαρυωτικό mRNA (+ πολικότητας) του ξενιστή, μεταφράζεται σε ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο μεγέθους περίπου 247kDa(Εικόνα 2.7). Αυτό το πρόδρομο μόριο διασπάται σε δύο διακριτές περιοχές. Αυτή των δομικών πρωτεϊνών (P1) και αυτή των λειτουργικών πρωτεϊνών (P2 και P3). Στη συνέχεια αυτά τα πρώιμα πολυπεπτίδια διέρχονται από περαιτέρω πρωτεολυτικές διεργασίες, έτσι ώστε στο τέλος να έχουμε τη δημιουργία των τεσσάρων δομικών πρωτεϊνών (Ενότητα 2.2) και των επτά λειτουργικών πρωτεϊνών (Εικόνα 2.7).(Wimmer et al 1999). Βέβαια, εκτός από αυτές τις επτά λειτουργικές πρωτεΐνες, στον κύκλο της ζωής του ιού συμμετέχουν και άλλα πρώιμα πολυπεπτίδια όπως είναι η 2BC, η 3AB και η 3CD^{P10},(Agol et al., 1999)



Εικόνα 2.7. Το πρόδρομο πολυπεπτίδιο της μετάφρασης του ιικού γενώματος και τα προϊόντα της πρωτεόλυσής του. Α) Πρώτη διάσπαση του πρόδρομου πολυπεπτιδίου σε δύο διακριτές περιοχές, σε αυτή των δομικών (P1) και σε αυτή των λειτουργικών (P2 και P3) πρωτεϊνών. Β) Πρωτεολυτική διάσπαση των πρώιμων πολυπεπτιδίων P1, P2 και P3. Γ) Τα τελικά προϊόντα της διεργασίας της πρωτεόλυσης με 4 δομικές και 7 λειτουργικές πρωτεΐνες.

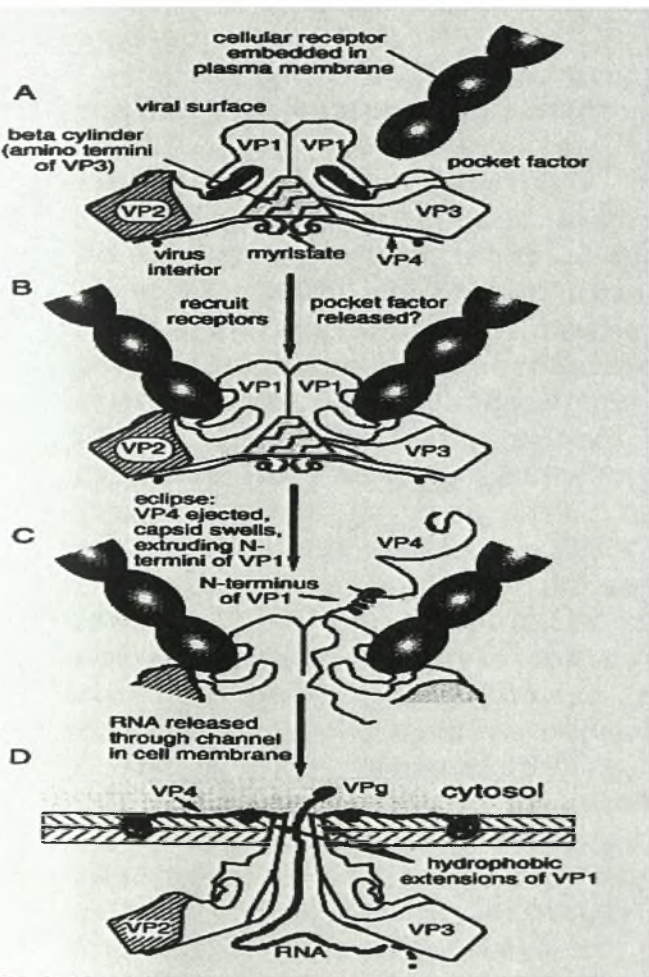
Τέλος, η 3'-μη κωδική περιοχή αποτελείται από 65-70 νουκλεοτίδια περίπου, τα οποία δημιουργούν μία δομή θηλιάς. Αυτή η θηλιά παίρνει μέρος στη σύνθεση της αρνητικής πολικότητας αλυσίδας RNA (Herold J. and Andino R., 2001). Και πιστεύεται ότι αποτελεί σήμα αναγνώρισης, στην αντιγραφή, για τις ιικές πρωτεΐνες που εμπλέκονται σ' αυτή (Pipilenko et al 1992).

εκκρινόμενες (β και γ) και οι άλλες δύο είναι προσκολλημένες στη μεμβράνη (α και δ), οι οποίες είναι οι υποδοχείς του ιού (Εικόνα 3.2, Β). Αυτές οι ισομορφές προκύπτουν από εναλλακτικό μάτισμα κατά τη μεταγραφή του γονιδίου του PVR.



Εικόνα 3.2. Ο υποδοχέας CD155. Α) Η δομή του υποδοχέα. Όπου V η μεταβλητή περιοχή, C η σταθερή περιοχή, T το διαμεμβρανικό τμήμα, Cyt ενδομεμβρανικό τμήμα, και N οι θέσεις γλυκοσυλίωσης. Β) Το γονίδιο του υποδοχέα και οι τέσσερις ισομορφές του.

Οι πολιοϊοί προσδένονται με τον υποδοχέα CD155 με τη βοήθεια μιας δομής του καψιδίου, της αύλακας (Ενότητα 2.2). Όσο οι πολιοϊοί είναι ελεύθεροι ο συντελεστής καθίζησής τους είναι 160S (ανενεργός),(Εικόνα 3.3, Α). Όταν ο ιός προσδεθεί στον υποδοχέα αλλάζει η στερεοδιάταξη του καψιδίου και τα ισωμάτια καλούνται ως A σωματίδια με συντελεστή καθίζησης 135S (ενεργοποιημένος),(Εικόνα 3.3, C). Αυτή η αλλαγή στη στερεοδιάταξη οφείλεται πιθανόν στην αλληλεπίδραση του υποδοχέα με τον υδρόφιλο παράγοντα της αύλακας, τη σφιγγοσίνη (Ενότητα 2.2). Κατά τον σχηματισμό των A σωματιδίων η πρωτεΐνη VP4 και το αμινοτελικό άκρο της VP1 κινούνται εξωτερικά του καψιδίου (Εικόνα 3.3, C). Στη συνέχεια το αμινοτελικό άκρο της VP1 και η VP4 δημιουργούν μία ελικοειδής μορφή, η οποία θα δώσει τη δυνατότητα διάνοιξης καναλιού διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης του ξενιστή έτσι ώστε να ξεκινήσει η είσοδος του ιϊκού RNA (uncoating) στο κυτταρόπλασμα του (Εικόνα 3.3, D),(Simon K. Tsang 2001). Κατά την έξοδο του ιϊκού RNA, το καψίδιο που απομένει έχει συντελεστή καθίζησης 80S.



Εικόνα 3.3. Η πρόσδεση του πολιοϊού στον υποδοχέα PVR και οι αλληλεπιδράσεις που συμβάλλουν στην είσοδο του γενετικού του υλικού (uncoating) στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή.

Τέλος, σημαντικό είναι να αναφέρουμε ότι παρόλο που ο CD155 εκφράζεται από όλους τους κυτταρικούς τύπους, οι πολιοϊοί δεν μπορούν να μολύνουν όλους τους ιστούς. Αυτή η ικανότητα αναφέρεται ως τροπισμός του ιού.

3.2. Μετάφραση του ιϊκού RNA. (Εικόνα 3.1, 2)

Κατά την είσοδο του στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή, το ιϊκό RNA, συμπεριφέρεται αμέσως όπως τα mRNA του ξενιστή λόγω της θετικής του πολικότητας. Έτσι με αυτό τον τρόπο μπορεί να αρχίσει η μετάφραση του γενετικού υλικού του πολιοϊού απευθείας. Πώς γίνεται όμως να ξεκινήσει η διαδικασία της μετάφρασης, αφού το RNA του ιού δεν είναι μεθυλιωμένο στο 5'-άκρο και ούτε διαθέτει κάλυμμα (cap, το οποίο προσδίδει τη μεθυλίωση στο 5'-άκρο με μία μεθυλιωμένη γουανοσίνη που περιέχει); Όπως γνωρίζουμε, πολλοί παράγοντες (διάφορες πρωτεΐνες καθώς και σύμπλοκα πρωτεϊνών) παίρνουν μέρος στην έναρξη της μετάφρασης. Στη μετάφραση των πολιοϊών συμμετέχουν, όπως θα δούμε παρακάτω, και άλλες πρωτεΐνες του κυττάρου, που δεν έχουν καμία σχέση με τον μεταφραστικό μηχανισμό του.

Αρχικά, η VPg αποδεσμεύεται από το RNA του ιού με τη βοήθεια μιας κυτταρικής πρωτεάσης, της VPg-Unlinkase (Gulevich et al., 2001), για να μπορέσει να αρχίσει η μετάφραση. Στην περίπτωση των ευκαρυωτικών mRNAs για την έναρξη της διεργασίας της μετάφρασης ο παράγοντας που παίζει το ρόλο-κλειδί είναι ο eIF4E, ο οποίος προσδέεται στην καλύπτρα (Ochs K. et al., 2002). Εδώ όμως απουσιάζει, αφού το ιϊκό γενετικό υλικό δεν έχει καλύπτρα. Η σύνδεση του ιϊκού RNA αρχικά με την μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα και στην συνέχεια με τη μικρή, επιτυγχάνεται με τη βοήθεια του στοιχείου IRES (Ενότητα 2.3, Εικόνα 2.6) της 5'-μη κωδικής περιοχής. Στο 3'-άκρο του στοιχείου IRES υπάρχει ένα συντηρημένο μοτίβο, το Y_n-X_m-AUG μοτίβο (όπου Y πυριμιδίνη, n=6 έως 8, X οποιοδήποτε νουκλεοτίδιο και m=18 έως 20) (Ehrenfeld E. και Semler B. L. 1995), το οποίο είναι σημαντικό για την έναρξη της μετάφρασης. Η τριπλέτα AUG του μοτίβου δεν είναι το πραγματικό εναρκτήριο κωδικόνιο, βρίσκεται αριστερά αυτού (περίπου 100nt) και όντας σιωπηλό, βοηθάει το ριβόσωμα να αναγνωρίσει το πραγματικό κωδικόνιο έναρξης κατά τη σάρωση του RNA (Pestova, T. V., C. U. Hellen, και E. Wimmer 1994).

Όλος ο κυτταρικός μεταφραστικός μηχανισμός συμμετέχει, εκτός του προαναφερθέντα παράγοντα eIF4E. Δηλαδή, ο παράγοντας eIFGI προσδέεται στο θετικής πολικότητας ιϊκό RNA και έτσι ξεκινάει η δημιουργία εναρκτήριου μεταφραστικού συμπλόκου, του eIF4. Αυτό το σύμπλοκο εμπεριέχει και τους παράγοντες eIF4A και eIF4B (Kerstin Ochs et al 2002), οι οποίοι αλληλεπιδρούν με παράγοντες που είναι ενωμένοι στην μικρή υπομονάδα. Και έτσι τελικά δημιουργείται το 48S ριβοσωμικό

σύμπλοκο που σαρώνει το ιϊκό RNA μέχρι το εναρκτήριο κωδικόνιο ώστε να ξεκινήσει η πρωτεϊνοσύνθεση (Deborah Prevot et al 2003).

Όπως προαναφέραμε όμως, στη μετάφραση του ιϊκού RNA συμμετέχουν και άλλοι παράγοντες. Σ' αυτούς ανήκουν οι πρωτεΐνες: η PTB (Polypyrimidine Tract-Binding protein), η La (La auto antigen), η poly(rC) πρωτεΐνη, PCBP(Poly(rC) Binding Protein), η Unr (Upstream of N-Ras) (Murray et al, 2001; Oreda Boussadia et al., 2003), οι οποίες προσδέονται στο RNA, και η ITAF₄₅(που παίρνει μέρος στον κυτταρικό κύκλο του ξενιστή). Ο ρόλος αυτών των πρωτεϊνών πιστεύεται ότι είναι η προαγωγή της κατάλληλης διαμόρφωσης του IRES ώστε να ξεκινήσει η δημιουργία του μεταφραστικού συμπλόκου.

Πώς όμως ο ιός καταφέρνει με τη σύγχρονη μετάφραση του δικού του γενετικού υλικού να σταματάει όλες τις πρωτεϊνοσυνθετικές διεργασίες του ξενιστή; Αυτό συμβαίνει για δύο κύριους λόγους. Πρώτον, λόγω της πρωτεόλυσης των μεταφραστικών παραγόντων eIF4GI (σημαντικός για την 5'-cap εξαρτώμενη μετάφραση) και eIF4GII από την πρωτεάση 2A^{Pro} του ιού. Και δεύτερον, λόγω της πρωτεόλυσης της πρωτεΐνης PABP (poly(A) binding protein), σημαντική για τον μηχανισμό της μετάφρασης για τα ευκαρυωτικά κύτταρα, από την ιϊκή πρωτεάση 3C^{Pro}.(N. Muge et al 2004)

3.3. Πρωτεολυτική διάσπαση της πολυπρωτεΐνης των πολιοϊών. (Εικόνα 3.1, 3)

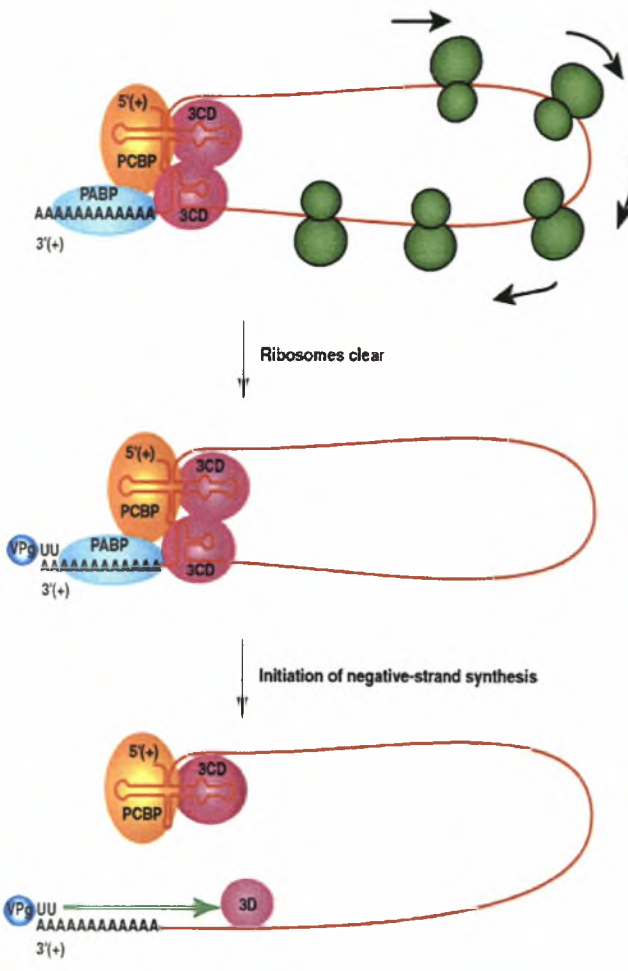
Από τη μετάφραση του γενετικού υλικού του ιού δημιουργείται η ιϊκή πολυπρωτεΐνη (Ενότητα 2.2), η οποία στην πορεία θα πρωτεολυθεί ώστε να προκύψουν όλες τις ιϊκές πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό του ιού και για τη βιωσιμότητά του. Αυτή την πρωτεολυτική διεργασία μπορούμε να την διαχωρίσουμε σε τρία στάδια. Στο πρώτο στάδιο έχουμε τη διάσπαση της πολυπρωτεΐνης στην περιοχή της P1 και στις περιοχές P2 και P3 που γίνεται με τη δράση της ιϊκής πρωτεάσης 2A^{Pro}. Στο δεύτερο στάδιο έχουμε την πρωτεόλυση όλων των περιοχών από τις ιϊκές πρωτεάσες 3C^{Pro} και 3CD^{Pro}, παίρνοντας ως προϊόντα, τις δομικές πρωτεΐνες VP0, VP1 και VP3 καθώς και όλες τις λειτουργικές πρωτεΐνες και τις ενδιάμεσες μορφές αυτών (Ενότητα 2.2, Εικόνα 2.7.). Το τρίτο στάδιο περιλαμβάνει κυρίως τη διάσπαση της VP0 στις δομικές πρωτεΐνες VP4 και VP2. Τέλος αξίζει να επισημάνουμε ότι κατά τη διάρκεια της πρωτεόλυσης σε όλα τα στάδια παρατηρείται η σύνδεση του μυριστικού οξέος με το αμινοτελικό άκρο όλων των πολυπεπτιδίων (Wimmer et al 1999).

3.4. Αντιγραφή του ιϊκού γενώματος (Εικόνα 3.1, 4).

Η διαδικασία της αντιγραφής λαμβάνει χώρα στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) του ξενιστή, όπου συμμετέχουν όλες οι ιϊκές πρωτεΐνες καθώς και κυτταρικές πρωτεΐνες του ξενιστή. Πώς ξέρει όμως το γενετικό υλικό του ιού πότε θα σταματήσει τη διεργασία της μετάφρασης και πότε θα ξεκινήσει την αντιγραφή; Αυτός ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ιικών λειτουργιών επιτυγχάνεται από τη δομή cloverleaf (88nt) που είναι στο 5'-άκρο καθώς και από τη δράση ιϊκών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα πιστεύεται ότι το 5'-cloverleaf είναι ο γενικός ρυθμιστής αυτών των διεργασιών και αυτό επιτυγχάνεται ανάλογα με ποιες πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένος κάθε φορά σε αυτό (D. J. Barton et al 2001, R. Andino, 2001).

Έτσι όταν προσδένονται στο cloverleaf οι πρωτεΐνες, 3CD και poly(rC) πρωτεΐνη PCBP (Poly(rC) Binding Protein), παίρνει διαμόρφωση cis με επακόλουθη διακοπή της μετάφρασης και έναρξη της αντιγραφής (Εικόνα 3.4) (J.B.Flanegan et al.1996; R.Andino et al 2001; D.J.Barton et al 2001).

Για την αντιγραφή απαιτείται η παρουσία αρκετών ιϊκών πρωτεϊνών στις εστίες αντιγραφής. Αυτό επιτυγχάνεται από τη δράση των ιϊκών πρωτεϊνών, 2B, 2BC, 3A και 3AB. Αναλυτικότερα, η 2B αυξάνει τη διαπερατότητα των μεμβρανών του ΕΔ σε ιόντα (Ca^{+2}) και σε μικρού μοριακού βάρους μόρια, όπως είναι η ουριδίνη, ώστε η απόδοση της αντιγραφής να είναι η βέλτιστη (Angel Bargo et al 1998). Η 2BC και η 3A επειδή προσδένονται στις μεμβράνες του ΕΔ έχουν την ικανότητα να αλλάζουν τη διάταξή τους, έτσι ώστε να διακόπτουν τη μεταφορά των ιϊκών πρωτεϊνών από το ΕΔ προς τη συσκευή Golgi (Christy Jurgens 2003; Doedens et al., 1997).), και συγχρόνως δημιουργούν κυστίδια πάνω στα οποία θα γίνει η αντιγραφή (Εικόνα 3.6). Τέλος, η 3AB έχει τις ικανότητες πρόσδεσης με το RNA και αύξησης της δραστηριότητας των πρωτεϊνών 3CD^{PO} και 3D^{POI} (J. M. Lyle et al 2002).

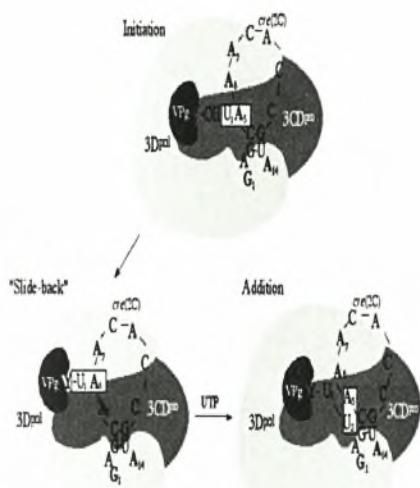


Εικόνα 3.4. Μοντέλο σύνθεσης του αρνητικής πολικότητας μορίου RNA. Αρχικά έχουμε την πρόσδεση όλων των απαραίτητων παραγόντων στο cloverleaf για τη διακοπή της μετάφρασης. Μετά προσδένεται ο primer της 3D^{POI}, δηλαδή η VPg. Και ξεκινάει η αντιγραφή.(εικόνα από D.J. Barton et al, 2001)

Το γενετικό υλικό των πολιοϊών και γενικά όλων των Picorna-
ϊών, όπως γνωρίζουμε είναι ένα μονόκλωνο θετικής πολικότητας
RNA μόριο. Επομένως τη διαδικασία της αντιγραφής του μπορούμε
να τη διακρίνουμε σε δύο στάδια. Στο πρώτο έχουμε την αντιγραφή
του ιϊκού RNA στο αντίστοιχο ιικό RNA αρνητικής (-)
πολικότητας (Εικόνα 3.4 και 3.6). Το αρνητικής πολικότητας μόριο
θα χρησιμοποιηθεί αργότερα ως εκμαγείο για την παραγωγή μορίων
RNA (+) πολικότητας (Kirkegaard et al, 1991; D.J. Barton, 2003).

Στο πρώτο στάδιο έχουμε την κυκλοποίηση του μορίου, η
οποία γίνεται από την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών, 3CD, PCBP
και PABP, καθώς και των ιϊκών δομών, 5'-cloverleaf και 3'-utr
(διακοπή της μετάφρασης, Εικόνα 3.4). Στη συνέχεια έχουμε τη
πρόσδεση της VPg στο 3'-άκρο με τη βοήθεια της PABP. Η VPg
στην πορεία θα χρησιμοποιηθεί από την πολυμεράση του ιού
(3D^{pol}) ως εκκινητικό μόριο. Επίσης σημαντική είναι και η δράση
της 2C^{ATPase} για την έναρξη της αντιγραφής καθώς και για την
ουριδιλίωση της VPg (βλέπε παρακάτω). Έτσι με αυτό τον τρόπο
ξεκινάει η σύνθεση του (-) πολικότητας μορίου. Τέλος, θα πρέπει
να επισημάνουμε ότι από την έναρξη της δράσης της πολυμεράσης
όλοι οι υπόλοιποι παράγοντες απομακρύνονται από το 3'-άκρο,
έτσι ώστε η σύνθεση να μην είναι συνεχής και συγχρόνως να είναι
εφικτή η ουριδιλίωση πρωτεϊνών VPg από την 3D^{pol}, όπου στην
πορεία τα προϊόντα αυτών θα τα χρησιμοποιήσει ως εκκινητές για
τη σύνθεση του (+) πολικότητας RNA μορίου (Εικόνες 3.5 και
3.6). (D.J. Barton, 2003)

Η παραγωγή της ουριδιλιωμένης VPg
(VPgpUpU_{OH}) γίνεται με τη βοήθεια μίας
δευτεροταγούς δομής του πολιοϊικού
γενώματος που εδράζει στο 2C κωδικόνιο (P.
F. Stadler et al, 2001). Αυτή η δομή
ονομάζεται CRE (Cis Response Element) και
χρησιμοποιείται αυτή, και όχι η πολύ(A)
ουρά, ως εκμαγείο για την ουριδιλίωση της
3B πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα το CRE
σχηματίζει μία θηλιά η οποία αποτελείται
από 61nt. Στην κορυφή της θηλιάς (hairpin)
υπάρχει μια συντηρημένη νουκλεοτιδική
περιοχή, η ¹ GXXXAAAXXXXXXA ¹⁴
(Lemon et al, 2002; Rieder et al, 2002). Την
κυριότερη σημασία σε αυτή τη δομή έχει το
νουκλεοτίδιο A-5, το οποίο χρησιμοποιείται
σαν εκμαγείο για την προσθήκη και των δύο
μορίων ουρακίλης, με τη δράση της 3D^{pol},
στην υδροξυλική ομάδα του κατάλοιπου
τυροσίνης (Y) της VPg. Αυτό επιτυγχάνεται
λόγω του 'slide back' μηχανισμού (Εικόνα
3.5), (Wimmer et al, 2003). Τέλος, έχει
υπολογιστεί ότι κατά τη διάρκεια της
σύνθεσης της αρνητικής πολικότητας
αλυσίδας παράγονται περίπου 500 μόρια
VPgpUpU_{OH} και ότι 90% από αυτά τελικά



Εικόνα 3.5. Μοντέλο του 'slide back' μηχανισμού. Η 3D^{pol} συνδέεται με το CRE (Wimmer, 1994; Cameron, 2002) και διεγείρει την πρόσδεση της 3D^{pol}. Σ' αυτό το σύμπλοκο συνδέεται και η 3B (VPg). Αρχικά προσδένεται ένα μόριο ουρακίλης στο ελεύθερο υδροξύλιο του κατάλοιπου τυροσίνης (Y) της 3B, έχοντας ως πρότυπο το A-5. Το παραγόμενο VPgpU σχηματίζει δεσμό υδρογόνου με A-6 (slide back) και έτσι προστίθεται και το δεύτερο μόριο ουρακίλης έχοντας πάλι ως πρότυπο το A-5. (εικόνα από A.V. Paul,

δεν θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητές (D.J. Barton, 2003).

Όταν ολοκληρωθεί και η σύνθεση της (-)RNA αλυσίδας, τότε ο ιός είναι έτοιμος για να συνθέσει την αντίστοιχη θετικής πολικότητας. Έχει βρεθεί ότι παράγονται 20 με 50 αντίγραφα θετικής πολικότητας ανά ένα αρνητικής (Kirkeggard, 1991; D.J. Barton, 2003). Για αυτή την ασυμμετρία της σύνθεσης των δύο αλυσίδων διαφορετικής πολικότητας πιθανολογείται ότι ευθύνεται η απόσταση της δομής του CRE από το 3'-άκρο.

Τέλος, θα πρέπει να επισημάνουμε την κρισιμότητα του μήκους της πολύ(A) ουράς που έχει στη διαδικασία της αντιγραφής. Όσο το μήκος της παραμένει ακέραιο τόσο βέλτιστη είναι και η απόδοση της αντιγραφής. Όταν όμως για διάφορους λόγους είναι μικρότερο τότε μειώνεται η απόδοσή της (Sarnow, 1989; Raju, 1999; Tsai, 1999; Spagnolo και Hogue, 2000).

3.5. Καψιδίωση του RNA και απελευθέρωση των ιϊκών σωματιδίων (Εικόνα 3.1, 5).

Η καψιδίωση του RNA πρέπει να είναι συνυφασμένη με τη διαδικασία της αντιγραφής, λόγω του ότι και οι δύο διεργασίες γίνονται πάνω στα ίδια, επαγόμενα από τον ιό, μεμβρανικά κυστίδια (Ansardi et al. 1996; Constance I. Nugent 1998).

Αρχικά, έχουμε τη δημιουργία του προκαψιδίου, το οποίο αποτελείται από 12 πενταμερή. Το κάθε πενταμερές αποτελείται από τα πρωτομέρη VP0, VP3 και VP1. Οι δομικές αυτές πρωτεΐνες προέρχονται από την πρωτεόλυση της περιοχής P1 (Ενότητα 3.3). Έχει αποδειχτεί ότι τα πενταμερή (με συντελεστή καθίζησης 14S) του προκαψιδίου μπορούν να προσδέσουν πάνω τους μόρια RNA (Verliden et al., 2000). Με αυτή την αλληλεπίδραση πιστεύεται ότι το ιϊκό γενετικό υλικό εσωκλείεται από 12 πενταμερή δημιουργώντας το πρώιμο ιϊκό στέλεχος (provirion). Στην πορεία έχουμε την αυτοκαταλυτική διάσπαση της VP0 στις πρωτεΐνες VP4 και VP2 και έτσι έχουμε πλέον τη δημιουργία του ώριμου πλέον ιϊκού σωματιδίου με 160S. Τώρα, πλέον ο ιός εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερότητα και μπορεί να είναι μολυσματικός, όπως και ο πρόγονός του (Wimmer et al 1999).

Εν κατακλείδι, το ώριμο πλέον ιϊκό σωματίδιο απελευθερώνεται με τη λύση του κύτταρου-ξενιστή (κυτταρικό θάνατο).

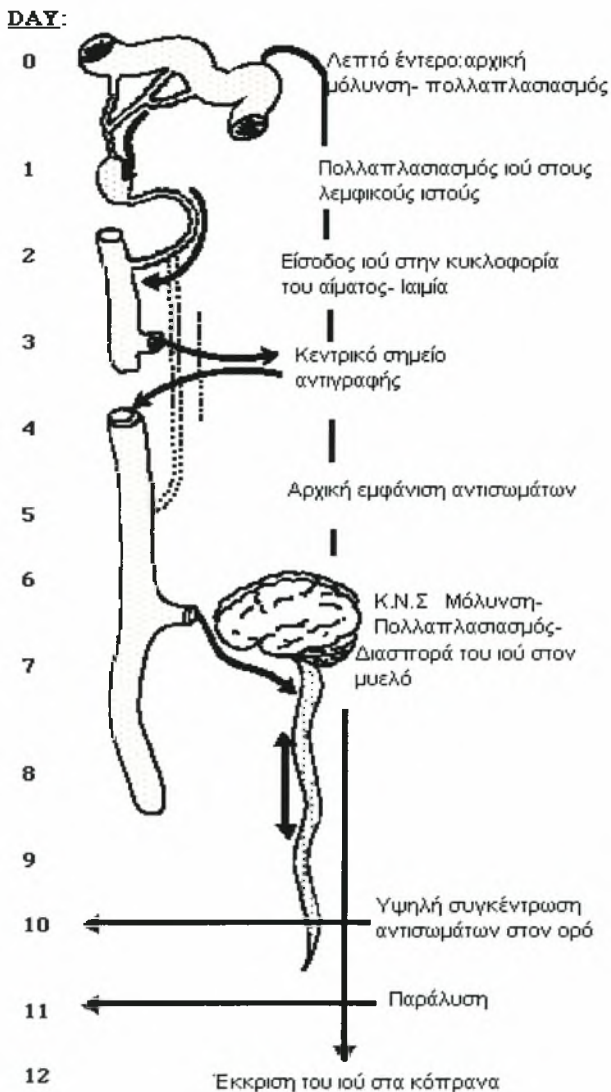
4. Παθογένεια.

Οι πολιοϊοί εισάγονται στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω της στοματικής κοιλότητας. Από εκεί ακολουθώντας τη ροή του πεπτικού συστήματος φτάνουν στο φάρυγγα και στο λεπτό έντερο, όπου εκεί πραγματοποιείται το αρχικό στάδιο μόλυνσης του οργανισμού από τους ιούς. Έτσι από το εντερικό επιθήλιο καταφέρνουν να περάσουν στην κυκλοφορία του αίματος προκαλώντας μία ήπια ιαιμία. Από την κυκλοφορία του αίματος καταφέρνουν να μετακινηθούν και σε άλλους ιστούς, επιμολύνοντας μόνο όσα κύτταρα εκφράζουν τον υποδοχέα CD155 (Ενότητα 3.1). Τέτοια κύτταρα βρίσκονται στους λεμφαδένες και στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Συγκεκριμένα τα κύτταρα του ΚΝΣ δεν καταστρέφονται όλα από έκθεση σε πολιοϊούς, καταστρέφονται κυρίως οι κινητήριοι νευρώνες (όχι όμως οι

αντίστοιχοι του περιφερικού νευρικού συστήματος). Οι πολιοϊοί δεν προσβάλλουν τα μυϊκά κύτταρα.

Μετά την είσοδό τους στον ανθρώπινο οργανισμό, η περίοδος επώασης τους κυμαίνεται μεταξύ 7 και 14 ημερών ή και σε μερικές περιπτώσεις μεταξύ 2 και 35 ημερών (Melnick, 1996). Σ' αυτή την περίοδο μπορεί να γίνει η εμφάνιση των πρώτων συμπτωμάτων ή και όχι. Άνθρωποι που έχουν μολυνθεί από τον ιό και δεν εμφανίζουν συμπτώματα μπορούν να τον μεταδώσουν στο κοντινό κοινωνικό τους σύνολο (Melnick, 1996; CDC, 2002).

Τέλος, η έκταση της μόλυνσης του ανθρώπου από πολιοϊούς εξαρτάται εξολοκλήρου από την ανοσολογική απάντηση του εκάστοτε ατόμου.



Εικόνα 4.1. Απεικόνιση της πορείας των πολιοϊών από την είσοδό τους στον άνθρωπο και στο ΚΝΣ αυτού με τελικό αποτέλεσμα την πρόκληση της ασθένειας.

5. Κλινικά χαρακτηριστικά.

Η απόκριση του κάθε οργανισμού σε μόλυνση από πολιοϊούς ποικίλει και για αυτό το λόγο κατηγοριοποιούνται ανάλογα με την εκάστοτε κλινική εκδήλωση (CDC, 2002). Το 90 % των μολύνσεων από αγρίου τύπου πολιοϊό είναι ασυμπτωματικές (Rotbart, 1997). Έτσι εκτός από τις ασυμπτωματικές περιπτώσεις, οι υπόλοιπες διακρίνονται σε τρία κλινικά σύνδρομα: i) την «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα, ii) την ασηπτική μηνιγγίτιδα, και iii) την παραλυτική πολιομυελίτιδα (Melnick, 1996; Zaoutis και Klein, 1998). Κατά την πρόοδο της μόλυνσης μπορεί μία μικρή εκδήλωση της ασθένειας να ακολουθηθεί απότομα από μία μεγαλύτερη. Αν και αυτές οι διφασικές εκδηλώσεις εμφανίζονται κυρίως σε μικρά παιδιά και νήπια παρά σε ενήλικες (Melnick, 1996; Rotbart, 1997).

Το σύνδρομο της «αποτυχημένης» πολιομυελίτιδας (abortive poliomyelitis) αποτελεί το 4% - 8% των μολυσματικών περιπτώσεων και δεν υπάρχουν κλινικές ή εργαστηριακές ενδείξεις για προσβολή του ΚΝΣ (CDC, 2002). Οι κλινικές εκδηλώσεις αυτού του συνδρόμου επικεντρώνονται κυρίως στο άνω αναπνευστικό σύστημα (με φαρυγγίτιδα και πυρετό) και στο γαστρεντερικό σύστημα (με ναυτία, διάρροια, πόνους στο υπογάστριο και εμετούς). Δηλαδή με εκδηλώσεις όμοιες με αυτές της απλής γρίπης (CDC, 2002). Περίπου το 10% των ασθενών με «αποτυχημένη» πολιομυελίτιδα αναπτύσσουν ασηπτική μηνιγγίτιδα (aseptic meningitis) που είναι μια μη παραλυτική πολιομυελίτιδα. Αυτό το σύνδρομο μπορεί να προκληθεί και από άλλους ιούς του γένους των εντεροϊών εκτός των πολιοϊών (NPEVs: non-polio enteroviruses). Τα συμπτώματα για αυτό το σύνδρομο διαρκούν μεταξύ 2 και 10 ημερών και διακρίνονται από ακαμψία του λαιμού, της πλάτης και των κάτω άκρων. Ακολουθείται πλήρης ανάκαμψη του οργανισμού (Rotbart, 1997; CDC, 2002).

Λιγότερο από το 2% των ασθενών παρουσιάζουν μια άτονη παράλυση, η οποία ακολουθείται από μία μικρή ασυμπτωματική περίοδο (2 με 3 μέρες). Ξαφνικά, όμως παρουσιάζεται μία ασύμμετρη παράλυση χωρίς μεγάλες αισθητήριες απώλειες, δηλαδή χαρακτηριστικά της παραλυτικής ασθένειας (Zaoutis και Klein, 1998). Κατά την παράλυση έχουμε την εμφάνιση σοβαρής μυαλγίας σε μυϊκές ομάδες. Σε αυτές τις ομάδες παρατηρούνται κινητήριες και αισθητήριες διαταραχές (Rotbart, 1997).

Την παραλυτική πολιομυελίτιδα μπορούμε να τη διακρίνουμε σε τρεις τύπους ανάλογα με το βαθμό της παράλυσης που εμφανίζεται κάθε φορά. Έτσι, στον πρώτο τύπο έχουμε τη νωτιαία παράλυση (spinal paralysis), η οποία χαρακτηρίζεται από ασύμμετρη παράλυση των κάτω άκρων. Στον δεύτερο τύπο έχουμε τη βολβοειδή πολιομυελίτιδα, όπου έχουν μολυνθεί νευρώνες του ΚΝΣ, και χαρακτηρίζεται από δυσλειτουργίες στην αναπνοή, στη διάρθρωση της ομιλίας, στη κίνηση του οφθαλμού, καθώς και στην κίνηση διαφόρων μυϊκών ομάδων. Στον τρίτο τύπο έχουμε τον συνδυασμό των δύο προαναφερθέντων τύπων (bulbospinal paralysis) και συγκεκριμένα στις Ηνωμένες Πολιτείες κατά την

χρονική περίοδο 1969 - 1979 αποτελούσε το 19% των περιπτώσεων παραλυτικής ασθένειας (Rotbart, 1997; Melnick, 1996; CDC, 2002). Τέλος, στην παρακάτω εικόνα παρατείθονται μερικά από τα συμπτώματα της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

Signs and Symptoms	Poliomyelitis
Fever at onset	Yes
Meningeal irritation	Ususally
Muscle Pain	Severe
Paralysis	Ususally asymmetric
Progression of Paralysis	3-4 days
Residual paralysis	Ususally
Paresthesis	Rare
Sensation	Normal
Tendon Reflexes	Diminished or absent
Spinal fluid at onset	WBC high; protein normal to 25% increase
Case fatality	2-20%

Εικόνα 5.1. Κλινικές εκδηλώσεις της παραλυτικής πολιομυελίτιδας.

6. Επιδημιολογία.

Η πολιομυελίτιδα όπως προαναφέραμε (Ενότητες 1.1 και 1.2) είναι μία ασθένεια που προκάλεσε το ενδιαφέρον των ανθρώπων από πολύ παλιά.

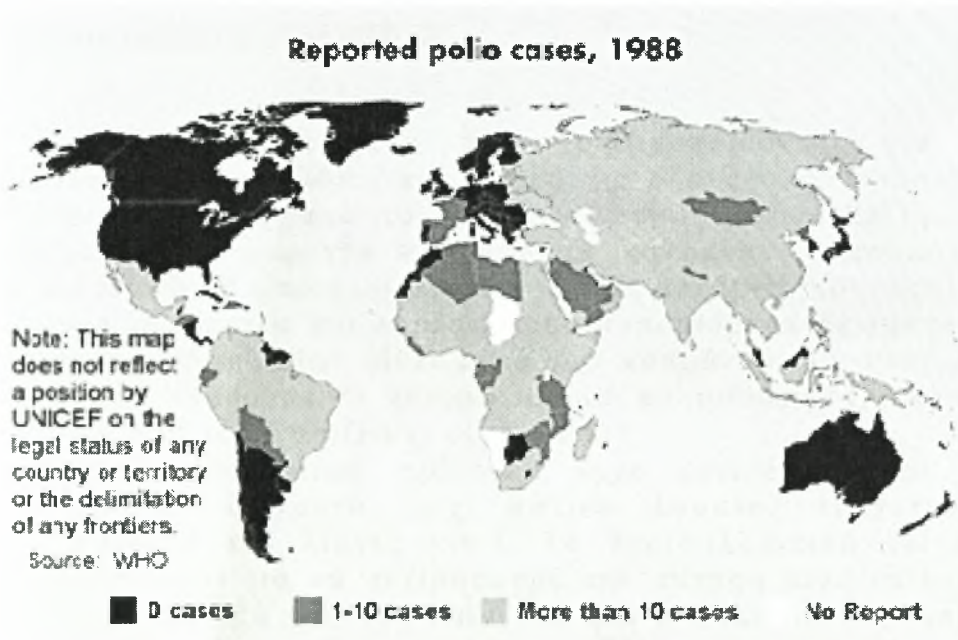
Το 1789, ο Michael Underwood στη Μεγάλη Βρετανία περιγράφει για πρώτη φορά τα συμπτώματα της πολιομυελίτιδας σε μικρά παιδιά (CDC, 2002). Εντωμεταξύ οι πρώτες αναφορές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία για ξέσπασμα επιδημίας πολιομυελίτιδας εντοπίζονται στις αρχές του 19^{ου} αιώνα στην Ευρώπη (Σουηδία) και στη Βόρεια Αμερική. Αυτές οι επιδημίες άρχισαν να αυξάνονται με μεγάλη συχνότητα και σοβαρότητα, χωρίς να κάνουν διακρίσεις σε φύλο και ηλικία. Έτσι άρχισαν να παρουσιάζονται και περιπτώσεις παράλυσης σε έφηβους και νεαρούς ενήλικες. Αυτό μάλλον ήταν αποτέλεσμα ανοσοανεπάρκειας, διότι τα παιδιά έρχονταν σε επαφή με τον ιό σε ηλικία, όπου τα μητρικά αντισώματα που είχαν λάβει κατά την κύηση και θηλασμό, είχαν πλέον εξαλειφθεί από τον οργανισμό τους (Minor, 1999).

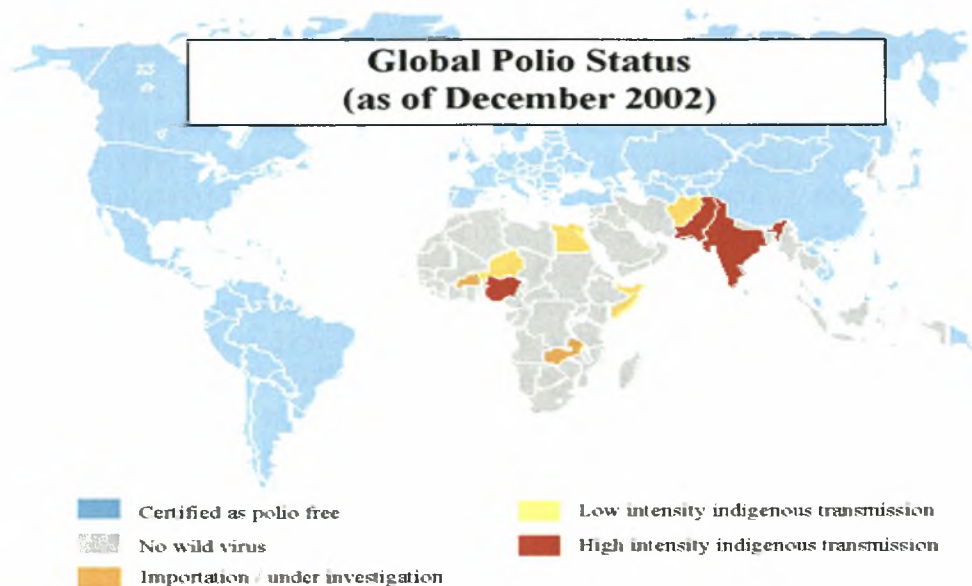
Στο πρώτο μισό του 20^{ου} αιώνα ξέσπασαν μεγάλες επιδημίες ανά τον κόσμο. Παραδείγματος χάριν, το καλοκαίρι του 1916 στις Ηνωμένες Πολιτείες είχε αναφερθεί ότι πάνω από 27000 άνθρωποι έμειναν παράλυτοι και 6000 πέθαναν (Melnick, 1996). Ενώ, στην ίδια χώρα είχαμε πάλι ένα κρούσμα το 1952 με 21000 ασθενείς με παραλυτική πολιομυελίτιδα (CDC, 2002).

Με την ανακάλυψη όμως των εμβολίων μειώνονται δραματικά τα περιστατικά παραλυτικής πολιομυελίτιδας ανά τον κόσμο (Wood et al, 2000; Cherkasova et al, 2002). Συγκεκριμένα, έχουμε δύο τύπους εμβολίων: i) το OPV (Oral Polio Vaccine) που ανακάλυψε ο Sabin, και ii) το IPV (Inactive Polio Vaccine) που ανακάλυψε ο Salk. Από τα δύο αυτά εμβόλια χρησιμοποιήθηκε εκτενέστερα το OPV. Αυτό έγινε, διότι είχε την ικανότητα να προσδίδει μεγαλύτερης διάρκειας ανοσοεπάρκεια μέσω της χυμικής ανοσίας. Η χορήγησή του ήταν πολύ απλή και εύκολη, αφού γίνεται δια του στόματος, και μπορούσε να εκπληρωθεί και από μη εξειδικευμένο προσωπικό. Και τέλος, είχε πολύ χαμηλό κόστος. Έτσι με αυτό τον τρόπο το συγκεκριμένο εμβόλιο έγινε ο κύριος υποψήφιος για την καμπάνια της εξάλειψης της πολιομυελίτιδας (poliomyelitis eradication initiative: PEI) για όλο τον κόσμο (Kew et al, 2004).

Έτσι το 1988 η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (World Health Organization: WHO) κάνοντας χρήση το OPV, ξεκινάει με στόχο την πλήρη εξάλειψη των αγρίου τύπου πολιοϊών σε όλο τον κόσμο μέχρι το 2005 (WHO, 2004). Με το τέλος του 2002 (Εικόνα 6.1), ο αριθμός των περιστατικών αγρίου τύπου πολιοϊών από 350000 που ήταν μειώθηκαν σε λιγότερο από 500 και ο αριθμός των ενδημικών χωρών από 125 σε 7 (Wood και Thorley, 2003; WHO, 2004). Την ίδια περίοδο έχουμε τη διακοπή της μετάδοσης της ασθένειας σε Ευρώπη, Αμερική, Ασία και σε περιοχές του Δυτικού Ειρηνικού Ωκεανού και 180 χώρες ανακηρύσσονται ως ελεύθερες από πολιοϊούς (polio-free). Το τελευταίο περιστατικό, που προκλήθηκε από αγρίου τύπου πολιοϊό, έχει αναφερθεί στη Νότια Αφρική το 1989 (CDC, 2003). Παρόλο αυτά, τα τελευταία χρόνια έχουν ξεσπάσει κρούσματα επιδημίας σε χώρες της Αφρικής (π.χ. Γουινέα, Μαλί, Μποτσουάνα και Σουδάν), (ProMED-mail, 2004).

Δ





Εικόνα 6.1. Στο πάνω μέρος της εικόνας απεικονίζεται η κατάσταση που επικρατούσε μέχρι το 1988. Ενώ στο κάτω τμήμα της εικόνας που έχει δοθεί από την Π.Ο.Υ. φαίνεται ποιες χώρες είναι πιστοποιημένες πλέον ως απελευθερωμένες από την ασθένεια, καθώς και ποιες χώρες αντιμετωπίζουν ακόμα πρόβλημα σύμφωνα με τα απογραφόμενα δεδομένα του 2002.

7. Εργαστηριακή διάγνωση.

Η Εργαστηριακή διάγνωση μπορεί να γίνει είτε μακροσκοπικά, είτε μικροσκοπικά. Έτσι στην πρώτη κατηγορία έχουμε τις μεθόδους: α) της απομόνωσης των πολιοϊών, β) της οροτυπικής ταυτοποίησης, και γ) του ελέγχου με αντισώματα. Ενώ στη δεύτερη συγκαταλέγονται οι μοριακές μέθοδοι διάγνωσης και ταυτοποίησης των πολιοϊών.

7.1. Απομόνωση των πολιοϊών.

Τα κλινικά δείγματα που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των πολιοϊών, και γενικά για όλους τους εντεροϊούς, λαμβάνονται κυρίως από το εγκεφαλονωτιαίο υγρό (ΕΝΥ), από επιχρίσματα του φάρυγγα και από τα κόπρανα. Η απομόνωση πολιοϊών από ΕΝΥ αποτελεί την πιο ισχυρή απόδειξη λοίμωξης. Αν και τα πιο αξιόπιστα και ευρέως χρησιμοποιούμενα δείγματα για την απομόνωση πολιοϊών είναι αυτά των κοπράνων. Συγκεκριμένα στα κόπρανα μπορούμε να απομονώσουμε πολιοϊούς μέχρι και 2-3 μήνες μετά την μόλυνση (Hovi et al, 2001).

Επίσης απομόνωση πολιοϊών έχει επιτευχθεί και απο περιβαλλοντικά δείγματα (π.χ. αστικά λύματα, αποχετευτικά ύδατα, ποτάμια και λίμνες κ.α.). Τα περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουμε την έκταση μιας επιδημίας σε αναλογία μεταξύ των ασθενών και του συνολικού πληθυσμού. Έχει προταθεί, ότι ο έλεγχος του περιβάλλοντος σε καθημερινή

βάση είναι μια αξιόπιστη μέθοδος ανίχνευσης αγρίου τύπου PVs και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της εξάλειψής τους σε κοινωνίες όπου χρησιμοποιείται ακόμα το OPV (Manor et al, 1999; Horie et al, 2002).

Για την απομόνωση των πολιοϊών χρησιμοποιούνται διάφορες κυτταρικές σειρές. Δεν υποστηρίζεται όμως σε όλες τις κυτταρικές σειρές παρόμοια ανάπτυξη πολιοϊών. Έτσι έχουμε τις κυτταρικές σειρές L20B που προέρχονται από ποντίκια, τα οποία έχουν τροποποιηθεί γενετικά για να εκφράζουν τον ανθρώπινο PVR, και παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία για τους πολιοϊούς (Wood Hull, 1999; WHO, 2004). Επίσης, χρησιμοποιούνται και ανθρώπινες κυτταρικές σειρές του ραβδομυοσαρκώματος (RD κύτταρα) και του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (Her-2 κύτταρα).

Ένδειξη της απομόνωσης πολιοϊών από τα δείγματά παρουσιάζεται μέσω της κυτταροπαθογόνου δράσης των ιών (CPE: Cytopathogenic effect).

7.2. Οροτυπική ταυτοποίηση.

Μετά την απομόνωση των πολιοϊών, ακολουθεί η οροτυπική ταυτοποίηση που καθορίζεται με εξουδετέρωση με ειδικό αντιορό για τον κάθε ορότυπο (Muir et al., 1998). Έτσι, χρησιμοποιούμε ένα τεστ εξουδετέρωσης, το οποίο φέρει ένα σετ εξειδικευμένων πολυκλωνικών αντιορών, ξεχωριστά, για τον κάθε τύπο των πολιοϊών (Van der Avoort et al, 1995; WHO, 2002). Ο αντιορός, που καταφέρνει να διακόψει την κυτταρο-παθογόνο δράση (CPE), μας αποδίδει τον τύπο του πολιοϊού.

Τέτοιοι αντιοροί έχουν δημιουργηθεί από το Εθνικό Ινστιτούτο Δημόσιας Υγείας και Περιβάλλοντος (RIVM), στην Ολλανδία, και προμηθεύονται από την Π.Ο.Υ. και προμηθεύονται σε όλα τα εργαστήρια του δικτύου της οργάνωσης (WHO, 2002).

7.3. Έλεγχος με αντισώματα.

Ο έλεγχος αυτός βασίζεται κυρίως στη μέθοδο της ELISA και συγκεκριμένα προσδιορίζονται αντισώματα IgM ειδικά για πολιοϊούς. Όπως γνωρίζουμε, αυτά τα αντισώματα ανήκουν στην πρώτη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε έκθεση σε οποιοδήποτε ιό. Έτσι, αυτός ο τρόπος διάγνωσης ενδείκνυται για πρόσφατες μολύνσεις από πολιοϊούς (Muir et al, 1998), (επίσης μπορούν και IgG να εφαρμοστούν).

7.4. Μέθοδοι μοριακής διάγνωσης.

Επειδή, οι προαναφερθείσες τεχνικές ήταν χρονοβόρες, πολυέξοδες και με μικρή ευαισθησία, κρίθηκε επιτακτική η χρήση τεχνικών που θα υπερσκελίζουν αυτά τα προβλήματα. Η ανακάλυψη

της τεχνικής PCR (Polymerase Chain Reaction) από τον Kary Mullis το 1983 έδωσε το έναυσμα δημιουργίας αρκετών δευτερευόντων τεχνικών που θα δώσουν λύση σε αυτά τα προβλήματα. Το μοναδικό πλεονέκτημα που διατηρούν ακόμα οι καλλιέργειες κυτταρικών σειρών σε σχέση με τις μοριακές μεθόδους έγκειται στο ότι με αυτές τις τεχνικές διακρίνεται ή όχι η βιωσιμότητα του ιού (Grabow et al., 1999).

Η ανάπτυξη της τεχνικής της Αντίστροφης Μεταγραφής (RT: Reverse Transcription) – PCR έδωσε τη δυνατότητα άμεσης ανίχνευσης πολιοϊικού RNA από κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας της τεχνικής ακόμα και για πολύ μικρά μόρια RNA (Casas et al., 2001). Παρόλο, που παίρναμε άμεσες πληροφορίες για την ύπαρξη ή όχι πολιοϊών, δεν γνωρίζαμε περισσότερες πληροφορίες για τον τύπο ή τον υπότυπο του ιού. Έτσι, είτε σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινητές (primers), είτε αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές, οι οποίες στο σύνολό τους θα έδιναν αυτές τις πληροφορίες. Στην περίπτωση των εκκινητικών μορίων, πρόσφατα σχεδιάστηκαν ειδικοί primers για τον κάθε ορότυπο βασιζόμενοι στην κωδική περιοχή της VP1(η οποία είναι η κύρια υπεύθυνη για την αντιγονικότητα του ιού),(Caro et al., 2001; Oberste et al., 1999). Βασιζόμενοι στην RT-PCR αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές, όπως η nested PCR (η οποία έχει μεγαλύτερη ευαισθησία από την PCR), η RT- multiplex PCR [για πιο εύκολη και γρήγορη ανίχνευση και διάκριση μεταξύ των PVs και NPEVs, (Egger et al., 1995)], και την Sabin specific RT- triplex PCR που έχει αναφερθεί από τον Yang et al., 1991 και με την οποία με μία μόνο αντίδραση μπορούμε να ταυτοποιήσουμε ακόμα και τον τύπο μόνο των Sabin πολιοϊών [δεν ισχύει για τους αγρίου τύπου πολιοϊούς (Yang et al., 1991; Buonagurio et al., 1999)]. Παράλληλα αναπτύχθηκε και μία συμπληρωματική μέθοδος, η ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων των προϊόντων της RT-PCR με περιοριστικά ένζυμα, (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism). Με αυτή τη μέθοδο ήταν εύκολη η αναγνώριση και η διάκριση των ιών του γένους των εντεροϊών καθώς και των εμβολιακών στελεχών.

Τέλος, μία άλλη μέθοδος μοριακής διάγνωσης αποτελεί η αλληλούχιση (sequencing) του γενετικού υλικού του υπό εξέταση ιού. Και με την ταυτόχρονη δημιουργία τράπεζας πληροφοριών είναι πλέον εύκολη η ταυτοποίηση των εντεροϊών.

8. Εμβόλια.

Από όλους τους εντεροϊούς, μόνο για τους πολιοϊούς υπάρχουν διαθέσιμα εμβόλια (Zaoutis και Klein, 1998). Και συγκεκριμένα υπάρχουν δύο εμβόλια. Το IPV που ανακαλύφθηκε από τον Jonas Salk το 1955 και το OPV που ανακαλύφθηκε από τον Albert Sabin το 1963.

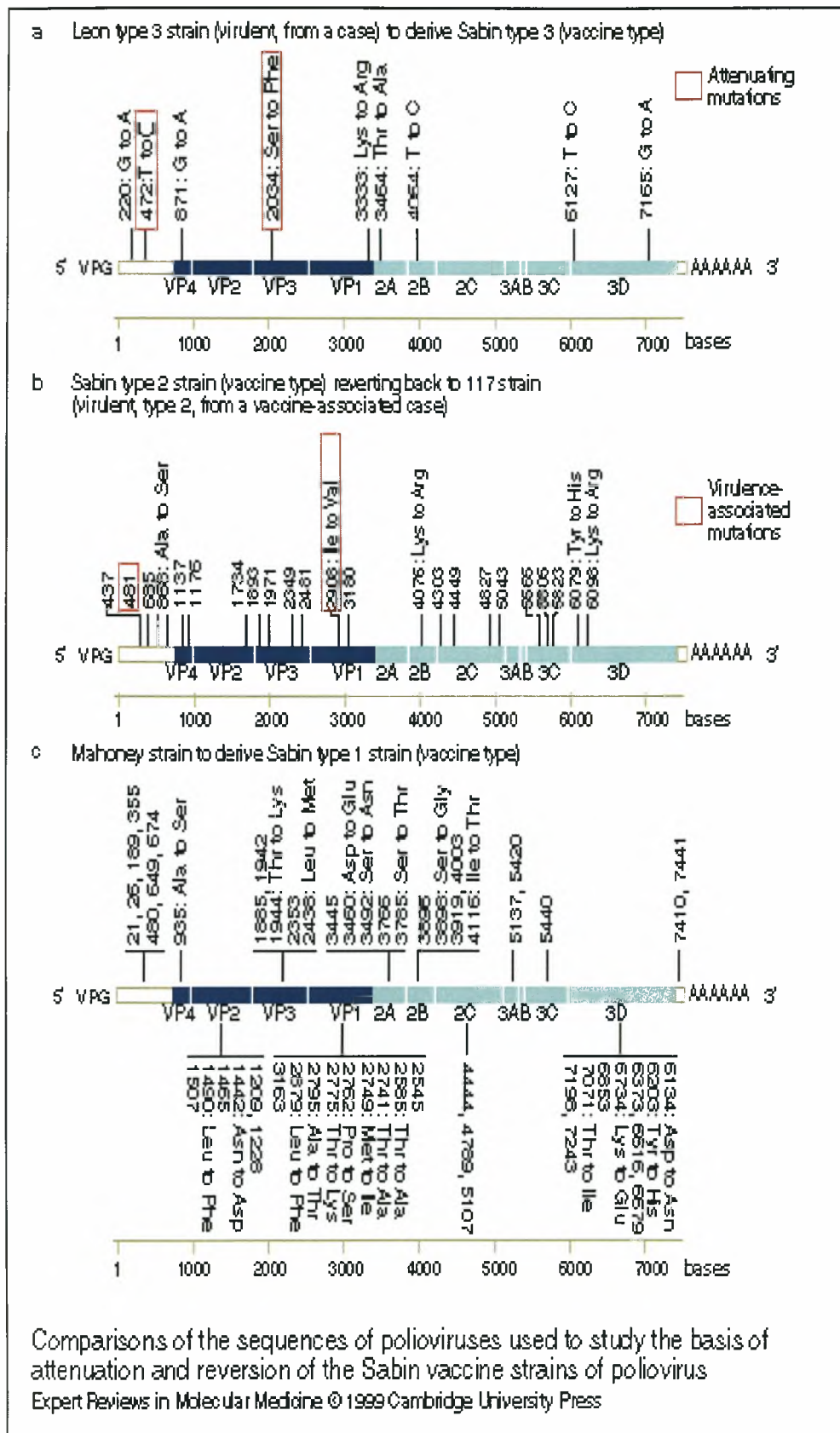
8.1. OPV (Oral Poliovirus Vaccine).

Το εμβόλιο OPV περιέχει ζωντανά εξασθενημένα στελέχη και των τριών οροτύπων των πολιοϊών σε αναλογία 10:1:6 (S1:S2:S3 αντίστοιχα), (CDC, 2002; Kew et al., 2004). Αυτά τα στελέχη έχουν αναπτυχθεί μετά από επαναλαμβανόμενα περάσματα σε καλλιέργειες ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων ή αρχέγονων κυττάρων πιθήκου. Με την είσοδό τους στον ανθρώπινο οργανισμό αναπτύσσονται στην περιοχή του στόμαχου επάγοντας χυμική ανοσία σε όλο το γαστρεντερικό σύστημα με συνεπακόλουθη αναστολή του πολλαπλασιασμού του ιού. Μια δόση του εμβολίου επάγει ανοσία σε ποσοστό 50%, ενώ τρεις σε ποσοστό 95%.

Το OPV παρέχει ανοσία μεγάλης χρονικής διάρκειας και άμεσης απόκρισης (Blume και Geesink, 2000; Wood και Thorley, 2003). Αυτό συμβαίνει, διότι το συγκεκριμένο εμβόλιο προκαλεί μια 'ενεργή' μόλυνση.

Το πιο σημαντικό του χαρακτηριστικό είναι ότι τα στελέχη του μπορούν να εξαπλώνονται μέσα σε ένα πληθυσμό παρέχοντας έτσι ανοσία ακόμα και σε ανθρώπους που δεν έχουν εμβολιαστεί (Hovi et al., 2004).

Από την άλλη πλευρά όμως, τα εξασθενημένα αυτά στελέχη σπάνια μεταλλάσσονται ή μεταστρέφονται σε νευροτροπικά (παθογόνο δράση), προκαλώντας την ασθένεια της παραλυτικής πολιομυελίτιδας ή αλλιώς την εμβολιοσυνδεόμενη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP: Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis). Και τα στελέχη που την προκαλούν πλέον παίρνουν την ονομασία VDPVs (Vaccine-Derived Polioviruses), (Ενότητα 8.3).



Εικόνα 8.1. Μελέτη των μεταλλάξεων στην αλληλουχία των πολιοϊών που ευθύνονται για την εξασθένηση ή την μολυσματικότητα αυτών. Α) στα κόκκινα κουτιά αναγράφονται οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για την εξασθένηση του πολιοϊού τύπου 3(Leon) και την παραγωγή του εμβολιακού στελέχους Sabin 3. Β) Μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη μεταστροφή του εμβολιακού στελέχους σε παθογόνο ιό. Γ) Μεταλλάξεις που εμπλέκονται για την παραγωγή του Sabin 1 από το αντίστοιχο στέλεχος πολιοϊού τύπου 1 Mahoney.(Minor, 1999).

8.2. IPV (Inactivated Poliovirus Vaccine).

Για την παραγωγή αυτού του εμβολίου και οι τρεις ορότυποι των πολιοϊών αναπτύσσονται σε κυτταρικές σειρές Vero (τύπος νεφρικού ιστού πιθήκου) και απενεργοποιούνται με φορμαλδεΰδη (CDC, 2002). Στο εμβόλιο, επίσης, εμπεριέχονται βακτηριοκτόνα και μυκητιοκτόνα, τα : 2-φαινοξυαιθανόλη, νεομυκίνη, στρεπτομυκίνη και πολυμυξίνη Β.

Το IPV διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων στον ορό του αίματος (χορηγείται με ενδομυϊκή ένεση), παρεμποδίζοντας έτσι τους πολιοϊούς να φτάσουν στα νευρικά κύτταρα με τελική πρόκληση την ασθένεια της παράλυσης. Όμως, δεν μπορεί να αποτρέψει τον εναρκτήριο πολλαπλασιασμό του ιού στο γαστρεντερικό σύστημα. Επομένως, δεν μπορεί να αποτρέψει και την κυκλοφορία του ιού μέσα στον πληθυσμό. Επιπλέον, ένα σημαντικό μειονέκτημα του IPV είναι το μεγάλο του κόστος.

8.3. OPV και εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP).

Η επιτυχία του εμβολίου OPV αντισταθμίστηκε από το σπάνιο φαινόμενο, όπου τα στελέχη του μεταλλάσσονταν ή μεταστρέφονταν σε νευρομολυσματικά, με τελικό αποτέλεσμα την νόσο της παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Αυτή η ασθένεια αναφέρεται ως εμβολιοσυνδεδεμένη παραλυτική πολιομυελίτιδα (VAPP). Και τα εμβολιακά στελέχη που παρουσιάζουν νευροτροπισμό, ως VDPVs (Minor, 1992; Bellmunt et al., 1999; Hovi et al., 2004). Σημαντικό ρόλο για την εμφάνιση της ασθένειας παίζει και ο βαθμός της ανοσοεπάρκειας του εκάστοτε ανθρώπου (έχουν βρεθεί νευρομολυσματικά εμβολιακά στελέχη σε υγιείς ανθρώπους). Στην περίπτωση ασθενών με ανοσοανεπάρκεια, η εμφάνιση της νόσου είναι ένα βέβαιο φαινόμενο.

Όπως έχουμε προαναφέρει, τα εμβολιακά στελέχη μπορούν να μεταδίδονται μέσα σε ένα πληθυσμό το ίδιο με αυτά του αγρίου τύπου. Την ίδια δυνατότητα όμως έχουν και τα μολυσματικά εμβολιακά στελέχη. Έτσι, τα συγκεκριμένα στελέχη ενδημούν σε αυτούς τους πληθυσμούς δημιουργώντας επιδημίες εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας. Τέτοιες επιδημίες έχουν αναφερθεί στην Αίγυπτο τη χρονική περίοδο 1988-1993, στις νήσους Ισπανιόλα το 2000-2001, στις Φιλιπίνες το 2001 και στη Μαδαγασκάρη το 2001-2002 (Cherkasova et al., 2002; Kew et al., 2004). Συνήθως περιπτώσεις VAPP εμφανίζονται 70 μέρες περίπου μετά τον εμβολιασμό. Τα εμβολιακά στελέχη τύπου 2 και 3 είναι κυρίως υπεύθυνα για εκδήλωση της ασθένειας (88%), παρά του τύπου 1 (μόνο το 10% όλων των περιστατικών VAPP),(Guillot et al., 2000). Αυτό πιθανόν συμβαίνει λόγω των

πολλών σημειακών μεταλλάξεων, που υπάρχουν στον εξασθενημένο φαινότυπο του Sabin τύπου 1 (54 σημειακές μεταλλάξεις), σε σύγκριση με τις ελάχιστες που έχουν των τύπου 2 και 3 (Martin και Minor, 2002).

Θεωρητικά, τα εμβολιακά στελέχη αναπτύσσονται με μικρότερη απόδοση από ότι οι αντίστοιχοι πολιοϊοί αγρίου τύπου, στο ανθρώπινο έντερο. Παρόλο αυτά, κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού φαίνεται να συμβαίνουν πολλές γενετικές μεταβολές. Αυτές οι μεταβολές γίνονται βάσει δύο μηχανισμών, της μεταλλαξιγένεσης και του ανασυνδυασμού (Guillot et al., 2000). Ο μηχανισμός της μεταλλαξιγένεσης βοηθάει τα εμβολιακά στελέχη να χάσουν την εξασθενημένη τους μορφή και να ξαναγίνουν μολυσματικά. Οι μεταλλάξεις που ευθύνονται για τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών, έχουν βρεθεί κυρίως στις περιοχές της 5'-UTR και της VP1 και για τους τρεις τύπους (Li et al., 1996; Georgescu et al., 1997; Minor, 1999; Martin and Minor 2002). Πιστεύεται ότι αυτές αυξάνουν την νευρομολυσματικότητα των στελεχών.

Ο ανασυνδυασμός γίνεται, είτε μεταξύ των ορότυπων των εμβολιακών στελεχών, είτε μεταξύ εμβολιακών στελεχών και στελεχών αγρίου τύπου, είτε μεταξύ εμβολιακών στελεχών και άλλων ιών του γένους των εντεροϊών (εκτός των πολιοϊών, NPEVs), και είναι ομόλογος. Έχει προταθεί ότι αυτός ο μηχανισμός αυξάνει την νευρομολυσματικότητα και προσδίδει πλεονεκτήματα στον πολλαπλασιασμό των στελεχών (Friedrich, 2000). Ο ανασυνδυασμός συνήθως επιτελείται στις κωδικές περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών και όχι στην περιοχή των δομικών, παρά μόνο προς το τέλος της P1. Αυτό μάλλον συμβαίνει, λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας των δομικών πρωτεϊνών των πολιοϊικών στελεχών. Αναλυτικότερα για αυτούς τους δύο μηχανισμούς θα αναφερθούμε στην επόμενη ενότητα.

Τέλος, η πιθανότητα εμφάνισης εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP) από τη χρήση του εμβολίου OPV σε αναπτυγμένες χώρες είναι 1 στις 2.5 εκατομμύρια δόσεις. Παρόλο αυτά, σε χώρες με μικρή κάλυψη εμβολιασμού και με φτωχή υγιεινή η πιθανότητα αυτή αυξάνεται. Επιπλέον, η πιθανότητα αυτή αυξάνεται ακόμα μέχρι και 7000 φορές παραπάνω σε ανθρώπους με συγκεκριμένους τύπους ανοσοανεπάρκειας, όπως κάποιες διαταραχές των Β-λεμφοκυττάρων (π.χ. α-γαμα γλοβουλιναιμία), όπου η παραγωγή ανοσοσφαιρινών είναι μειωμένη (Guillot et al., 2000; Triki et al., 2003). Έτσι, δεν προβάλλεται αντίσταση από τον οργανισμό κατά τη φάση της ιαιμίας (Εικόνα 4.1). Επομένως, η χορήγηση του εμβολίου δεν είναι προτεινόμενη σε ασθενείς, που παρουσιάζουν μειωμένη σύνθεση ανοσοσφαιρινών, που έχουν AIDS ή λέμφωμα ή λευχαιμία ή σε ασθενείς που υποβάλλονται σε χημειοθεραπεία (Hovi et al., 2004).

9. Εξέλιξη των πολιοϊών.

Κατά την εξέλιξή τους, οι πολιοϊοί και γενικά όλοι οι RNA-ιοί παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα, λόγω των υψηλών ρυθμών ανάπτυξής τους. Αυτή η ποικιλομορφία οφείλεται σε δύο μηχανισμούς, τη μεταλλαξιγένεση και τον γενετικό ανασυνδυασμό (E. Domingo and J. J Holland 1997).

9.1. Μεταλλαξιγένεση.

Η πολυμεράση των πολιοϊών, η 3Dpol, έχει τις ίδιες ιδιότητες με την RNA πολυμεράση των ευκαρυωτικών κυττάρων. Επομένως, δεν έχει διορθωτικές ικανότητες κατά την ιϊκή αντιγραφή (μηχανισμό που διαθέτουν μόνο οι DNA πολυμεράσες, proof-reading) και η συχνότητα λάθους σε κάθε αντιγραφικό κύκλο είναι περίπου 10^{-4} με 10^{-5} ανά νουκλεοτιδική βάση (Ward et al., 1992). Η αύξηση της ποικιλομορφίας είναι το επακόλουθο αποτέλεσμα και με τον μηχανισμό της φυσικής επιλογής επιβιώνουν ή όχι οι νέοι γενότυποι των πολιοϊών. Έτσι, οι πολιοϊοί μπορούν πλέον να αναφερθούν ως quasispecies («περίπου είδη»), όπου δείχνεται με αυτό τον τρόπο η μεγάλη ετερογένεια των γονοτύπων που υπάρχει μεταξύ των πολιοϊών (Gene V. Gavrillin et al 2000; Isabel S. Novella et al 1999). Έχει υπολογιστεί ότι ο ρυθμός μεταλλαξιγένεσης των νουκλεοτιδικών αλλαγών στην αλληλουχία των πολιοϊών είναι περίπου 1% ανά χρόνο (Kew et al., 1998 ; Martin and Minor, 2002).

Οι μεταλλάξεις κυρίως εντοπίζονται στις κωδικές περιοχές των δομικών πρωτεϊνών VP1, VP2 και VP3, καθώς και στη 5'- μη κωδική περιοχή. Και αυτές οι μεταλλάξεις πιστεύεται ότι είναι υπεύθυνες για την μολυσματικότητα και τη μεταστροφή των εμβολιακών στελεχών σε παθογόνους ιούς (Georgescu et al., 1997; Friedrich, 2000; Martin and Minor, 2002). Από τις δομικές πρωτεΐνες, η VP1 είναι αυτή που εμφανίζει τις περισσότερες μεταλλάξεις. Αυτό μάλλον συμβαίνει, διότι το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζει τις περισσότερες αντιγονικές θέσεις του ιού, που είναι υπεύθυνες για την επιβίωσή του. Σε αυτή την εργασία βρέθηκαν μεταλλάξεις σε μερικά δείγματα και στις κωδικές περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών τους. (Τι εννοείς?????)

Τις μεταλλάξεις, ανάλογα με το αποτέλεσμα που επιφέρουν στην νουκλεοτιδική αλληλουχία και στην έκφραση αυτής, μπορούμε να τις κατατάξουμε στις παρακάτω κατηγορίες: i) στις σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations), όπου η μετάλλαξη νουκλεοτιδίου σε ένα κωδικόνιο είναι συνώνυμη και το αντίστοιχο αμινοξύ που εκφράζεται παραμένει το ίδιο, ii) στις ουδέτερες μεταλλάξεις (neutral mutations), όπου το αμινοξύ που εκφράζεται από το μεταλλαγμένο κωδικόνιο είναι διαφορετικό αλλά ισοδύναμο χημικά με αυτό του πρότυπου (επομένως δεν επιφέρει αλλαγές στη διαμόρφωση και στη λειτουργικότητα της νεοσυντιθέμενης

πρωτεΐνης), iii) στις χωρίς νόημα μεταλλάξεις (nonsense mutations), όπου έχουμε τη σύνθεση μη λειτουργικών πρωτεϊνών γιατί διακόπτεται πρόωρα η σύνθεσή τους (το μεταλλαγμένο κωδικόνιο είναι κωδικόνιο λήξης), iv) στις μεταλλάξεις χωρίς νόημα (missense mutations), όπου έχουμε την έκφραση αμινοξέων διαφορετικής σύστασης και χημικής ιδιότητας, επιδρώντας έτσι στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης είτε θετικά είτε αρνητικά, και τέλος, v) μεταλλάξεις που ευθύνονται για την έκφραση πρωτεϊνών μεγαλύτερου μήκους από ότι το αρχικό προσδίδοντάς τους νέες ιδιότητες.

9.2. Γενετικός ανασυνδυασμός.

Ο γενετικός ανασυνδυασμός είναι το κυριότερο εργαλείο του εξελικτικού μηχανισμού των πολιοϊών και γενικά όλων των ιών. Με τον ανασυνδυασμό οι πολιοϊοί επιτυγχάνουν να αποκτούν νέα χαρακτηριστικά (από τους προγονικούς τους δότες), που τους προσδίδουν εξελικτικό πλεονέκτημα. Ο ανασυνδυασμός που γίνεται είναι ομόλογος (Kirkegaard, K., and Baltimore, D., 1986). Στις περιπτώσεις μη ομόλογων ανασυνδυασμών τα νέα στελέχη δεν είναι βιώσιμα. Έτσι, αυτός μπορεί να συμβεί μεταξύ εμβολιακών στελεχών (Sabin), μεταξύ εμβολιακών στελεχών και στελεχών αγρίου τύπου (wt PVs), καθώς και εμβολιακών στελεχών με άλλους εντεροϊούς. Αν ο ανασυνδυασμός γίνεται μεταξύ στελεχών του ίδιου ορότυπου τότε αναφέρεται ως ενδό-τυπος ανασυνδυασμός (intratypic recombination), ενώ εάν συμβαίνει μεταξύ στελεχών διαφορετικού ορότυπου, ως δια-τυπος ανασυνδυασμός (intertypic recombination), (Mulders et al., 1999; Hovi et al., 2004).

Αν, και όπως προαναφέραμε, ότι (η διασταύρωση) ο ανασυνδυασμός μεταξύ στελεχών των εντεροϊών είναι επιφύλακτος, παρόλο αυτά, τα περισσότερα στελέχη που έχουν βρεθεί ανασυνδυασμένα, είναι αυτά μεταξύ των γονότυπων των εμβολιακών στελεχών. Αυτό οφείλεται στο ότι το εμβόλιο OPV περιέχει και τους τρεις ορότυπους Sabin και κατά τον αυξημένο τους πολλαπλασιασμό μέσα στον οργανισμό του ανθρώπου βρίσκουν πρόσφορο έδαφος για να ανασυνδυαστούν. Ανασυνδυασμένα στελέχη Sabin έχουν βρεθεί και σε υγιείς εμβολιασμένους ανθρώπους (Blomqvist et al., 2003; Karakasiliotis et al., 2004) αλλά και ασθενείς της νόσου της εμβολιοσυνδεδεμένης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (Guillot et al., 2000).

Τα εμβολιακά στελέχη, που έχει βρεθεί να παρουσιάζουν μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμού είναι αυτά των τύπων 2 και 3 και σε μικρότερο βαθμό αυτά του τύπου 1. Βέβαια, εκτός από μονούς ανασυνδυασμούς έχουν ανιχνευτεί και αρκετοί διπλοί. Οι πιο συχνοί από αυτούς είναι κυρίως τύπου S3/ S2/ S3 (Blomqvist et al., 2003; Karakasiliotis et al., 2004) και S3/ S2/ S1 (Martin et al., 2002, Cuervo et al., 2001).

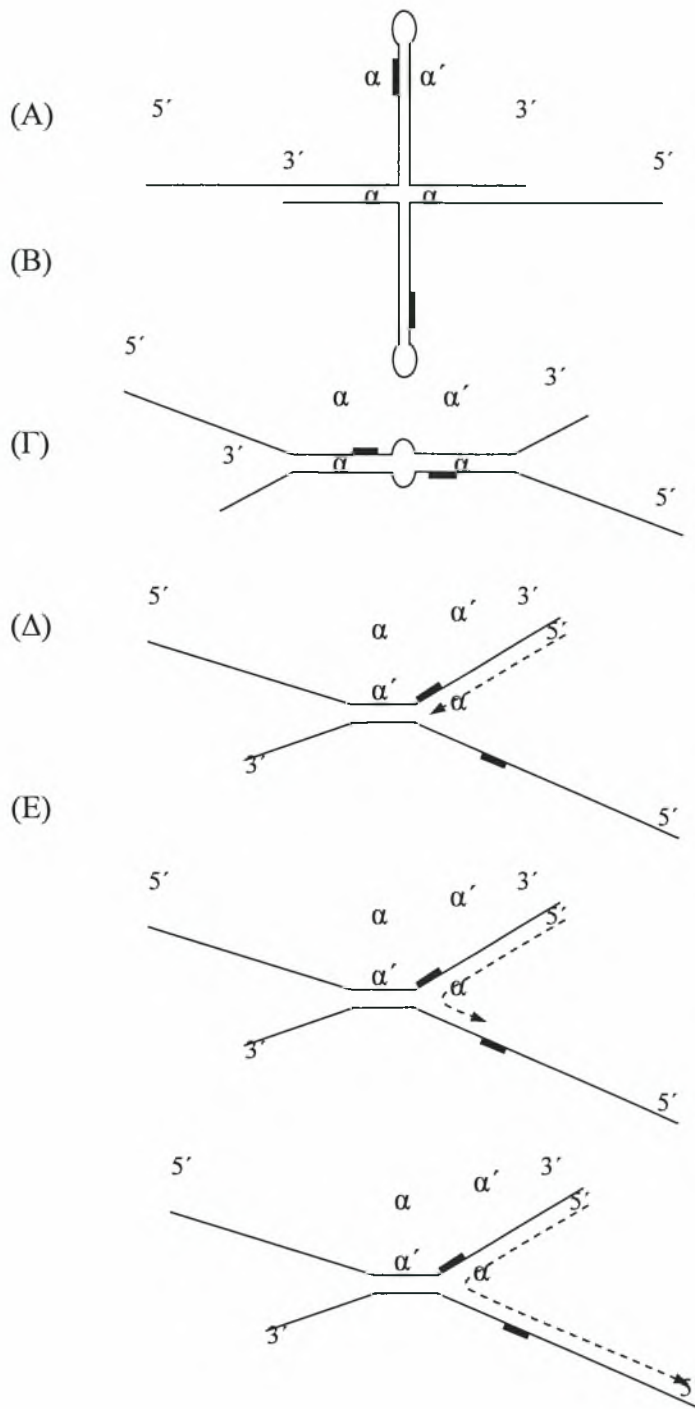
Οι ανασυνδυασμοί κυρίως παρουσιάζονται στις περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα πιο συχνά στις κωδικές περιοχές 2C και 3D (Georgoroulou, A. and Markoulatos, P., 2001). Στις κωδικές περιοχές των δομικών περιοχών δεν έχουν παρατηρηθεί ποτέ ανασυνδυασμοί, παρά μόνο στο τέλος της πρωτεΐνης VP1, αν και είναι σπάνιοι. Όμως, δεν αλλάζουν την αντιγονικότητα αυτής της πρωτεΐνης (Blomqvist et al., 2003; Martin et al., 2002).

Για τον γενετικό ανασυνδυασμό έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί: i) ο μηχανισμός σπασίματος – επανένωσης (mechanism of the breaking and joining), και ii) ο μηχανισμός αλλαγής μήτρας (template switch mechanism).

Ο πρώτος μηχανισμός είναι ένας μη αντιγραφικός μηχανισμός, όπου προγονικά μόρια RNA κόβονται ενζυμικά και τα κομμένα άκρα τους επανενώνονται, δημιουργώντας έτσι νέα μόρια RNA. Αυτό μάλλον συμβαίνει, διότι ολιγονουκλεοτίδια των πολιοϊών σχηματίζουν κόμβους παρόμοιους με αυτούς των ριβοενζύμων δίνοντάς τους τη δυνατότητα να πραγματοποιήσουν αυτό το κόψιμο 2 πατρικών γονιδιωμάτων και την επανένωση τους σε ένα νέο ανασυνδυασμένο γονιδίωμα. Ο μηχανισμός αυτός έπεται της αντιγραφής (Gmyl et al., 1999).

Ο μηχανισμός της αλλαγής μήτρας είναι ένας αντιγραφικός μηχανισμός. Έχει προταθεί ότι αυτός ο μηχανισμός ανασυνδυασμού λαμβάνει χώρα κατά τη διαδικασία της αντιγραφής του αρνητικού πολικότητας κλώνου RNA. Αυτό συμβαίνει κατά την επιμήκυνση της αλυσίδας από την πολυμεράση του ιού ($3D^{pol}$), όπου έχοντας αρχικά ένα μόριο RNA ως εκμαγείο σταματάει η δράση της και συνεχίζει να επιμηκύνει την αλυσίδα έχοντας ως εκμαγείο ένα δεύτερο διαφορετικό μόριο RNA (Εικόνα 9.1). Έχουν προταθεί πολλοί παράγοντες που να ευθύνονται για τη διακοπή της δράσης της πολυμεράσης πάνω στο πρώτο γένωμα και συνέχιση της δράσης της πάνω σε ένα άλλο γένωμα, παράγοντας τελικά ένα νέο μόριο με διαφορετικές ιδιότητες και χαρακτηριστικά από αυτά που έχουν τα δύο προγονικά από τα οποία συντίθεται. Αυτοί οι παράγοντες είτε είναι κάποιες δευτεροταγείς δομές που διακόπτουν τη δράση της ιϊκής πολυμεράσης (Romanova et al., 1986), είτε οφείλεται στην προσθήκη ενός λάθους νουκλεοτιδίου που προκαλεί τη διακοπή της δράσης της και προωθεί την υβριδοποίηση του νεοσυντιθέμενου μορίου με ένα άλλο μόριο. Με απλά λόγια η ιϊκή πολυμεράση λόγω κάποιου εμποδίου μεταπηδά από ένα εκμαγείο σε ένα άλλο και παράγει ένα ανασυνδυασμένο μόριο.

Τέλος, από ότι φαίνεται ο ανασυνδυασμός είναι ο καλύτερος εξελικτικός μηχανισμός που έχουν οι πολιοϊοί και γενικά όλοι οι εντεροϊοί. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνουν να δημιουργούν στελέχη που φέρουν πλεονεκτικά χαρακτηριστικά, ως προς τα πατρικά από τα οποία προέρχονται, για την επιβίωσή τους. Βέβαια, δεν παρουσιάζουν όλα τα ανασυνδυασμένα στελέχη πολιοϊών που έχουν βρεθεί μολυσματικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό.



Εικόνα 9.1.: Ο μηχανισμός ανασυνδυασμού κατά Romanova et al. Οι συνεχείς γραμμές αναπαριστούν τα δυο μόρια RNA που χρησιμεύσουν ως εκμαγείο του ανασυνδυασμένου μορίου. Οι δυο αντίστροφες επαναλήψεις είναι οι α και α' , οι συμπαγείς παύλες αποτελούν τις θέσεις (Recombination junction) στα δύο γενώματα όπου γίνεται ο ανασυνδυασμός και η διακεκομμένη γραμμή απεικονίζει το παραγόμενο ανασυνδυασμένο RNA. (Romanova et al., 1986)

10. Πολιοϊοί και περιβάλλον.

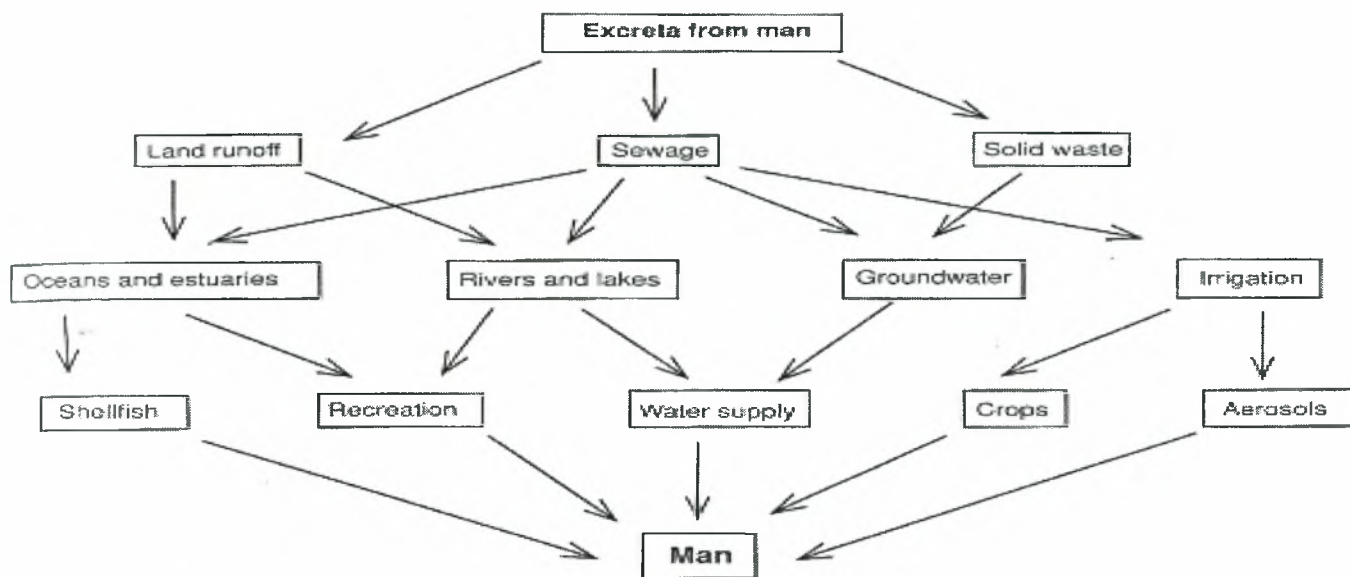
Οι μόνοι φυσικοί ξενιστές των πολιοϊών είναι οι άνθρωποι. Βέβαια, έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν και άλλα πρωτεύοντα ζώα (π.χ. χιμπαντζήδες και γορίλλες) ευαισθησία σε μόλυνση από τους συγκεκριμένους ιούς, αλλά λόγω των μικρών τους πληθυσμών δεν παρατηρείται μετάδοση του ιού ή της ασθένειας (Dowdle and Birmingham, 1997; WHO, 1999).

Η εύρεση και απομόνωση πολιοϊών από το περιβάλλον καταδεικνύει την πρόσφατη μόλυνση της ανθρώπινης κοινότητας (CDC, 2002). Έτσι, τα στελέχη των ιών μπορούν να εντοπιστούν είτε στα αποχετευτικά ύδατα αυτής της κοινότητας, είτε στα ύδατα που ανακυκλώνονται για να χρησιμοποιηθούν στην άρδευση, είτε ακόμα στην επιφάνεια του ύδατος κοντινών ποταμών ή λιμνών. Άρα, η ύπαρξη των πολιοϊών στο περιβάλλον είναι αρκετά εκτενής (Εικόνα 10.1). Παρόλο αυτά, δεν υπάρχουν αποδείξεις που να συνδέουν την περιβαλλοντική τους ύπαρξη με την πρόκληση επιδημίας της ασθένειας. Αυτό συμβαίνει, διότι η επιδημία εγκαθιδρύεται από τη μετάδοση του ιού από άτομο σε άτομο (Metcalf et al., 1995; Yoshida et al., 2002).

Η περιβαλλοντική παρακολούθηση χρησιμοποιείται κυρίως για τον έλεγχο των κυκλοφορούντων πολιοϊών καθώς και για τον υπολογισμό της έκτασης ή της διάρκειας μιας επιδημίας στον εκάστοτε πληθυσμό που συμβαίνει. Η λογική βάση της περιβαλλοντικής παρακολούθησης στηρίζεται στο χαρακτηριστικό των πολιοϊών ότι εκκρίνονται από τους ανθρώπους που έχουν μολυνθεί (με τα κόπρανα). Αυτή η έκκριση διαρκεί αρκετές βδομάδες και έτσι με αυτόν τον τρόπο ένας μεγάλος αριθμός μολυσματικών στελεχών παραμένει στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν (WHO, 2002; WHO, 2004).

Η συσχέτιση των πολιοϊών, που κυκλοφορούν σε ένα πληθυσμό (είτε είναι αγρίου τύπου, είτε προέρχονται από μολυσματικά εμβολιακά στελέχη) με αυτούς που κυκλοφορούν στο οικείο περιβάλλον, έχει αποδειχτεί γενετικά και επιδημιολογικά (Divizia et al., 1999; Shulman et al., 2000).

Τέλος, αν και η εξάλειψη των αγρίου τύπου πολιοϊών τελείως, από τις ανθρώπινες κοινωνίες και το περιβάλλον, είναι αρκετά πιθανή, η εξάλειψη όμως, της ασθένειας της πολιομυελίτιδας είναι ανέφικτη, όσο δεν γίνεται αντικατάσταση του εμβολίου OPV από το εμβόλιο IPV (Yoshida et al., 2002).



Εικόνα 10.1. Η μετάδοση των ποιοίων στο περιβάλλον και η πιθανότητα μόλυνσης του ανθρώπου.

ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανίχνευση ανασυνδυασμών σε περιβαλλοντικά δείγματα εμβολιακών στελεχών πολιοϊών και ο πιθανός ρόλος των ανασυνδιασμών στη βιωσιμότητα των στελεχών.

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ

ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΠΟ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ ΚΑΙ ΟΡΟΤΥΠΙΚΗ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ.



ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA

SEQUENCING

RT-PCR

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΓΟΡΙΘΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

RFLP

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΟΥΣ



ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.

Η συλλογή και η απομόνωση των δειγμάτων έγινε από την ευρύτερη περιοχή του νομού Αττικής την χρονική περίοδο μεταξύ του 1975 και του 1988 . Η ταυτοποίηση του γενότυπου και ορότυπου των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με την εργασία της Georgoroulou et al., 2000. Στον πίνακα 1.3 που ακολουθεί αναφέρονται τα αποτελέσματα της ταυτοποίησης των περιβαλλοντικών δειγμάτων, όπου βρέθηκε η ύπαρξη πολιοϊών.

ΟΡΟΤΥΠΟΣ	ΓΕΝΟΤΥΠΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ
P2	S2	372
P3	S3	712
P1	S1	152
P1	S1	536
P3	S3	444
P3	S3	738
P1	S1	742
P3	S3	750
P3	S3	584

Πίνακας 1.3. Ο ορότυπος και ο γενότυπος των περιβαλλοντικών δειγμάτων.

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΙΩΝ.

Τα ιικά στελέχη αναπτύχθηκαν σε καλλιέργειες κυττάρων Rd (κυτταρική σειρά ανθρώπινου ραβδομυοσαρκώματος) και Hep 2 (κυτταρική σειρά ανθρώπινου ρινοφαρυγγικού καρκινώματος). Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε φλάσκες εμβαδού 25cm², σε μέσο καλλιέργειας MEM-D στους 37°C. Στη συνέχεια σε αυτές τις υγρές καλλιέργειες προστέθηκαν 2 ml υλικού που περιείχε ιό. Αυτή η προσθήκη ιού είχε σαν αποτέλεσμα τη μόλυνση των κυττάρων από τον ιό και την εμφάνιση χαρακτηριστικής κυτταροπαθογόνου δράσης (CPE), που οδηγεί σε καταστροφή των κυττάρων. Οι σωλήνες παρέμειναν στους 37°C για μια χρονική περίοδο 1 έως 3 ημερών, μέχρι δηλαδή να εξαπλωθεί το CPE σε όλα τα κύτταρα και να έχουμε έτσι την καταστροφή όλων των κυττάρων. Ύστερα από την εξάπλωση του CPE σε όλα τα κύτταρα οι φλάσκες μεταφέρθηκαν στους -20°C.

Για να βεβαιωθούμε ότι στα δείγματά μας δεν υπάρχουν μείγματα στελεχών πολιοϊών ή μείγματα πολιοϊών και άλλων ιών του γένους των εντεροϊών προβήκαμε σε σειριακές αραιώσεις για κάθε δείγμα με τη χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (Εικόνα 11.1). Οι αραιώσεις ήταν υποδεκαπλάσιες και κυμάνθηκαν από την αρχική συγκέντρωση μέχρι 10⁻¹⁹ της αρχικής συγκέντρωσης.

Στην πρώτη θέση της πλάκας προστέθηκαν 100 μl της ιικής καλλιέργειας, που η διαδικασία παραγωγής της περιγράφηκε στην παραπάνω παράγραφο. Στις υπόλοιπες θέσεις της πλάκας προστέθηκαν 90 μl υλικού MEM-D. Από τα 100 μl καλλιέργειας που προστέθηκαν στην πρώτη θέση, μεταφέρθηκαν 10 μl στην δεύτερη θέση, ύστερα από καλή ανάδευση με την πιπέτα 10 μl από την δεύτερη θέση μεταφέρθηκαν στην τρίτη θέση, από εκεί στην τέταρτη κ.ο.κ. . Στη συνέχεια οι πλάκες επώαστηκαν στους 37°C. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την διαδοχική εμφάνιση του CPE από θέσεις υψηλής ιικής συγκέντρωσης, σε θέσεις χαμηλής ιικής συγκέντρωσης. Ύστερα από αυτήν την διαδικασία μεταφέρθηκε

υλικό από την τελευταία θέση που εμφανίστηκε το CPE και ενοφθαλμίστηκε σε καλλιέργειες κυττάρων όπως περιγράφεται παραπάνω.

	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 11.1. Απεικόνιση μιας πλάκας μικροτιτλοποίησης που χρησιμοποιείται για τις σειριακές αραιώσεις.

ΕΚΧΥΛΙΣΗ RNA.

Στη συνέχεια από την επανακαλλιέργεια εκχυλίζουμε το ιϊκό γονιδίωμα (RNA) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της Casas (Casas et al. 1995).

Αρχικά, προσθέτουμε 100μl δείγματος, 10μl γλυκογόνου (-20 °C) και 300μl Lysis Buffer το οποίο αποτελείται από 4M GuSCN, 0,5 % N-lauroyl sacrosine, 1mM dithiotreitol και 25mM sodium citrate σε erpendorf των 2ml. Ακολουθεί ανάδευση του μίγματος (vortex) και επώαση 20 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 400μl ισοπροπανόλης (-20 °C), αναδεύουμε και επωάζουμε στους -20 για 20 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14000g για 10 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 500μl αιθανόλης 70%, ανάδευση και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 14000g. Τέλος, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναδιαλυτοποιήσαμε το ίζημα σε 100μl ddH₂O. Τα erpendorf

αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής.

ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (RT).

Το προϊόν της εκχύλισης χρησιμοποιείται στη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής για την παραγωγή cDNA. Αυτή η μέθοδος στηρίζεται στις ιδιότητες της αντίστροφης μεταγραφάσης, η οποία αντιγράφει το ιϊκό RNA σε cDNA. Το cDNA είναι απαραίτητο για τη διαδικασία της PCR που θα ακολουθήσει.

Αρχικά, σε σωληνάκια (tubes) των 500 μl εισάγουμε 5 μl RNA και 1 μl τυχαίων εκκινητικών μορίων (random primers), συγκέντρωσης 100 pmol/ μl . Τα συγκεκριμένα εκκινητικά μόρια έχουν μήκος 9 νουκλεοτιδίων τυχαίας αλληλουχίας. Αρχικά τα tubes επωάζονται στους 70°C για 5 λεπτά. Ο σκοπός της επώασης είναι η αποδιάταξη των μορίων RNA ώστε να υβριδοποιηθούν τα random primers με το RNA. Με το πέρας της επώασης τα tubes τοποθετούνται στον πάγο, ώστε να επαναδιαταχθούν τα μόρια RNA υβριδισμένα πλέον με τους random primers. Στη συνέχεια παρασκευάζεται το μίγμα της αντίστροφης μεταγραφάσης που είναι απαραίτητο για τη βέλτιστη δραστηριότητα του ενζύμου κατά την αντίδραση. Έτσι, τελικά σε κάθε tube προστίθενται 5 μl 5x MMLV Buffer (ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, απαραίτητο για τη δράση του), 5 μl διαλύματος μίγματος των τεσσάρων τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs), συγκέντρωσης 10mM, 0,5 μl αναστολέα των ριβονουκλεασών [(rNasin), (40u/ μl)], 1 μl ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης (200 units / μl) MMLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) και τέλος συμπληρώνουμε νερό που δεν περιέχει νουκλεάσες (nuclease free H_2O), έχοντας τελικό όγκο μίγματος της αντίδρασης 25 μl (άρα προστίθεται και 7.5 μl d.d H_2O ανά σωληνάκι).

Τέλος, επωάζουμε τα σωληνάκια σε θερμοκρασία 37°C για μία ώρα. Αυτή είναι η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της αντίστροφης μεταγραφάσης που χρησιμοποιούμε. Για να διακόψουμε την αντίδραση, άρα και τη δράση του ενζύμου αυξάνουμε τη θερμοκρασία στους 95°C για πέντε λεπτά. Τα σωληνάκια μπορούν πλέον να αποθηκευτούν στη συντήρηση (-20°C) για να χρησιμοποιηθούν στη μέθοδο της PCR.

ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).

Με τη μέθοδο αυτή ενισχύουμε διάφορα τμήματα του ιϊκού γενώματος που θέλουμε να μελετήσουμε εκτενέστερα. Η ενίσχυση αυτή γίνεται με τη βοήθεια εκκινητικών μορίων που έχουν σχεδιαστεί για το εκάστοτε τμήμα (Πίνακας 1.4).

Στη συγκεκριμένη μέθοδο ακολουθούμε τα εξής στάδια: i) τη δημιουργία του μίγματος της αντίδρασης. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούμε σωληνάκια (tubes) των 200 μ l, όπου αρχικά προσθέτουμε 3 μ l cDNA του εκάστοτε δείγματος και 2 μ l ζεύγους εκκινητικών μορίων (συγκέντρωσης 15 pmol για τα ζεύγη S₁₄₂ / S₁₉₅₂, S₂₉₇ / S₂₅₉₈, S₃₆₄ / S₂₃₈₀, S₂₄₈ / S₂₉₁₁, S₂₁₀₇ / S₂₈₇₂, 71935 / EUC2 και συγκέντρωσης 25 pmol για τα ζεύγη UG23 / UC15 και UG16 / UC12). Στη συνέχεια, προσθέτουμε 5 μ l τριφωσφορικών νουκλεοτιδίων (dNTPs) συγκέντρωσης 10 mM (έτσι ώστε στο τελικό διάλυμα η συγκέντρωσή τους να είναι 1 mM), 2 μ l MgCl₂ συγκέντρωσης 50 mM (τελική συγκέντρωση 2 mM), 5 μ l 10x ρυθμιστικού διαλύματος (Taq buffer) του ένζυμου(τελική συγκέντρωση 1X), 0.4 μ l ένζυμου Taq πολυμεράσης (τελικής συγκέντρωσης 5u/ μ l) και συμπληρώνουμε με νερό (το οποίο δεν περιέχει νουκλεάσες) μέχρι τα 50 μ l. και ii) στο στάδιο όπου τα σωληνάκια με το μίγμα της αντίδρασης εισάγονται σε ένα θερμικό κυκλοποιητή όπου θα πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Στην αρχή πραγματοποιείται αποδιάταξη του cDNA στους 95 °C για 5 λεπτά και στη συνέχεια ακολουθούνται οι παρακάτω συνθήκες (Πίνακας 1.5)για το κάθε ζεύγος primers. Τέλος, η διαδικασία ολοκληρώνεται με ένα στάδιο επώασης στους 78 °C για 15 λεπτά. Τα προϊόντα πλέον μπορούν να ηλεκτροφορηθούν.

Γενωμική περιοχή	Primers ανά ζεύγη	Πολικότητα	Θέση	Αλληλουχία 5' → 3'	Μήκος του προϊόντος σε b.p.
VP1/2C	71935	sense	3212-		1262
	EUC2	antisense	4413-4433	TTTGCACTTGAAGTGTATGTA	
2C	UG23	sense	4169-4188	AAGGGATTGGAGTGGGTGTC	797
	UC15	antisense	4946-4966	CATCTCTTGAAGTTTGCTGG	
2C/3A	S ₂ 97	sense	4717-4737	TTAGCCTCCACCAACTCCAG	502
	S ₂ 598	antisense	5195-5218	TGATGTTCCCTCTCTGTTTGAACC	
2C/3C	S ₂ 48	sense	4968-4988	TCCTTTAGTGTGTGGCAAGG	864
	S ₂ 911	antisense	5812-5832	GTTTGTTCGTCACCGAGATT	
2C/3C	S ₁ 42	sense	4962-4984	GATGCTGTCCTTTAGTGTGTGG	911
	S ₁ 952	antisense	5853-5873	TCCTGCTCTGGTTGGAAAGT	
3C/3D	UG16	sense	5921-5940	GTTGGTGGGAACGGTTCACA	595
	UC12	antisense	6516-6494	TCAATTAGTCTGGATTTTCCCTG	
3C/3D	S ₃ 64	sense	5763-5784	GTATGTTCCCTGTCCGGTGTGT	1037
	S ₂ 380	antisense	6780-6800	TGGGAATGGTTGAGGTAATC	
3D/ 3'-UTR	S ₂ 107	sense	6647-6668	TCCCAGTGCTAATGGAAGAGA	766
	S ₂ 872	antisense	7393-7413	ACAACAGCATGACCCAATCC	

Πίνακας 1.4. Τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση της εργασίας. Τα ζεύγη που έχουν την αναγραφή (S) και υποσημειώνονται με ένα αριθμό υποδηλώνουν ότι έχουν σχεδιαστεί με το πρόγραμμα primer 3 σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρότυπα των κατατεθειμένων αλληλουχιών Sabin1 (AY184219) , Sabin 2 (184220) και Sabin 3 (184221).

Ζεύγη εκκινητικών μορίων	Συνθήκες της αντίδρασης της PCR.
71935 / EUC2	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 1 min Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 72°C για 1 min } 35 κύκλοι
S ₂ 107 / S ₂ 872, UG23 / UC15, S ₂ 48 / S ₂ 911	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 15sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74°C για 20sec } 40 κύκλοι
S ₂ 97 / S ₂ 598	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74°C για 20sec } 40 κύκλοι
S ₃ 64 / S ₂ 380	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 30 sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 50°C για 30 sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74°C για 1min } 40 κύκλοι
UG16 / UC12	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 53°C για 10sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74°C για 20sec } 40 κύκλοι
S ₁ 42 / S ₁ 952	Θερμοκρασία αποδιάταξης: 95°C για 20sec Θερμοκρασία υβριδοποίησης: 58°C για 30sec Θερμοκρασία επιμήκυνσης: 74°C για 1min } 35 κύκλοι

Πίνακας 1.5. Οι συνθήκες που επικράτησαν για τη διεκπεραίωση της αντίδρασης.

RFLP (Ανάλυση πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα).

Τα προϊόντα της PCR που αναλύθηκαν με τη μέθοδο του RFLP ήταν αυτά που ενισχύθηκαν από τα ζεύγη των εκκινητικών μορίων UG23 / UC15 και UG16 / UC12, δηλαδή τμήματα των περιοχών 2C και 3C/D του γενόματος των πολιοϊών. Με αυτή την ανάλυση θα ανιχνεύσουμε τυχόν ανασυνδυασμούς. Τα περιοριστικά ένζυμα κόβουν σε συγκεκριμένες περιοχές (Πίνακας 1.6) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας στο υπό εξέταση δείγμα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχθηκαν με τη βοήθεια του αλγοριθμικού προγράμματος GeneRunner (βλέπε παρακάτω) και σύμφωνα με την αλληλουχία των πρότυπων γενότυπων των εμβολιακών στελεχών Sabin. Έτσι για το προϊόν της PCR των primers UG23 / UC15 χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα BstOI, HaeIII, AfaI και HinfI. Ενώ για το προϊόν του ζεύγους UG16 / UC12, τα, BstOI, HaeIII, DpnII και HinfI. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν διαφορετικό για τα περισσότερα ένζυμα περιορισμού. Όλα τα μίγματα των αντιδράσεων τοποθετήθηκαν σε σωληνάκια των 500μl. Έτσι, για τα περιοριστικά ένζυμα HaeIII, AfaI και DpnII, το μίγμα της αντίδρασης αποτελείτο, από 3-4 μl προϊόντος της PCR του κάθε δείγματος, 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) αντίστοιχου για το κάθε ένζυμο, 2 μl περιοριστικού ένζυμου τελικής συγκέντρωσης 10u/ μl και συμπληρώνουμε μέχρι τα 20 μl με d.d.H₂O. Στη συνέχεια το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 2 ώρες. Η ποσότητα που προσθέτουμε από το προϊόν της PCR παραμένει ίδια και για τα άλλα ένζυμα.

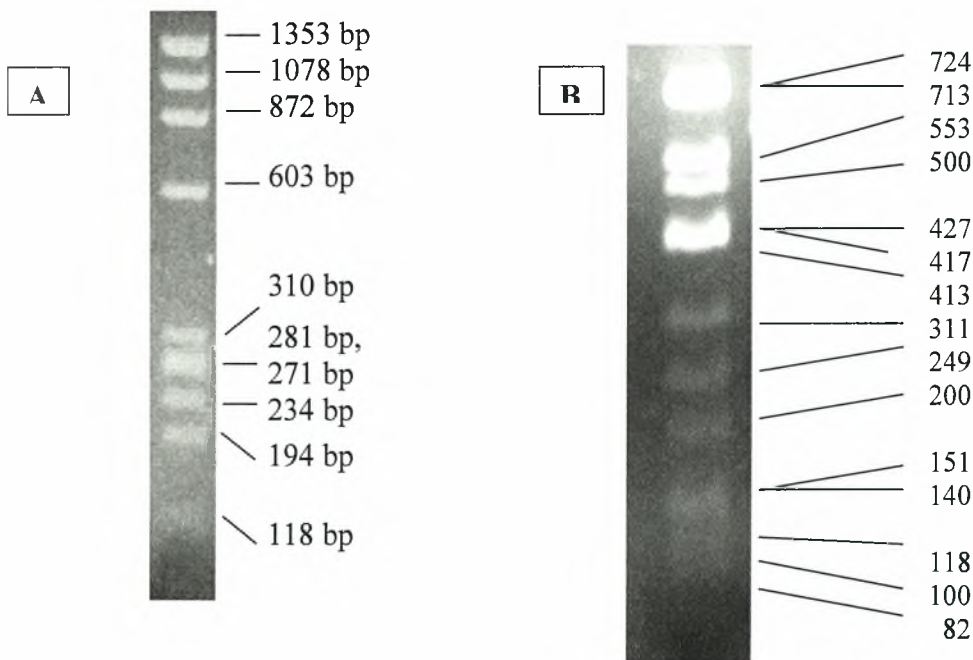
Στην αντίδραση του HinfI προσθέτουμε 2.5 μl ρυθμιστικού διαλύματος και 1.25 μl ένζυμου τελικής συγκέντρωσης 10u/ μl. Και συμπληρώνουμε μέχρι τα 20μl με νερό. Το μίγμα επωάζεται στους 37 °C για 1 ώρα. Στην αντίδραση του BstOI προσθέτουμε 4 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 0.4 μl BSA και 1 μl ένζυμου τελικής συγκέντρωσης 10u/ μl και συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 20μl. Το μίγμα επωάζεται στους 60 °C για 2 ώρες. Με το πέρας της επώασης προσθέτουμε 4 μl Loading Buffer (διάλυμα χρωστικής) ώστε να διακοπεί η δράση των ενζύμων.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ENZYMA	ΘΕΣΗ ΚΟΠΗΣ
BstOI	CC/AGG
HaeIII	GG/CC
AfaI (RsaI)	GT/AC
HinfI	G/ANTC
DpnII	/GATC

Πίνακας 1.6. Τα περιοριστικά ένζυμα και οι αντίστοιχες αλληλουχίες που αναγνωρίζουν για να κόψουν. Το (/) υποδηλώνει το σημείο κοπής. Και (N) οποιαδήποτε βάση.

Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR και του RFLP.

Τα προϊόντα της PCR και του RFLP ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα (gel) αγαρόζης συγκέντρωσης 2%. Συγκεκριμένα, προσθέτουμε την αγαρόζη σε διάλυμα TBE (Tris Boric EDTA). Ο όγκος του διαλύματος καθορίζεται από τις διαστάσεις της βάσης που θα τοποθετηθεί το πήκτωμα. Στην πορεία προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο (1μg/μl) όγκου ανάλογου με αυτού του πηκτώματος, έτσι ώστε να είναι πιο ευδιάκριτες οι μπάντες σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Πριν την πήξη του gel τοποθετούμε την χτένα, έτσι ώστε κατά την πήξη να δημιουργηθούν πηγαδάκια, στα οποία και θα φορτωθούν τα δείγματά μας. Εκτός από τα δείγματα θα φορτώσουμε και ένα μάρτυρα μοριακού βάρους για να είναι εφικτός ο υπολογισμός της μπάντας του υπό εξέταση δείγματος. Έτσι, στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήσαμε το μάρτυρα μοριακού βάρους HaeIII ΦΧ174, ενώ στην ηλεκτροφόρηση των προϊόντων του RFLP τον μάρτυρα μοριακού βάρους HinfI ΦΧ174 (Εικόνα 11.2).



Εικόνα 11.2.A) Ο μάρτυρας μοριακού βάρους HaeIII ΦΧ174, που χρησιμοποιήθηκε και το μοριακό βάρος κάθε ζώνης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Εικόνα 11.2.B) Ο μοριακός μάρτυρας HinfI και τα μοριακά βάρη (σε bp) κάθε ζώνης σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΤΗΣ PCR.

Στα δείγματα που υπήρχε υποψία ανασυνδιασμού ακολούθησε αλληλούχιση του γενώματός τους από το τέλος της VP1 περιοχής μέχρι το τέλος του γονιδιώματός τους. Στην PCR χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ζεύγη εκκινητικών μορίων: S₁42 / S₁952, S₂97 / S₂598, S₃64 / S₂380, S₂48 / S₂911, S₂107 / S₂872, 71935 / EUC2 και UG23 / UC15. Τα δείγματα αλληλουχήθηκαν στην εταιρεία MacroGen στην Κορέα.

ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕ ΑΛΓΟΡΙΘΜΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ.

Για τη μελέτη και επεξεργασία, τόσο των αποτελεσμάτων του RFLP, όσο και των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω προγράμματα πληροφορικής:

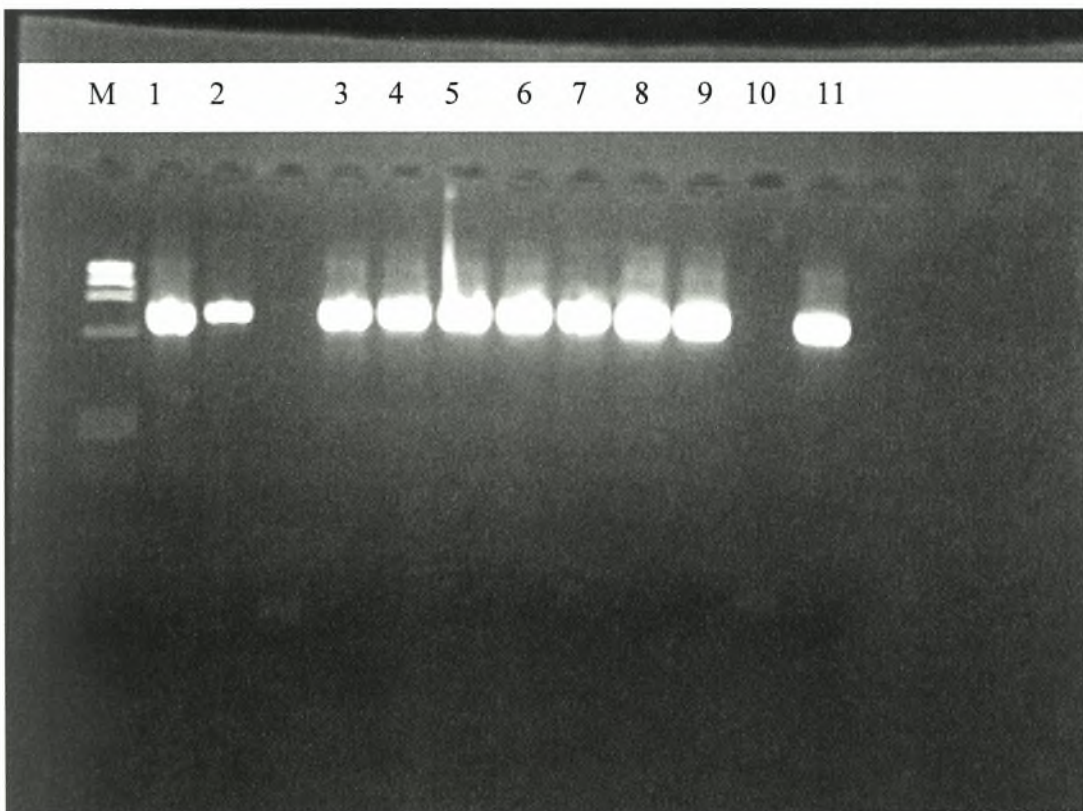
- **GelPro** : Το συγκεκριμένο αλγοριθμικό πρόγραμμα δίνει τη δυνατότητα στον χρήστη να επεξεργαστεί εικόνες ηλεκτροφόρησης πηκτώματος.
- **Gene Runner V. 3.05** : Είναι ένα πρόγραμμα πολλών δυνατοτήτων. Μπορεί να μας δείξει ποια ένζυμα περιορισμού μπορούν να κόψουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία, και σε ποια σημεία ακριβώς (είτε με απεικόνιση πάνω στην αλληλουχία, είτε με απεικόνιση περιοριστικού χάρτη) και ακόμα ποιοι τα προμηθεύουν στην αγορά. Επίσης με την εισαγωγή της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας μπορεί να τη μεταφράσει στην αντίστοιχη αμινοξική.
- **Clustalw** : Το πρόγραμμα αυτό επιτρέπει στον χρήστη να κάνει πολλαπλή στοίχιση και σύγκριση νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα διατίθεται στο διαδίκτυο στη σελίδα: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/> (EMBL-EBI).
- **SimPlot** : Το πρόγραμμα αυτό απεικονίζει γραφικά τη σύγκριση αλληλουχιών νουκλεοτιδίων επιτρέποντας έτσι την εμφάνιση τυχόν ανασυνδυασμών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

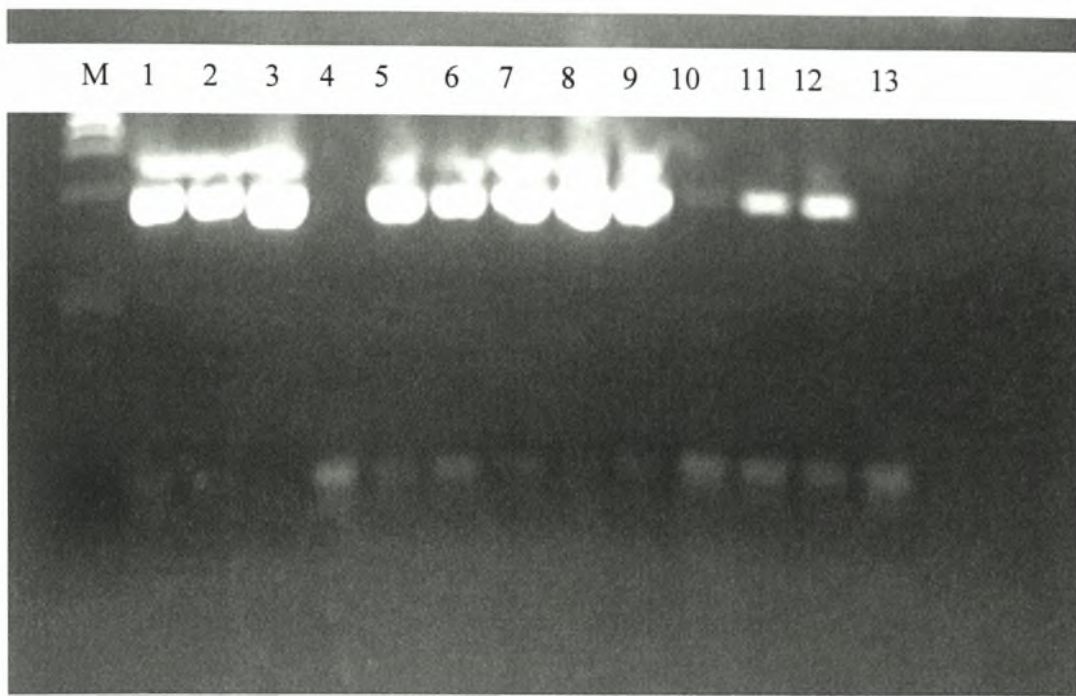
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR.

Επειδή, όπως προαναφέραμε οι περισσότεροι ανασυνδυασμοί έχουν κυρίως εντοπιστεί στις κωδικές περιοχές 2C και 3D (Georgoroulou, A. and Markoulatos, P., 2001), έτσι και εμείς αρχικά προσπαθήσαμε να εντοπίσουμε αν τυχόν υπήρχαν ανασυνδυασμοί στα δείγματά μας σε αυτές τις περιοχές με τη μέθοδο της RT-PCR-RFLP.

Αρχικά, έπρεπε να δημιουργήσουμε πολλά αντίγραφα αυτών των περιοχών για να μπορέσουμε να συνεχίσουμε με τη μέθοδο πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων PCR με περιοριστικά ένζυμα. Έτσι, χρησιμοποιήσαμε τα ζεύγη εκκινητικών μορίων *UG23 / UC15* και *UG16 / UC12* για τις κωδικές περιοχές 2C και 3 C-D αντίστοιχα (Πίνακας 1.4). (εικόνες 12.1 και 12.2) και ακολουθώντας τις συνθήκες του Πίνακα 1.5 πήραμε τα αποτελέσματα που παρατίθενται στις παρακάτω φωτογραφίες ηλεκτροφόρησης προϊόντων PCR.



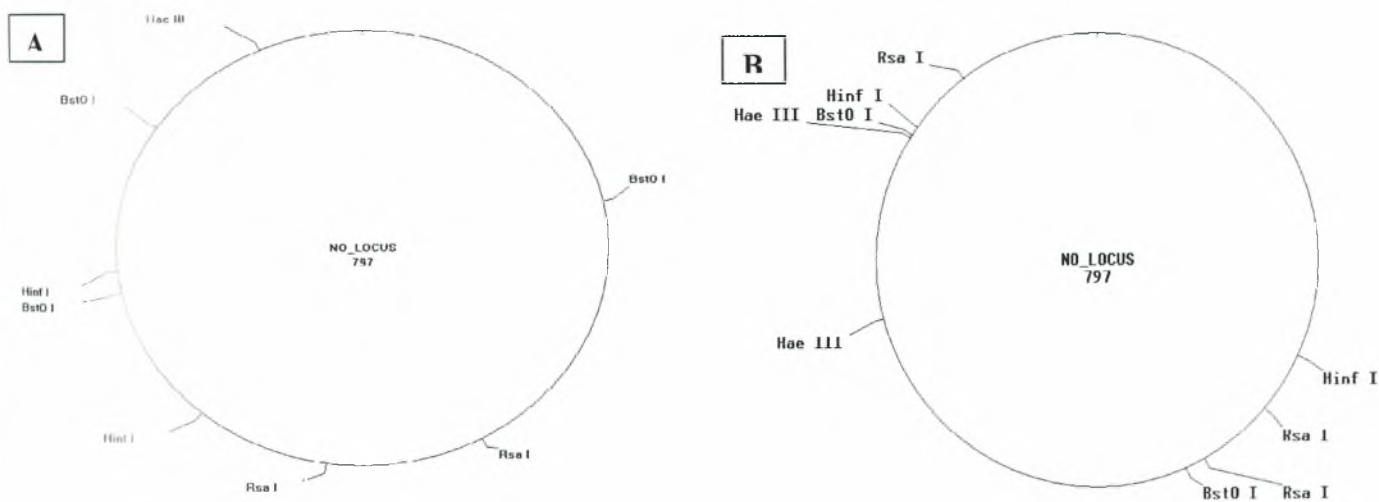
Εικόνα 12.1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων (797 bp) PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα *UG23 / UC15*. Στη θέση M έχουμε τον μάρτυρα μοριακού βάρους *HaeIII* ΦΧ174. Στις θέσεις 1-9 έχουμε αντίστοιχα τα περιβαλλοντικά δείγματα, σε σειρά : 372, 712, 152, 536, 444, 738, 742, 750, και 584. Στις θέσεις 10 και 11 βρίσκονται ο αρνητικός και ο θετικός μάρτυρας αντίστοιχα.

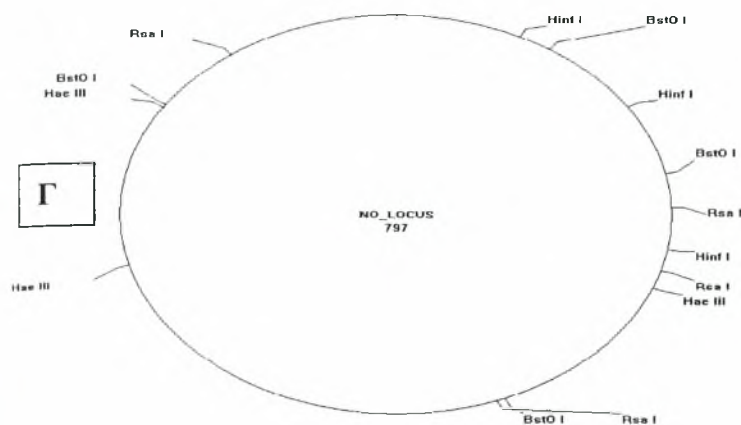


Εικόνα 12.2. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων (596 bp) PCR με ζεύγος εκκινητικών μορίων τα *UG16* / *UC12*. Στη θέση M έχουμε τον ίδιο μάρτυρα μοριακού βάρους με την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση. Στις θέσεις 1-9 βρίσκονται τα προϊόντα των δειγμάτων με την ίδια σειρά. Στις θέσεις 10-12 έχουμε τρεις διαφορετικούς θετικούς μάρτυρες και στη θέση 13 είναι ο αρνητικός μάρτυρας.

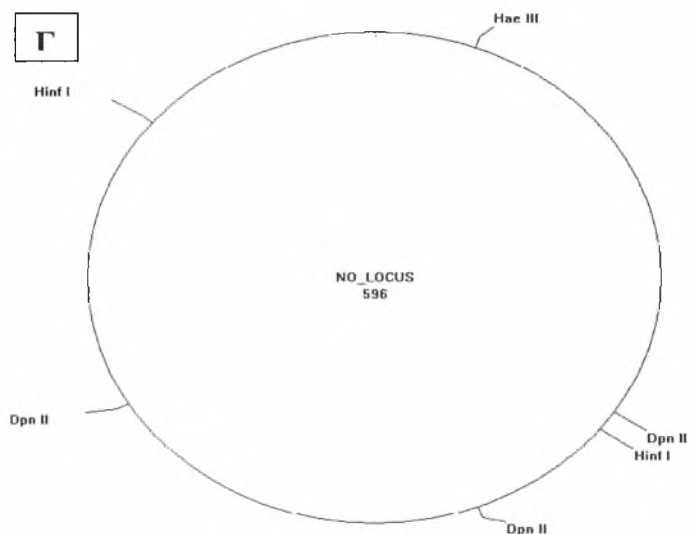
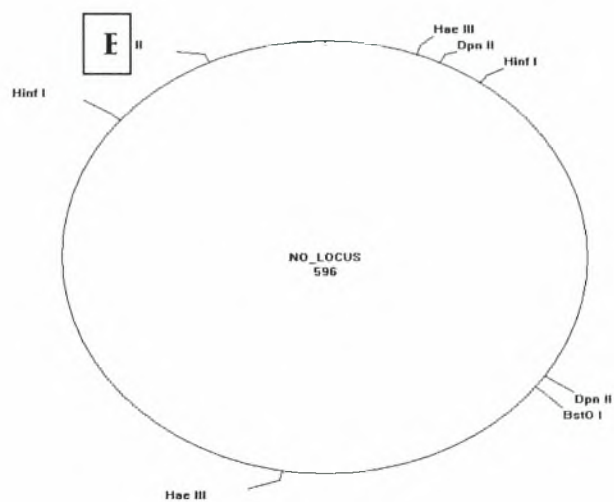
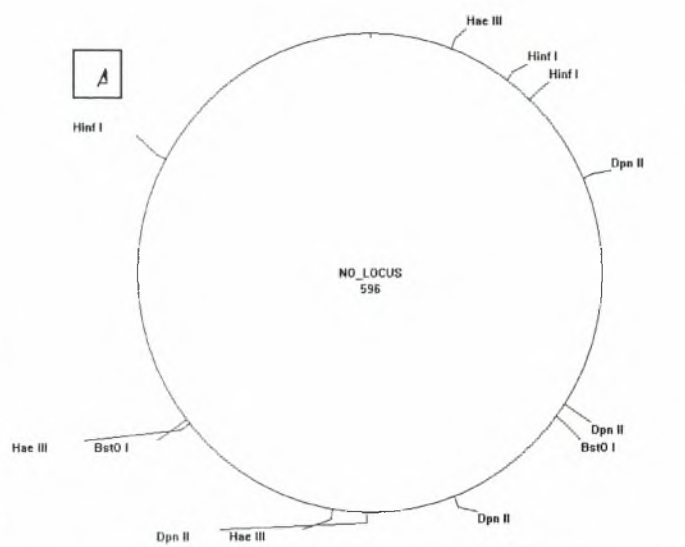
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ RFLP.

Αφού, με το αλγοριθμικό πρόγραμμα Gene Runner βρήκαμε τα ένζυμα περιορισμού για την κάθε κωδική περιοχή, με το ίδιο πρόγραμμα σχεδιάσαμε τους αντίστοιχους περιοριστικούς χάρτες που είναι χαρακτηριστικοί για τον κάθε γενότυπο των εμβολιακών στελεχών (Sabin) και παράλληλα με τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης μπορούσαμε να αποφανθούμε για τον γενότυπο του εκάστοτε δείγματος στην εκάστοτε κωδική περιοχή.





Εικόνα 12.3. Περιοριστικοί χάρτες της κωδικής περιοχής 2C. Α) Sabin 1, Β) Sabin 2, Γ) Sabin 3.

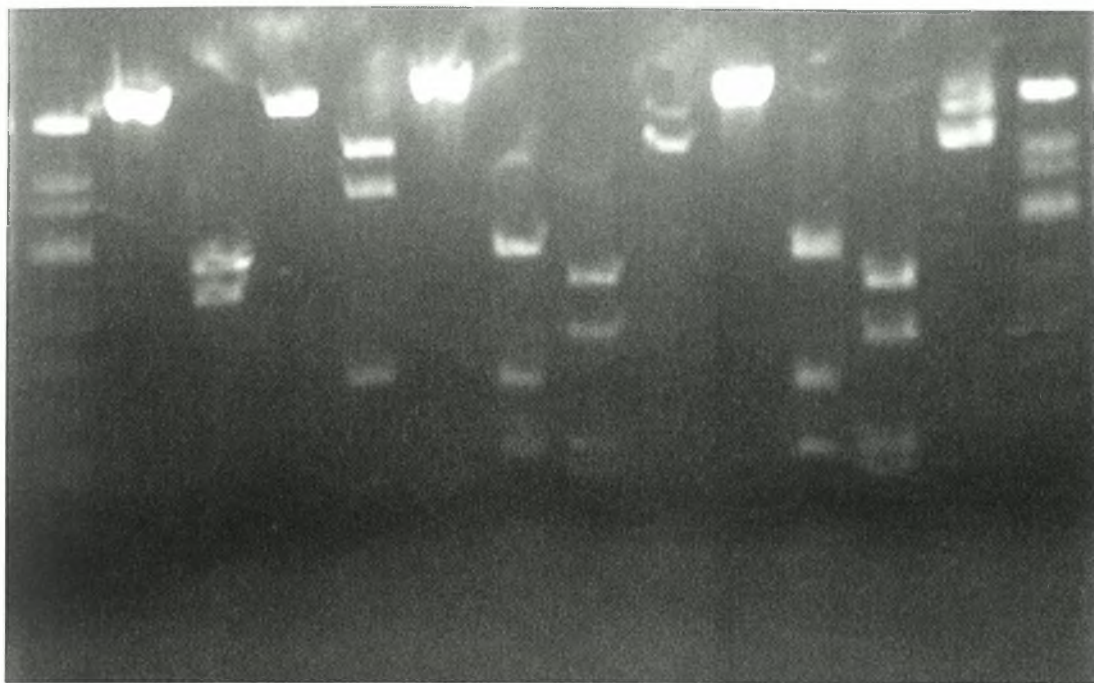


Εικόνα 12.4. Περιοριστικοί χάρτες της κωδικής περιοχής 3C-D. Α) Sabin 1, Β) Sabin 2, Γ) Sabin 3.

Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά κάποιες φωτογραφίες των ηλεκτροφορήσεων RFLP.

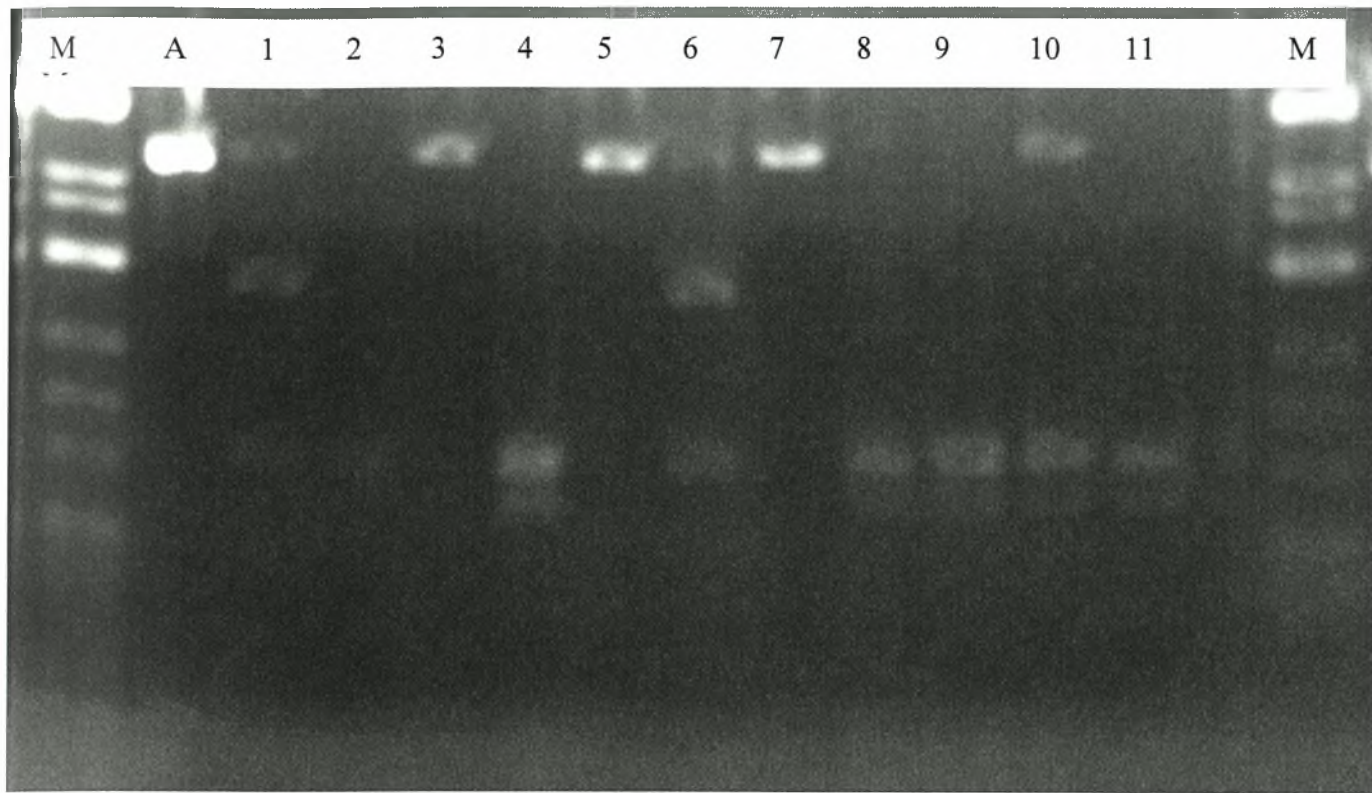
ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 2C.

M A 1 2 3 A 4 5 6 A 7 8 9 M



Εικόνα 12.5. Ανάλυση RFLP των δειγμάτων 152 (1-3), 444 (4-6) και 738 (7-9). Στις θέσεις 1, 4 και 7 το κόψιμο έχει γίνει με το ένζυμο AfaI (RsaI), στις θέσεις 2, 5, 8 με το ένζυμο HaeIII, και στις θέσεις 3, 6, 9 με το ένζυμο HinfI. M είναι ο μοριακός μάρτυρας βάρους HinfI ΦΧ174 και A είναι το άκοπο αντίστοιχο δείγμα.

ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ 3C-D



Εικόνα 12.9. Ανάλυση RFLP με το περιοριστικό ένζυμο BstOI. Στις θέσεις 4-11 βρίσκονται σε σειρά τα κομμένα πλέον δείγματα : 372, 712, 152, 444, 738, 742, 750, και 584. Στις θέσεις 1 έως 3 έχουμε τα αντίστοιχα πρότυπα εμβολιακά στελέχη και των τριών γενότυπων που έχουν αναπτυχθεί σε κύτταρα RD. Το Μ είναι ο μοριακός μάρτυρας και το Α το άκοπο.

Στον πίνακα 1.6 παραθέτονται τα αποτελέσματα RFLP για τις περιοχές 5UTR (αποτελέσματα από προηγούμενη εργασία), 2C και 3D, καθώς και ο γενότυπος των στελεχών στις συγκεκριμένες περιοχές

Δείγμα τα	2C			3C-D				ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ		
	<i>UG23/UC15</i> (797 bp)			<i>UG16/UC12</i> (596 bp)				5'-UTR	2C	3C-D
<i>HaeIII</i>	<i>AfaI</i>	<i>HinfI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>DpnII</i>	<i>BstOI</i>				
372	565,127, 105	380,29 0,82,4 5	422,255,120	280,213, 69,34	422,10 2,60,1 2	296,110, 94,59, 37	211, 210, 175	S2	S2	S2
712	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	562,34	300,21 2,84	204,200, 133,59	No cut	S3	S3	S3
152	742,55	379,33 5,83	489,213,95	282,280, 34	452,84 , 60	349,161, (43) ²	386 ,210	S1	S1	S1
536	742,55	379,33 5,83	489,213,95	282,280, 34	452,84 , 60	349,161, (43) ²	386 ,210	S1	S1	S1
444	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	562,34	300,21 2,84	204,200, 133,59	No cut	S3	S3	S3
738	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	280,213, 69,34	422,10 2,60,1 2	296,110, 94,59, 37	211, 210, 175	S3	S3	S2
742 ⁺	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	280,213, 69,34	422,10 2,60,1 2	296,110, 94,59, 37	211, 210, 175	S1	S3	S2
750	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	562,34 + 280,213, 69,34	300,21 2,84	204,200, 133,59	No cut	S3	S3	S3
584 ⁺	318,247, 127,105	364,19 4,116, 82,41	576,95,67,59	280,213, 69,34	422,10 2,60,1 2	296,110, 94,59, 37	211, 210, 175	S3	S3	S2

Πίνακας 1.6. Αποτελέσματα της ανάλυσης πολυμορφισμού τμημάτων προϊόντων της PCR με περιοριστικά ένζυμα.

+ κοπή και με το ένζυμο *BstOI* στην κωδική περιοχή 2C (επαλήθευση των ήδη υπάρχοντων αποτελεσμάτων).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ.

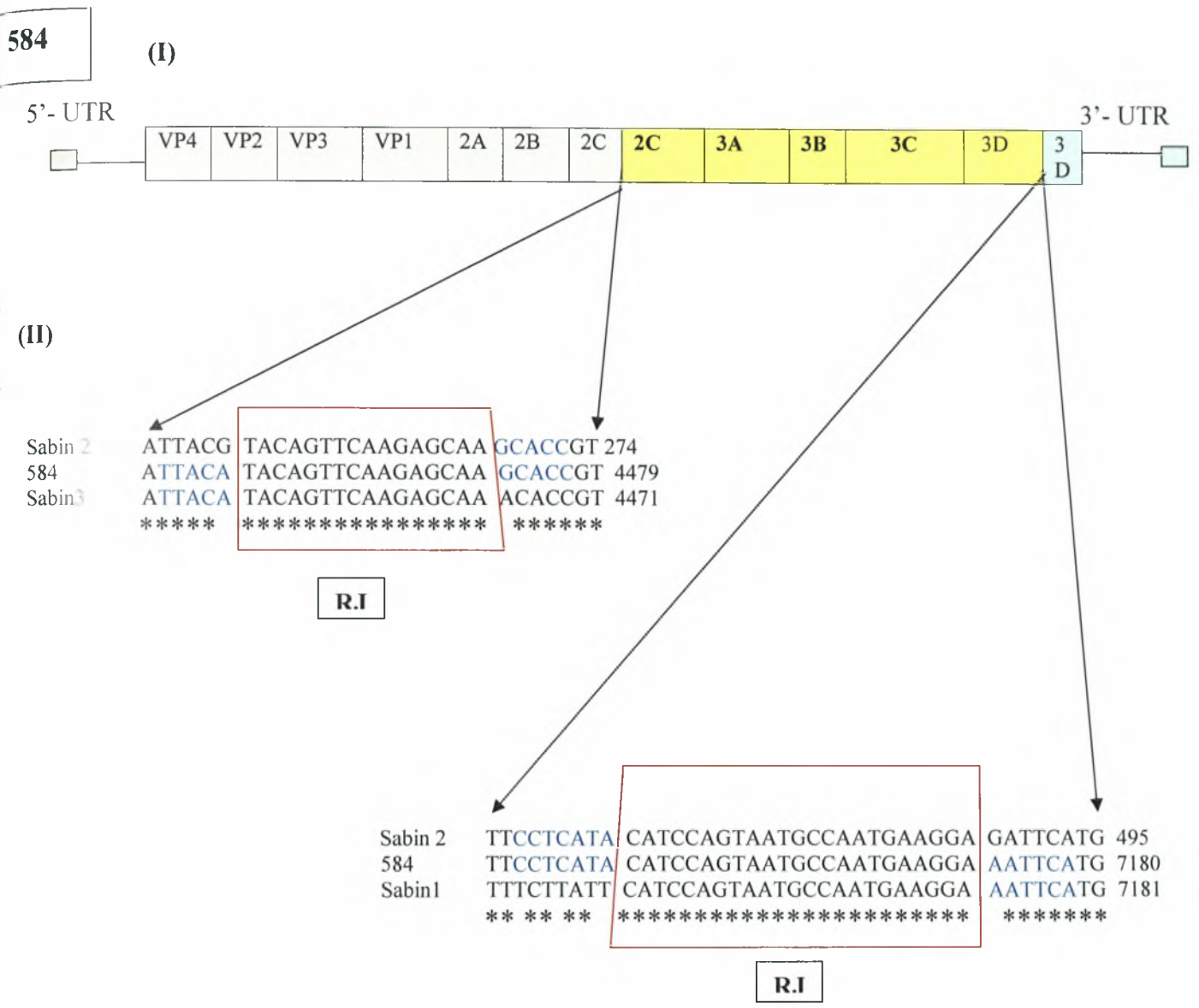
Τα δείγματα που παρουσίασαν υποψία ανασυνδυασμού (738, 742 και 584) αλληλουχήθηκαν από το τέλος της VP1 μέχρι το τέλος της 3'-μη κωδικής περιοχής (σχεδόν τα 2/3 του γενώματος των πολιοϊών, περίπου 4200 b.p), έτσι ώστε να επιβεβαιώσουμε τον ανασυνδυασμό, καθώς και να εντοπίσουμε τον "κόμβο" του ανασυνδυασμού (recombination junction), (Εικόνα 12.10. Α, Β και Γ).

Παρόλο αυτά, εκτός από στις ανασυνδυασμούς παρατηρήσαμε και μεταλλάξεις και στα τρία δείγματα (Πίνακας 1.7)

ΔΕΙΓΜΑΤΑ	Γενότυπος στην εκάστοτε κωδική περιοχή	ΚΩΔΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ	ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ	ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ
584	Sabin 2	3A	T 5214 C A 5248 G T 5259 A	--- T 46 A ---
		3B	A 5393 G	N 8 S
		3C	A 5967 G	---
		3D	A 6153 G	---
742	Sabin 3	2B	T 3964 C A 4060 G	--- ---
	S 3 / S 2	2C	A 5029 G	I 303 V
738	Sabin 3	2A	A 3393 G	N 6 S
	Sabin 2	2C	A 4796 G	T 228 A
	Sabin 1	3D	A 7042 G	L 361 F

Πίνακας 1.7. Μεταλλάξεις που βρέθηκαν στα 3 περιβαλλοντικά δείγματα. Με (---) και κόκκινο χρώμα συμβολίζονται οι σιωπηλές μεταλλάξεις (silent mutations). Με πράσινο χρώμα οι ουδέτερες μεταλλάξεις (neutral mutations). Και με μπλε χρώμα οι μεταλλάξεις χωρίς νόημα (missense mutations).

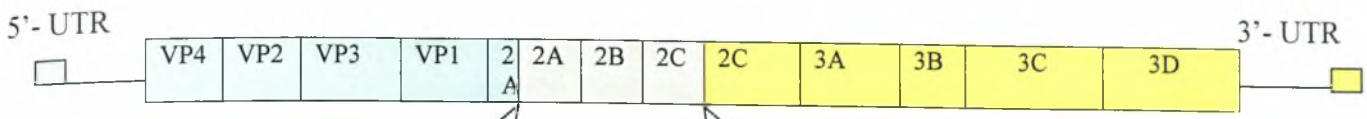
Εκτός, του δείγματος 742 που με τη μέθοδο RFLP εμφάνιζε διπλό ανασυνδυασμό και επιβεβαιώθηκε με την αλληλούχιση και τα άλλα δύο δείγματα αποδείχθηκε ότι εμφάνιζαν επίσης διπλό ανασυνδυασμό. Στην παρακάτω εικόνα απεικονίζονται οι ανασυνδυασμοί στις, καθώς και τα κομβικά σημεία των ανασυνδυασμών.



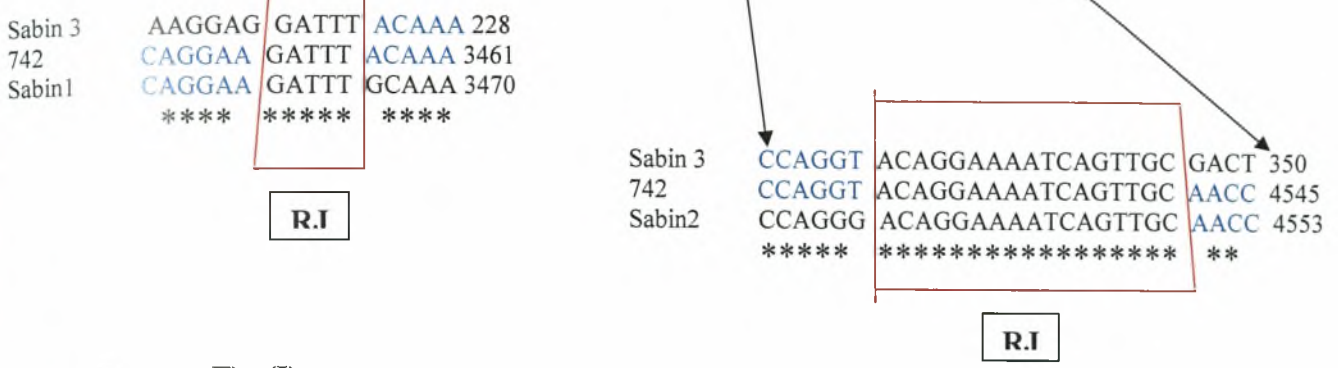
Εικόνα 12.10. A) (I) Απεικόνιση του γενώματος του περιβαλλοντικού δείγματος 584 με στις ομόλογους ανασυνδυασμένους γενότυπους. Με γκρι χρώμα έχουμε γενότυπο Sabin 3, με κίτρινο Sabin 2 και με σιέλ Sabin 1. (II) Με βέλος δείχνονται τα σημεία ανασυνδυασμού. Μέσα στα κόκκινα πλαίσια βρίσκονται τα recombination junctions (RJ) και με μπλε χρώμα υποδεικνύεται ο γενότυπος που έχει το δείγμα στις πριν και μετά από αυτά τα κομβικά σημεία. Επομένως τα recombination junctions βρίσκονται στις θέσεις 4456-4472 και 7150-7173 και το 584 έχει διπλό ανασυνδυασμό στις μορφές Sabin 3 / Sabin 2 / Sabin 1.

742

B). (I)

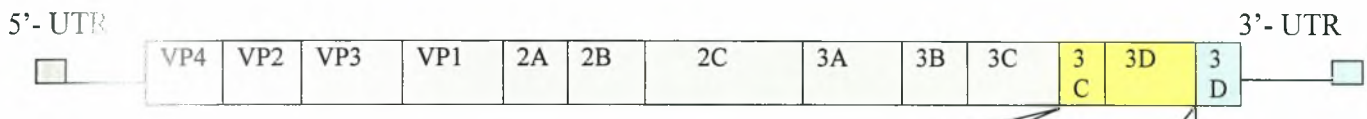


B).(II)

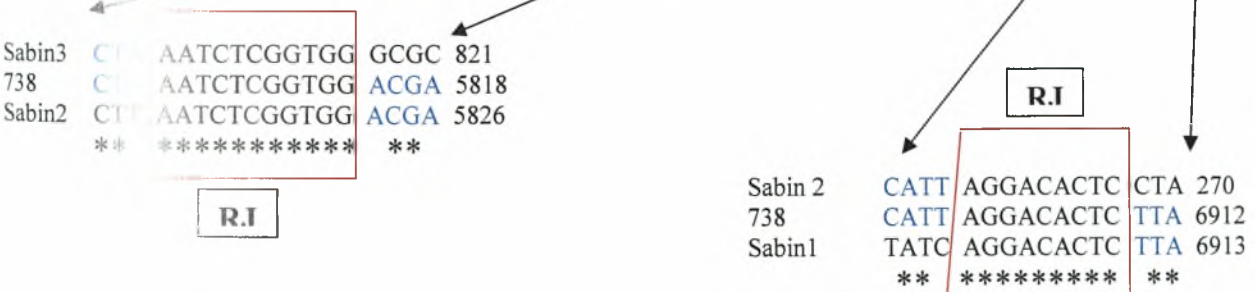


738

Γ). (I)



Γ). (II)

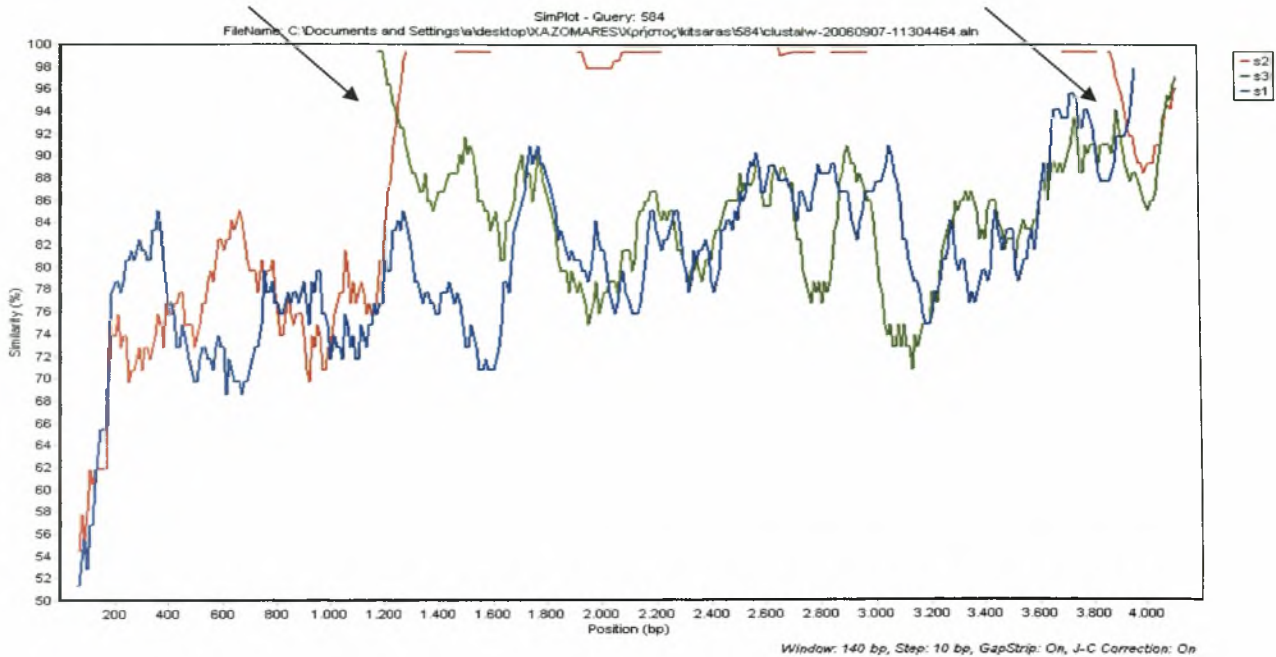


Εικόνα 12.10. B) (I) Απεικόνιση του γονότυπου του 742 (τα χρώματα αντιπροσωπεύουν στις στις γενότυπους με την προηγούμενη εικόνα). Επομένως εμφανίζει διπλό ανασυνδυασμό στις μορφές Sabin 1 / Sabin 3 / Sabin 2. (II) Τα κομβικά σημεία του διπλού ανασυνδυασμού του δείγματος 742 βρίσκονται αντίστοιχα στις θέσεις 3451-3456 και 4510-4527.

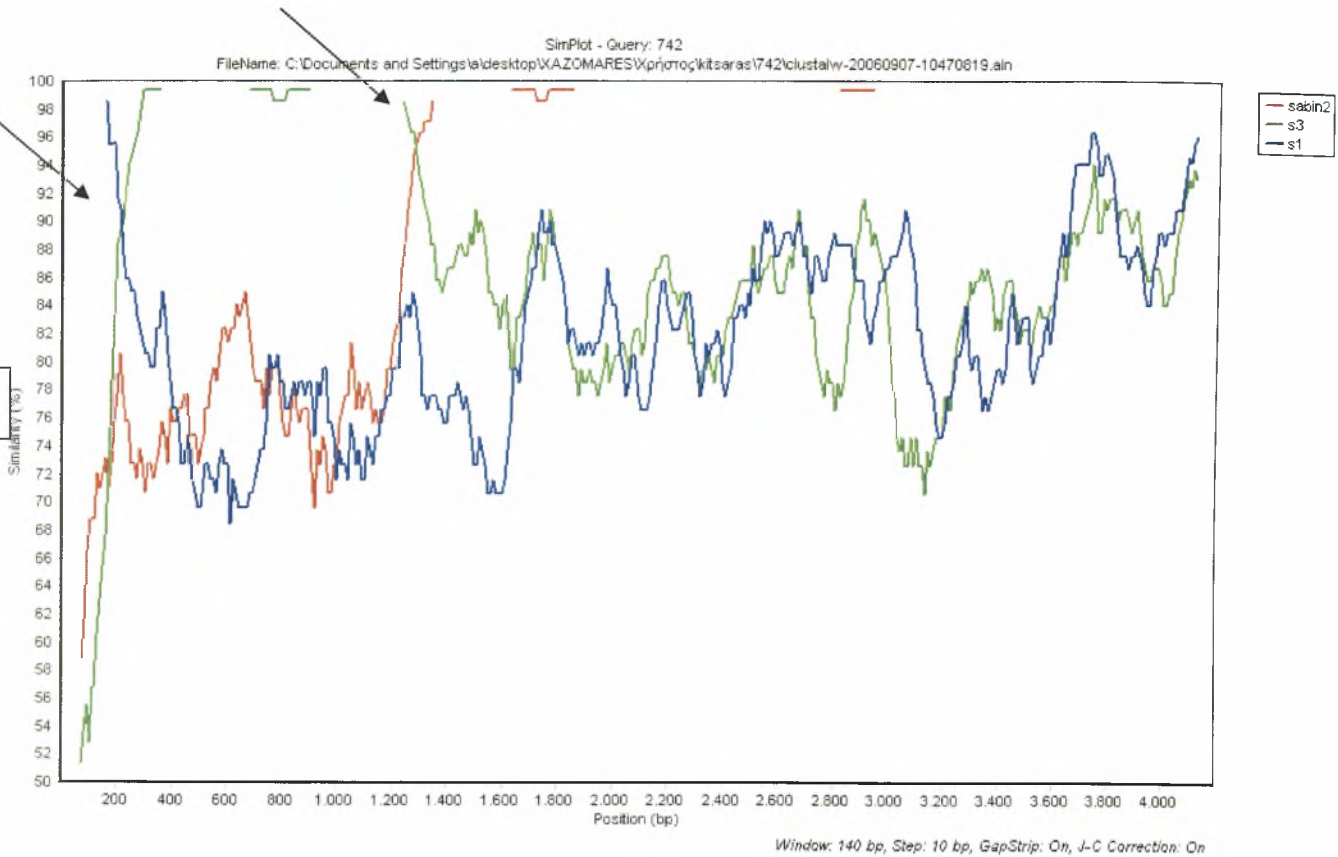
Γ. (I) Απεικόνιση του γονότυπου του 738 που εμφανίζει διπλό ανασυνδυασμό στις μορφές Sabin 3 / Sabin 2 / Sabin 1. (II) Τα recombination junctions (RJ) βρίσκονται αντίστοιχα στις θέσεις 5803-5814 και 6900-6909.

Από τους τρεις διπλούς ανασυνδυασμούς μεγαλύτερη σημασία κατέχει αυτός του δείγματος 742, διότι πρώτον, είναι σπάνιος τέτοιας μορφής ανασυνδυασμός, και δεύτερον, γιατί είναι πολύ σπάνιο να συμβεί ανασυνδυασμός στην κωδική περιοχή 2A.

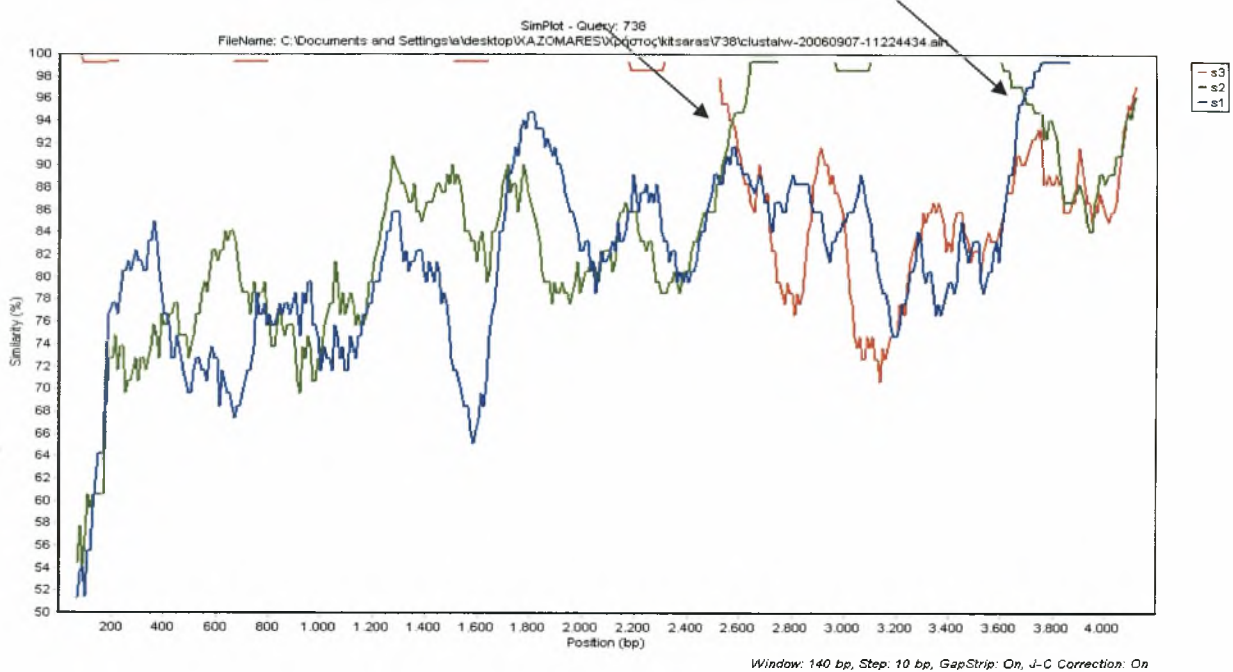
A



B



Γ



Εικόνα 12.11. Απεικόνιση Sim Plot. Η απεικόνιση έχει γίνει με βάση το εκάστοτε δείγμα κάθε φορά, το οποίο συγκρίνεται και με τα τρία πρότυπα των εμβολιακών στελεχών (Sabin). Οι γραμμές, με μπλε χρώμα αντιπροσωπεύουν το Sabin 1 και στις τρεις εικόνες. Στις δύο πρώτες με κόκκινο είναι το Sabin 2, ενώ με πράσινο είναι το Sabin 3. Στην τρίτη εικόνα ισχύει το αντίστροφο. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις, καθώς και η ύπαρξη του ανασυνδυασμού. Στο Α είναι το δείγμα 584, στο Β το 742, και στο Γ το 738.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.

Σε αυτή την εργασία ελέγξαμε μοριακά 9 περιβαλλοντικά δείγματα που είχαν ταυτοποιηθεί ως εμβολιακά στελέχη (Sabin) στο εργαστήριο του τμήματος ιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Pasteur. Τα δείγματα αυτά είχαν απομονωθεί από την ευρύτερη περιοχή του λεκανοπεδίου της Αττικής τη χρονική περίοδο 1975-1988. Στόχος της εργασίας ήταν η ανίχνευση ανασυνδυασμών και ο πιθανός ρόλος των ανασυνδιασμών στη βιωσιμότητα των στελεχών αυτών.

Οι ανασυνδυασμοί στο γένωμα των πολιοϊών έχει βρεθεί ότι εμφανίζονται κυρίως στις κωδικές περιοχές των λειτουργικών πρωτεϊνών, και συγκεκριμένα πιο συχνά στις περιοχές 2C και 3D (Georgoroulou, A. and Markoulatos, P., 2001), ενώ στις κωδικές περιοχές των δομικών περιοχών δεν έχουν βρεθεί ανασυνδυασμοί, παρά μόνο προς το τέλος της VP1, χωρίς όμως να παρατηρείται καμιά αλλαγή στην αντιγονικότητα αυτής της πρωτεΐνης (Blomqvist et al., 2003; Martin et al., 2002). Έτσι, αρχικά σχεδιάσαμε δύο διαφορετικές μεθόδους RT-PCR-RFLP αντίστοιχες για την κάθε περιοχή. Τα αποτελέσματα που πήραμε ήταν ιδιαίτερης σημασίας, διότι τρία από τα δείγματα εμφάνιζαν διπλό ανασυνδυασμό, και ένα από αυτά, το 742, είχε διπλό ανασυνδυασμό τύπου S1/ S3/ S2, που είναι πολύ σπάνιος (Πίνακας 1.6).

Το επόμενο βήμα ήταν να αλληλουχίσουμε αυτά τα δείγματα για να βρούμε που βρίσκονται συγκεκριμένα οι ανασυνδυασμοί, καθώς και την ολιγονουκλεοτιδική αλληλουχία των κομβικών σημείων των ανασυνδυασμών (Recombination Junctions, RJ). Έτσι, αλληλουχίσαμε το γένωμα τους από το τέλος της VP1 ως το τέλος της 3'-μη κωδικής περιοχής, περίπου 4200 b.p (1/3 του γονιδιώματος των πολιοϊών). Τελικά, αποδείχτηκε ότι και τα τρία δείγματα είχαν διπλό ανασυνδυασμό. Τα δύο δείγματα, 738 και 584 είχαν διπλό ανασυνδυασμό τύπου S3/ S2/ S1, και ο δεύτερος ανασυνδυασμός εμφανίζεται προς το τέλος της 3D κωδικής περιοχής. Τέτοιοι ανασυνδυασμοί έχουν βρεθεί αρκετοί και είναι συχνοί (Martin et al., 2002, Cuervo et al., 2001). Όσον αφορά το δείγμα 742 το αξιοπερίεργο είναι ότι ο πρώτος ανασυνδυασμός εντοπίστηκε στις αρχές της 2A κωδικής περιοχής, που είναι ένα γεγονός πολύ σπάνιο για να συμβεί (Εικόνες 12.10 και 12.11). Όλοι οι ανασυνδυασμοί που βρέθηκαν ήταν ομόλογοι.

Επιπλέον, σε αυτά τα τρία δείγματα βρέθηκαν και μεταλλάξεις. Αρκετές από αυτές ήταν σιωπηλές μεταλλάξεις (χωρίς νόημα) (silent mutations), (μόνο στα δείγματα 584 και 738), όπου έχουμε αλλαγή του πρότυπου αμινοξέος από άλλο αμινοξύ που φέρει διαφορετικές ιδιότητες. Αυτό μάλλον συμβαίνει λόγω της φυσικής επιλογής, διότι όπως θα αναφέρουμε και παρακάτω αυτά τα στελέχη είναι βιώσιμα, άρα και οι πρωτεΐνες τους είναι λειτουργικές. Αυτές οι μεταλλάξεις πιθανόν συμβαίνουν για να προσδώσουν βιοτικό πλεονέκτημα σε αυτά τα στελέχη.

Όλα τα αποτελέσματα βρέθηκαν με τη βοήθεια του αλγοριθμικού προγράμματος ClustalW και η απεικόνιση των ανασυνδυασμών, έτσι ώστε να είναι πιο εμφανείς και κατανοητοί με το πρόγραμμα SimPlot.

Παρόλο αυτά, δεν έχουμε πολλές πληροφορίες για την κλινική εικόνα αυτών των στελεχών, καθώς και για τα μη ανασυνδυασμένα. Το μόνο βέβαιο είναι ότι και τα 9 στελέχη είναι βιώσιμα και αυτό γιατί, για να εντοπιστούν στο περιβάλλον θα πρέπει να έχουν εκκριθεί από τον άνθρωπο. Από εκεί και πέρα δεν γνωρίζουμε το βαθμό της νευρομολυσματικότητας. Είναι γνωστό, ότι εμβολιακά στελέχη εκκρίνονται και από υγιείς ανθρώπους, αλλά και από ασθενείς της νόσου της εμβολιοσυνδεόμενης παραλυτικής πολιομυελίτιδας (VAPP), (Blomqvist et al., 2003; Karakasiliotis et al., 2004; Guillot et al., 2000). Από την άλλη όμως, η ύπαρξη ελεύθερων κυκλοφορούντων εμβολιακών στελεχών στο οικείο περιβάλλον μιας ανθρώπινης κοινωνίας είναι το κύριο ενδεικτικό στοιχείο που υποδεικνύει την πιθανότητα ύπαρξης της ασθένειας (CDC, 2002). Βέβαια τα συγκεκριμένα στελέχη δεν έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν επιδημία, διότι οι πολιοϊοί μεταδίδονται από άνθρωπο σε άνθρωπο (Metcalf et al., 1995; Yoshida et al., 2002). Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι ο έλεγχος του περιβάλλοντος για πολιοϊούς ότι είναι ένας δείκτης ύπαρξης του ιού μέσα στον ανθρώπινο πληθυσμό που βρίσκεται σε αυτό το περιβάλλον. Γι' αυτό για να εξαλειφθούν τελείως τα στελέχη των πολιοϊών (αγρίου και εμβολιακού τύπου) από τις ανθρώπινες κοινωνίες και από το οικείο τους περιβάλλον θα πρέπει να αντικατασταθεί το εμβόλιο OPV από το IPV (Yoshida et al., 2002), έτσι ώστε να αποκλειστεί οποιαδήποτε πιθανότητα πρόκλησης της νόσου. Παραδείγματος χάριν, στην Ελλάδα η χορήγηση του εμβολίου OPV έχει αντικατασταθεί από το IPV από το έτος 2004. Αυτό όμως, δεν σημαίνει ότι ο περιβαλλοντικός έλεγχος πρέπει να σταματήσει, αντ' αυτού πρέπει να είναι τακτικός [συγκεκριμένα για την Ελλάδα τις εποχές του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, όπου η δράση των πολιοϊών ευνοείται (Georgoroulou et al., 2000)]. Μόνο με αυτό τον τρόπο μπορούμε να αποκλείσουμε όλες τις πιθανότητες ύπαρξης πολιοϊών σε μία συγκεκριμένη κοινότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agol V.I., Paul A.V. , Wimmer E.(1999).** Virus Research, Paradoxes of the replication of picornaviral genomes, *Vol(62 p.129-147.*
- Ansardi D., D. Porter, M. Anderson, and C. Morrow. 1996.** Poliovirus assembly and encapsidation of genomic RNA. *Adv. Virus Res.* 46:1-68.
- Barco A., Carrasco L. (1995).** A human virus protein, poliovirus protein 2BC, induces membrane proliferation and blocks the exocytic pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14: 3349-64.
- Barton D.J., O' Donnell B.J., Flanagan J.B.(2001),** 5' cloverleaf in poliovirus RNA is a *cis*-acting replication element required for negative-strand synthesis. *The EMBO J.*20(6):1439-1448.
- Bellmunt, A., May, G., Zell, R., Pring-Akerblom, P., Verhagen, W., Heim, A. (1999)** Evolution of poliovirus type 1 during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *Virology* 265: 178-184.
- 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.
- Blume, S., Geesink,I. (2000)** A brief history of polio vaccines. *Science* 288: 1593-1594.
- Boussadia O., Niepmann M., Creancier L., Prats A.C., Dautry F., Jacquemin-Sablon H. (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.
- Brown D.M., Kauder S.E., Cornell C.T., Jang G.M., Racaniello V.R., Semler B.L. (2004).**Cell-Dependent Role for the Poliovirus 3' Noncoding Region in Positive –Strand RNA Synthesis. *J.Virol.*78(3):1344-1351.
- Buonagurio, D.A., Coleman, J.W., Patibandla, S.A., Prabhakar, B.S., Tatem, J.M. (1999)** Direct detection of Sabin poliovirus vaccine strains in stool specimens of first dose-vaccines by a sensitive reverse transcription-PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 283-289.
- by the RNA Polymerase of Poliovirus.*J.Biol Chem.* 278(45):43951-43960..
- Caro V., Guillot S., Delpeyroux F., Crainic R. (2001).** Molecular strategy for 'serotyping' of human enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82: 79-91.
- 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.
- Casas I., Palacios, G.F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M.C., Tenorio,A. (2001)** Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2,VP1 and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products. *Journal of Medical Virology* 65: 138-148.
- Centers for Disease Control and Prevention (2002).** Global progress toward laboratory containment of wild polioviruses. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 51: 993-996.
- Centers for Disease Control and Prevention (2002).** Progress toward global eradication of poliomyelitis, 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 51: 253-256.
- Centers for Disease Control and Prevention (2003).** Progress toward poliomyelitis- eradication- South Africa, 2001-March 2003. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 52: 521-524.

- Cherkasova, E.A., Korotkova, E.A., Yakovenko, M.L., Ivanova, O.E., Ereemeeva, T.P., Chumakov, K.M., Agol, V.I. (2002)** Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *Journal of Virology* 76 : 6791-6799.
- Chow M., Newman J.F.E., Filman D., Hogle J.M., Rowlands D.J. and Brown F. (1987).** Myristylation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature (London)* 327: 482-486
- critical for ribosomal scanning. *The EMBO Journal* 22(8): 1909-1921.
- 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.
- Doedens J.R., Giddings T.H. Jr, Kirkegaard K. (1997).** Inhibition of endoplasmic reticulum-to-Golgi traffic by poliovirus protein 3A: genetic and ultrastructural analysis. *J. Virol.* 71: 9054-64.
- Domingo E. and J. J. Holland. 1997.** RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 5:151-178.
- 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.
- Egger, D., Pasamontes, L., Ostemayer, M., Bienz, K. (1995)** Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1442-1447.
- Ehrenfeld E. and Semler B.L. (1995).** Anatomy of the poliovirus internal ribosome entry site. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 203: 65-83.
- Filman D.J., Syed R., Chow M., Macadam A.J. Minor P.D. and Hogle JM. (1989).** Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J.* 8: 1567-79.
- Freistadt M.S., Racaniello V.R. (1991).** Mutational analysis of the cellular receptor for poliovirus. *J. Virol.* 65: 3873-6.
- Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y. , Kew O.M., Agol V.I.(2000)** Evolution of Circulating Wild Poliovirus and of Vaccine Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient : A Unifying Model. *J.Virol.* 7(16):7381-
- Georgescu M., Balanant J., Ozden S., Crainic R.(1997).**Random selection a model for poliovirus infection of the central nervous system..*J.Gen. Virol.* 78:1819-1828
- Georgopoulou A, Markoulatos P. (2001).** Sabin type 2 polioviruses with intertypic vaccine/vaccine recombinant genomes. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20(11): 792-799.
- 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.*
- Gmyl A. P., Belousov E. V., Maslova S. V., Khitrina E. V., Chetverin A. B., Agol A. I. (1999).** Nonreplicative RNA Recombination in Poliovirus. *J. Virol.* 73(11): 8958 – 8965.
- Grabow, W.O.K., Botma, K.L., de Villiers, J.C., Clay, C.G., Erasmus, B. (1999)** An assessment of cell culture and PCR procedures for the detection of polioviruses in waste water. *Bulletin of the World Health Organization* 77: 973-978.
- Guillot S., Caro V., Cuervo N., Korotkova E., Combiescu M., Persu A., Aubert-Combiescu A., Delpeyroux F., Crainic R. (2000).** Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J. Virol.* 74(18): 8434-43.
- Gulevich A.Y., Yusupova R.A., Drygin Y.F. (2001).** A phosphodiesterase from ascites carcinoma Krebs II cells specifically cleaves the bond between VPg and RNA of encephalomyocarditis virus. *Biochemistry (Mosc).* 66(3): 345-9.

- He Y., Mueller S. Chipman P.R., Bator C.M., Peng X., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R.J., Rossmann G.M. (2003).** Complexes of Poliovirus Serotypes with Their Common Cellular Receptor, CD155. *J. Virol.* 77(8):4827-4835.
- Hellen C.U.T., Wimmer E., Cao X. (1993)** Genetics of poliovirus. *Annual Reviews Genetics* 27: 353-436
- Herold J. and Andino R. (2001).** Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol. Cell* 7: 581-591.
- Hogle, J. M., 2002.** Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 677-702.
- Horie H., Yoshida H., Matsuura K., Miyazawa M., Ota Y., Nakayama T., Doi Y., Hashizume S. (2002).** Neurovirulence of Type 1 Polioviruses Isolated from Sewage in Japan. *Applied Environ. Microbiology.* 68(1):138-142.
- Hovi, T., Lindholm, N., Savolainen, C., Stenvik, M., Burns, C. (2004)** Evolution of wild-type 1 poliovirus in two healthy siblings excreting the virus over a period of 6 months. *Journal of General Virology* 85: 369-377.
- Hovi, T., Stenvik, M., Partanen, H., Kangas, A. (2001)** Poliovirus surveillance by examining sewage specimens. Quantitative recovery of virus after introduction into sewerage at remote upstream location. *Epidemiology of Infection* 127: 101-106.
- Karakasiliotis I., Markoulatos P., Katsorichis T. (2004).** Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol. Cell. Probes.* 18(2): 103-9.
- Kauder S.E. and Racaniello V.R. (2004).** Poliovirus tropism and attenuation are determined after internal ribosome entry. *J. Clin. Invest.* 113: 1743-53.
- Kew O.M., Sutter R.W., Nottay B.K., McDonough M.J., Prevots D.R., Quick L., Pallansch M. A., (1998).** Prolonged Replication of a TYPE 1 Vaccine –Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient. *J. Clin. Microb.* 36(10):2893-2899.
- Kew, O.M., Wright, P.F., Agol, V.I., Delpeyroux, F., Shimizu, H., Nathanson, N., Pallansch, M.A. (2004)** Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bulletin of the World Health Organization.* 82:16-23.
- King A.M.Q., Brown F., Christian P., Hovi T., Hyypia T., Knowles N.J., Lemon S.M., Minor P.D., Palmenberg A.C., Skern T. and Stanway G. (2000).** Picornaviridae. In “ Virus Taxonomy, Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses” (M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, C.H. Calisher, E.B. Carsten, M.K Estes, S.M. Lemon, J. Malinoff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and P.B. Wickner, Eds), pp 657-673 Academic Press, New York, San Diego.
- 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.
- Kirkegaard K. Baltimore D. (1986).** The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47: 433 – 443.
- Li, J., Zhang, L.B., Yoneyama, T., Yoshida, H., Shimizu, H., Yoshii, K., Hara, M., Nomura, T., Yoshikura, H., Miyamura, T., Hagiwara, A. (1996)** Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients. *Archives of Virology* 141: 1047-1054.
- 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.

- Manor, Y., Handsher, R., Halmut, T., Neuman, M., Abramovitz, B., Mates, A., Mendelson, E. (1999)** A double-selective tissue culture system for isolation of wild-type poliovirus from sewage applied in a long term environmental surveillance. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1794-1797.
- 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.
- Melnick J.L. (1996).** Current status of poliovirus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 9: 293-300. Review.
- Mendelsohn C.L., Wimmer E., Racaniello V.R. (1989).** Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* 56: 855-65.
- 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*
- Minor P.D. (1992).** The molecular biology of polio vaccines. *J. Gen. Virol.* 73: 3065-3077.
- Minor P.D. (1999)** General features of poliovirus. *Academic Press Encyclopedia of Virology 2e.*
- Muge Kuyumcu-Martinez N., Van Eden M.E., Younan P., Lloyd R.E.(2004).** Cleavage of Poly (A)-Binding Protein by Poliovirus 3C Protease Inhibits Host Cell Translation: a Novel Mechanism for Host Translation Shutoff. *Molecular and Cellular Biol.* 24(4):1779-1790.
- Muir P., Kammerer U., Korn K., Mulders M.N., Poyry T., Weissbrich B., Kandolf R., Cleator G.M, van Loon A.M. (1998).** Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin. Microbiol. Rev.* 11(1): 202-27.
- Mulders M.N., Reimerink J.H., Stenvik M., Alaeddinoglu I., van der Avoort H.G., Hovi T., Koopmans M.P. (1999).** A Sabin vaccine-derived field isolate of poliovirus type 1 displaying aberrant phenotypic and genetic features, including a deletion in antigenic site 1. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 4):907-16.
- Murray K.E., Barton D.J. (2003).** Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol.* 77(8): 4739-50.
- Murray K.E., Roberts A.W. and Barton D.J. (2001).** Poly(rC) binding proteins mediate poliovirus mRNA stability. *RNA* 7: 1126-1141.
- Novak, J.E., and K. Kinkegaard (1991).** Improved method for detecting poliovirus negative strands used to demonstrate specificity of positive-strand encapsidation and the ratio of positive to negative strands in infected cells. *J. Virol.* 65:3384-3387.
- Novella I.S., Quer J., Domingo E. Holland J.J.(1999)** Exponential Fitness Gains of RNA Virus Populations Are Limited by Bottleneck Effects. *J. Virol.* 73(2):1668-1671
- Nucleotide Sequence of a Neurovirulent Variant of the Type 2 Oral Poliovirus Vaccine. J. Virol.** 63(11):4949-4951.
- Nugent C.I., Johnson K.L., Sarnow P., Kirkegaard K.(1999).** Functional Coupling between Replication and Packaging of Poliovirus Replicon RNA. *J. Virol* 73(1):427-435.
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Flemister M.R., Brown B.A., Pallansch M.A. (1999).** Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J. Clin. Microbiol.* (5): 1288-93.
- Ochs K., Saleh L., Bassili, G., Sonntag V., Zeller A., Niepmann M., (2002).** Interaction of translation factor eIF4B with poliovirus internal ribosome entry site. *J. Virol.* 76(5) : 2113 – 2122.

- P. F. Stadler and I. L. Hofacker (2001).** Conserved RNA secondary structure in Picornaviridae genomes. *Nucleic Acid Res.* **29**:5079-5089.
- Pathak, H.B., S. K. B., Ghosh, A. W. Roberts, S. D. Sharma, J. D. Yoder, J. J. Arnold, D. W. Gohara, D. J. Barton, A.V. Paul, and C. E. Cameron. (2002)** Structure-function relationships of the RNA-dependent RNA polymerase from poliovirus 3D^{pol} : a surface of the primary oligomerization domain functions in capsid precursor processing and VPg uridylation. *J. Biol. Chem.* **277**, 31551-31562.
- Paul A.V. Yin J., Mugavero J., Rieder E., Liu Y., Wimmer E. (2003).** A „Slide-back“ Mechanism for the Initiation of Protein-primed RNA Synthesis
- Paul A.V., Cao X., Harris K.S. Lama J. and Wimmer E. (1994).** Studies with poliovirus polymerase 3Dpol. Stimulation of poly(U) synthesis in vitro by purified poliovirus protein 3AB. *J. Biol. Chem.* **269**: 29173-29181.
- Pestova T.V., Hellen C.U., Wimmer E. (1994).** A conserved AUG triplet in the 5' nontranslated region of poliovirus can function as an initiation codon in vitro and in vivo. *Virology.* **204**(2): 729-37.
- Pfister T., and Wimmer E., (1999).** Characterization of nucleoside triphosphatase activity of poliovirus protein 2C reveals a mechanism by which guanidine inhibits poliovirus replication. *J. Biol. Chem.* **274**: 6992-7001.
- Pfister T., Mirzayan C. and Wimmer E. (1999).** Molecular biology. In “*Encyclopedia of Virology*”, second edition (A. Granoff & R.G. Webster, Eds), pp 1330-1348 Academic Press Ltd.
- Pilipenko E. V., Gmyl A. P., Agol V. I. (1995).** A model for rearrangements in RNA genomes. *Nuc. Ac. Res.* **23**(11): 1870 – 1875.
- 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
- ProMED-mail (2004)** Poliomyelitis- Bostwana ex Nigeria. Source: Boston Globe Online, Wed 14
- ProMED-mail (2004)** Poliomyelitis-Africa: Guinea, Mali. Source: *WHO Press Release*, Tue 24 Apr 2004
- Raju, R., Hajjoy, M., Hill, K. R., Botta, V., and Botta, S. (1999).** In vivo addition of poly (A) tail and AU-rich sequences to 3'-end and repair pathway. *J. Virol.* **73**, 2410-2419.
- Rao VC, Melnick JL (1986)** Environmental virology. In: Cole JA, Knowles CJ, Schlessinger D (eds) *Aspects of Microbiology* 13. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Romanova L. I., Blinov V. M., Tolskaya E. A., Victorova E. G., Kolesnikova M. S., Guseva E. A., Agol V. I. (1986).** The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology.* **155**: 202 – 213.
- Rotbart, H.A. (1997)** Enteroviruses. In: *Clinical Virology*. Ed by Richman, D. D., Whitley, R.J., Hayden, F.G. Churchill Livingstone Inc, New York, USA, pp.997-1008.
- Sarnow, P.(1989).** Role of 3'-end sequences in infectivity of poliovirus transcripts made in vitro. *J. Virol.* **63**, 467-470.
- Selinka H.C., Zibert A., Wimmer E. (1991).** Poliovirus can enter and infect mammalian cells by way of an intercellular adhesion molecule 1 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* **88**: 3598-602.
- Spagnolo, J. F., and Hogue, B. G. (2000).** Host proteins interactions with the 3'-end of bovine coronavirus RNA and the requirement of the poly (A) tail for coronavirus defective genome replication. *J. Virol.* **74**, 5053-5065.
- Stanway G. (1990).** Structure, function and evolution of picornaviruses. *J. Gen. Virol.* **71**: 2483-2501. Review.

- Tobin G.J., Young D.C., Flanagan J.B. (1989).** Self-catalyzed linkage of poliovirus terminal protein VPg to poliovirus RNA. *Cell*. 59: 511-9.
- Triki, H., Barbouche, M.R., Bahri, O., Bejaoui, M., Dellagi, K. (2003)** Community-acquired poliovirus infection in children with primary immunodeficiencies in Tunisia. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1203-1211.
- Tsang S.K., McDermott B.M. , Racaniello V.R., Hogle J.M.(2001).** Kinetic Analysis of the Effect of Poliovirus Receptor on Viral Uncoating: the Receptor as a Catalyst. *J. Virol.* 75(11): 4984-4989.
- Van der Avoort, H.G.A.M., Hull, B.P., Hovi, T., Pallanch, M.A., Kew, O.M., Crainic, R., Wood, D.J., Mulders, M.N., van Loon, A.M. (1995)** Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2562-2566.
- Wang J., Bakkers J., Galama J., Bruins Slot H., Pilipenko E.V., Agol V.I., Melchers W. (1999).** Structural requirements of the higher order RNA kissing element in the enteroviral 3'UTR. *Nucleic Acids Res.* 27: 353-436.
- Ward C.D., Flanagan J.B. (1992).** Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J. Virol.* 66(6): 3784-93.
- 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.
- Wimmer E., Harber J.J., Bibb J.A., Gromeier M., Lu H.H. and Bernhardt G. (1994).** in *Cellular Receptors for Animal Viruses*, ed. Wimmer E.(Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), pp 101-127.
- Wood, D.J., Sutter, R.W., Dowdle, W.R. (2000)** Stopping poliovirus vaccination after eradication : issues and challenges. *Bulletin of the World Health Organization* 78: 347-357.
- Wood, N., Thorley, B. (2003)** Viewpoint Towards global poliomyelitis eradication: the successes and the challenges for a developed country. *Journal of Paediatrics and Child Health* 39: 647-650.
- World Health Organization (2002)** Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO/EPI/GEN/02.1).
- World Health Organization (2004)** Manual for the virological investigation of poliomyelitis. Geneva, Switzerland: World Health Organization (WHO/EPI/GEN/04).
- Yang, C.F., De, L., Holloway, B.P., Pallanch, M.A., Kew, O.M. (1991)** Detection and identification of vaccine-related polioviruses by the polymerase chain reaction. *Virus Research* 20: 159-179.
- Yang, Y., Rijnbrand, R., McKnight, K. L., Wimmer, E., Paul, A., Martin, A., and Lemon, S. M. (2002).** *J. Virol.* 76, 7485- 7494.
- Zaoutis, T., Klein, J.D. (1998)** Enterovirus infections. *Pediatrics in Review* 19 :183-191.
- 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.

Ευχαριστίες

Η συγκεκριμένη εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Ιολογίας του τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας τη χρονική περίοδο Μαρτίου με Σεπτέμβρη του 2006. Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή Βιοχημείας (Μέλος ΔΕΠ) και υπεύθυνο του εργαστηρίου κ. Μαρκουλάτο Παναγιώτη.

Επίσης, εκφράζω τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη του εργαστηρίου, την Κυριακοπούλου Ζαχαρούλα και ιδιαιτέρως τον Δεδεψίδη Ευάγγελο που είχαν αναλάβει την επίβλεψη της εργασίας μου.

ΒΕΒΑΙΩΣΗ

Βεβαιώνω ότι πραγματοποίησα τη συγκεκριμένη εργασία αυτόνομα και δε χρησιμοποίησα άλλες πηγές και βοηθήματα από όσα έχουν προαναφερθεί.

Ημερομηνία

Υπογραφή

